

**Von der Identifizierung neuer Substrate
der 15 β -Hydroxylase (CYP106A2)
zur Cytochrom P450-Ganzzellkatalyse
in *Bacillus megaterium***

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. Sabrina Bleif

Saarbrücken
2012

Tag des Kolloquiums:	23.Oktober 2012
Dekan:	Prof. Dr. Wilhelm F. Maier
Berichterstatter:	Prof. Dr. Rita Bernhardt Prof. Dr. Johann Jauch Prof. Dr. Vlada Urlacher
Vorsitz:	Prof. Dr. Gregor Jung
Akad. Mitarbeiter:	Dr. Angelika Ullrich

„Nothing great was ever achieved without enthusiasm“

Ralph Waldo Emerson
(25.5.1803-27.4.1882)

*Allen,
die an mich geglaubt haben*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abkürzungen für Aminosäuren	V
Summary	VI
Zusammenfassung	VII
1 Einleitung	1
1.1 <i>Cytochrome P450</i>	1
1.2 <i>Cytochrome P450 in der Biotechnologie</i>	8
1.3 <i>Limitierende Faktoren bei der Anwendung von Cytochromen P450</i>	9
1.3.1 Aktivität und Spezifität	10
1.3.2 Stabilität	11
1.3.3 Elektronentransfer	11
1.3.4 Lösemitteltoleranz	12
1.3.5 Kofaktor-Regeneration	12
1.4 <i>CYP106A2 aus Bacillus megaterium ATCC 13368</i>	13
1.5 <i>Bacillus megaterium</i>	17
1.6 <i>Bacillus megaterium als Expressionswirt für rekombinante Proteine</i>	18
1.7 <i>Aufgabenstellung</i>	20
2 Material und Methoden	22
2.1 <i>Material</i>	22
2.1.1 Enzyme und Proteine	22
2.1.2 Oligonukleotide	22
2.1.3 Vektoren	23
2.1.4 Bakterienstämme	24
2.1.5 Kultivierung von Bakterien	25
2.1.6 Lagerung von Bakterien	25
2.2 <i>Methoden</i>	25
2.2.1 Bioinformatische Methoden	25

2.2.2	Gentechnische Manipulationen	26
2.2.3	Proteinanalysen	30
2.2.4	Spektroskopische Methoden	31
2.2.5	CYP106A2 abhängiger <i>in vitro</i> Substratumsatz	32
2.2.6	Bestimmung der Enzymaktivität	33
2.2.7	CYP106A2 abhängiger <i>in vivo</i> Substratumsatz	33
2.2.8	Large-scale Substratumsatz in <i>Bacillus megaterium</i>	35
2.2.9	Kieselgel-Chromatographie	36
2.2.10	HPLC-Analyse	36
3	Ergebnisse	37
3.1	<i>In vitro</i> Charakterisierung neuer Substrate von CYP106A2	37
3.1.1	Potentielle Typ I-Shift induzierende Substrate von CYP106A2	37
3.1.2	Typ-I Differenzspektroskopie	39
3.1.3	<i>In vitro</i> Substratumsatz mit CYP106A2	41
3.1.4	Substratdocking	48
3.1.5	Katalytische Aktivität	51
3.2	Substratumsatz in <i>E.coli</i>	54
3.2.1	Entwicklung eines NADPH-Regenerationssystems für <i>E.coli</i>	57
3.2.2	Klonierung	57
3.3	Substratumsatz in <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 13368	59
3.3.1	Umsatz von 17 α -Methyltestosteron	59
3.3.2	Umsatz von Abietinsäure	61
3.3.3	Umsatz von 11-Keto- β -boswelliasäure	64
3.3.4	Umsatz von 18 β -Glycyrrhetinsäure	66
3.4	Entwicklung eines rekombinanten P450 Expressionssystems für <i>B. megaterium</i>	68
3.4.1	Klonierung	69
3.4.2	Koexpression von CYP106A2, AdR und Adx in <i>Bacillus megaterium</i>	70
3.4.3	CO-Differenzspektroskopie	74
3.4.4	Substratumsatz in <i>Bacillus megaterium</i> MS941	76
3.5	Evaluierung des rekombinanten P450 Biokatalysators	81

3.5.1	11-Keto- β -boswelliasäure	81
3.5.2	18 β -Glycyrrhetinsäure	82
3.5.3	Abietinsäure	83
3.5.4	17 α -Methyltestosteron	84
4	Diskussion und Ausblick	86
4.1	<i>Substratspezifität und Substratbindung</i>	87
4.2	<i>In vitro Substratumsatz und katalytische Aktivität</i>	92
4.3	<i>Ganzzellkatalyse</i>	99
4.3.1	Ganzzellumsatz in <i>E. coli</i>	99
4.3.2	Ganzzellumsatz in <i>B. megaterium</i> ATCC 13368	101
4.4	<i>Entwicklung eines rekombinanten CYP106A2 abhängigen Biokatalysators in Bacillus megaterium</i>	103
4.5	<i>Einfluss der Redoxpartner auf die Regioselektivität der Hydroxylierung</i>	110
5	Literaturverzeichnis	112
6	Anhang	125
6.1	<i>Verwendete Expressionsplasmide</i>	125
6.1.1	Expressionsplasmide für <i>E. coli</i>	125
6.1.2	Expressionsplasmide für <i>Bacillus megaterium</i>	126
6.2	<i>Lösungen und Puffer für die Protoplastenpräparation und Transformation von B. megaterium</i>	127
6.3	<i>Sequenzen</i>	129
6.4	<i>Veröffentlichungen und Patente</i>	130

Abkürzungsverzeichnis

AdR	Adrenodoxin-Reduktase
Adx	Adrenodoxin
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CYP	Cytochrom P450
δ	Chemische Verschiebung
d	Tag
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	11-Desoxycorticosteron
FMDOC	6 α -Fluor-16 α -Methyldesoxycorticosteron
g	Gramm
GA	18 β -Glycyrrhetinsäure
h	Stunde
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-]-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kb	Kilobasen
KBA	11-Keto- β -boswelliasäure
kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mmol	Millimol
μ mol	Mikromol
MS	Massenspektrometrie
MW	Molecular weight
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
n. b.	nicht bestimmt
nmol	Nanomol
NMR	Nuclear magnetic resonance
ori	Origin of replication
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	parts per million

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylphosphat
T	Temperatur
t _R	Retentionszeit
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV/Vis	Ultravioletter und visueller Wellenlängenbereich
WT	Wildtyp

Abkürzungen für Aminosäuren

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

Summary

Cytochromes P450 exhibit a great biotechnological potential due to their ability to introduce molecular oxygen regio- and stereoselectively into non-activated hydrocarbons. The use of bacterial CYPs is thereby very interesting, because they possess higher expression rates, stabilities and often higher substrate specificities in comparison to membrane bound P450 monooxygenases. Within the scope of this work, new substrates of the 15 β -hydroxylase CYP106A2 from *Bacillus megaterium* ATCC 13368 have been identified and characterized in detail, which led to new insights into the substrate specificity and substrate binding of this enzyme. The substrate spectrum was extended to biotechnological relevant di- and triterpenes and CYP106A2 was identified as the first bacterial diterpene hydroxylase, which catalyzes a regioselective allylic hydroxylation in a single step. Using *Bacillus megaterium* ATCC 13368, which contains CYP106A2 and its homologous redox partners, sufficient amounts of reaction products were produced for the identification of the hydroxylation position by NMR-spectroscopy. To further improve the productivity of the natural converting whole-cell system, a P450 dependent recombinant expression system in *Bacillus megaterium* was developed, that allows the coexpression of CYP106A2 and its heterologous redox chain consisting of AdR and Adx. This whole-cell biocatalyst was successfully employed for the conversion of the new substrates, leading to an increased productivity in comparison to the naturally CYP106A2 expressing *Bacillus megaterium* ATCC 13368.

Zusammenfassung

Cytochrome P450 besitzen aufgrund ihrer Fähigkeit atomaren Sauerstoff regio- und stereoselektiv in nicht aktivierte C-H-Bindungen einzuführen ein großes biotechnologisches Potential. Ein Einsatz bakterieller CYPs ist hierbei besonders interessant, da sie sich im Vergleich zu membrangebundenen P450 Monooxygenasen durch höhere Expressionsraten, Stabilitäten und oft durch höhere Substratspezifitäten auszeichnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Substrate der bakteriellen 15 β -Hydroxylase CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368 identifiziert und eingehend charakterisiert, wodurch neue Erkenntnisse über die Substratspezifität und Substratbindung dieses Enzyms erhalten wurden. Das Substratspektrum wurde um biotechnologisch relevante Di- und Triterpene erweitert und infolge dessen wurde CYP106A2 als die erste bakterielle Diterpenhydroxylase identifiziert, die eine regioselektive allylische Hydroxylierung in einem Schritt katalysiert. Durch den Einsatz des *B. megaterium* Stammes ATCC 13368, der sowohl CYP106A2 als auch seine homologen Redoxpartner endogen beinhaltet, wurden ausreichende Mengen einzelner Produkte synthetisiert, um die exakte Hydroxylierungsposition im Molekül durch NMR-Spektroskopie zu bestimmen. Zur Steigerung der Produktivität dieses natürlichen Ganzzellsystems wurde zum ersten Mal ein P450 abhängiges rekombinantes Expressionssystem für *Bacillus megaterium* entwickelt, welches die Koexpression von CYP106A2 und seiner heterologen Redoxpartner AdR und Adx erlaubt. Dieser Ganzzellbiokatalysator wurde erfolgreich zum Umsatz der neuen Substrate eingesetzt, wodurch eine deutliche Steigerung der Produktivität im Vergleich zum natürlichen CYP106A2 exprimierenden *Bacillus megaterium* Stamm ATCC 13368 erzielt wurde.

1 Einleitung

1.1 Cytochrome P450

Mason und Hayaishi konnten 1955 erstmals durch $^{18}\text{O}_2$ Markierung zeigen, dass Enzyme existieren, die in der Lage sind, O-Atome direkt aus molekularem Sauerstoff in organische Moleküle einzuführen, und Hayaishi bezeichnete diese als Oxygenasen (Mason et al. 1955; Hayaishi et al. 1955). Im selben Jahr veröffentlichte Axelrod die Oxidation von Ephedrin durch die mikrosomale Fraktion von Rattenleberlysate in Gegenwart von NADPH und molekularem Sauerstoff (Axelrod 1955). Drei Jahre später (1958) berichteten Garfinkel und Klingenberg unabhängig voneinander von einem CO-bindenden Pigment in Lebermikrosomen von Schweinen und Ratten, welches im reduzierten Eisen-CO-Komplex ein Absorptionsmaximum bei 450 nm zeigte (Klingenberg 1958; Garfinkel 1958). Dieses Pigment konnte schließlich 1964 von Omura und Sato als ein Häm-Protein, das als prosthetische Gruppe ein Eisen-Protoporphyrin-IX enthält, identifiziert werden und sie gaben diesem den Namen „Cytochrom P450“ (Omura und Sato 1964). Das charakteristische Absorptionsmaximum bei 450 nm der Cytochrom-P450-Enzyme beruht auf der Tatsache, dass der fünfte Ligand am Eisen des Protoporphyrin IX ein Thiolat-Anion eines Cysteins darstellt und nicht wie in anderen Eisen-Protoporphyrin-IX-haltigen Hämproteinen ein Histidin (Sono et al. 1996; Omura 2005). Heute weiß man, dass diese Enzyme, die ursprünglich in Rattenlebermikrosomen entdeckt wurden, eine Superfamilie von Häm-Thiolat-Proteinen darstellt, die in Bakterien, Pflanzen, Würmern, Säugetieren, Fischen, Insekten und Pilzen zu finden sind. So wurde erst kürzlich das erste virale Cytochrom P450 entdeckt (Lamb et al. 2009). 2010 waren bereits 12.456 verschiedene Cytochrome P450 bekannt (Nelson 2011). In *Arabidopsis* sind z.B. 272 und in Reis sogar 457 verschiedene P450 enthalten (Ortiz de Montellano 2010) und allein der Mensch trägt 57 aktive P450-Gene in sich. Die Diversität dieser Enzymklasse verlangte nach einer einheitlichen Nomenklatur, die 1987 eingeführt wurde (Nebert et al. 1987) und auf Sequenzvergleichen der Gene beruht. Ein P450-Gen erhält dabei die Abkürzung CYP (**C**ytochrom **P**450), gefolgt von einer arabischen Zahl, die für die Familie steht (Proteine mit einer Sequenzübereinstimmung von mehr als 40 %). Der folgende Buchstabe kennzeichnet die Subfamilie (bei mehr als 55 % Übereinstimmung) und eine weitere arabische Nummer steht für das individuelle Gen (Abb.

1.1) (Nelson et al. 1996). Weitere Informationen sind unter <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html> zu finden (Nelson 2009).

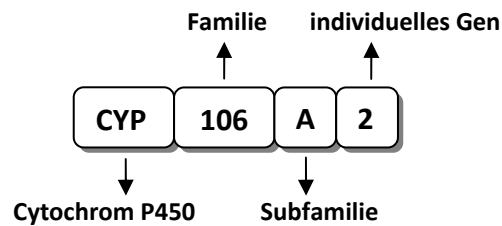
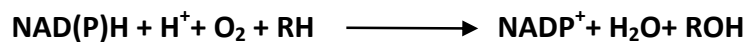


Abb. 1.1 Nomenklatur der Cytochrome P450 am Beispiel von CYP106A2.

Cytochrome P450 zählen zu den Oxygenasen, genauer zu den Monooxygenasen. Die von ihnen katalysierte Reaktion führt zu einer Reduktion von Sauerstoff, wobei eines der Sauerstoffatome in das Substrat eingebaut wird und das andere zu Wasser abreagiert. Die für die Reaktion benötigten Elektronen erhalten sie von externen Elektronendonatoren wie z.B NADPH. Man ordnet sie deshalb den externen Monooxygenasen zu.

Die von Cytochromen P450 katalysierte Reaktion lässt sich wie folgt darstellen:



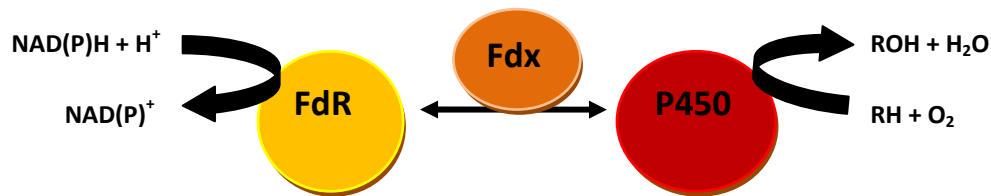
RH: Substrat in der reduzierten Form

ROH: Substrat in der oxidierten Form

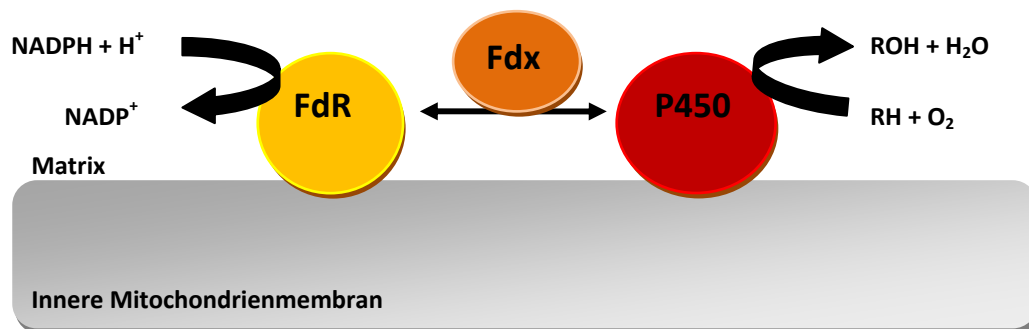
NAD(P)H + H⁺: externer Elektronendonator

Allerdings ist eine direkte Elektronenübertragung zwischen dem Donator (in der Regel NAD(P)H) und dem Cytochrom P450 meist nicht möglich. Deshalb sind ein oder zwei zusätzliche Proteine erforderlich, um den vollständigen Transfer der Elektronen zum Häm-Protein zu gewährleisten. Diese sogenannten Cytochrom-P450-Systeme werden in unterschiedliche Klassen eingeteilt (Abb. 1.2) (Hannemann et al. 2007). Die beiden Hauptkategorien (Klasse I und II) beinhalten das mitochondriale/bakterielle System (Klasse I), in dem die Elektronen von NAD(P)H über eine FAD-haltige Ferredoxinreduktase (FdR) zu einem löslichen Eisen-Schwefel-Protein (Ferredoxin, Fdx) transferiert werden, welches die Elektronen schließlich auf das Cytochrom P450 überträgt. Im mitochondrialen System ist die Reduktase an die innere Membran assoziiert und das P450 in die Membran eingebettet, wohingegen im bakteriellen System alle beteiligten Proteine in löslicher Form vorliegen. Die zweite Kategorie (Klasse II) umfasst das mikrosomale System, in dem alle

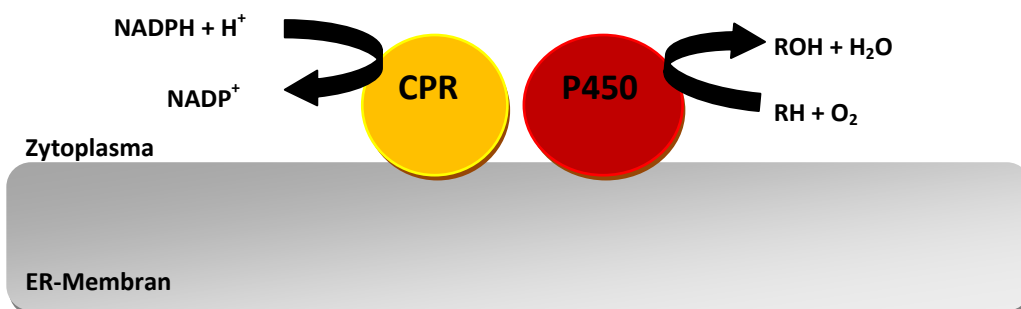
Proteinkomponenten in die Membran eingelagert sind. Hier erfolgt der Elektronentransfer von NADPH über die Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (CPR), die sowohl eine FAD- als auch eine FMN-Domäne beinhaltet. Die FAD-Domäne fungiert als Elektronenakzeptor für NADPH und die FMN-Domäne überträgt die Elektronen zum Cytochrom P450.



A) Klasse I, bakterielles System



B) Klasse I, mitochondriales System



C) Klasse II, mikrosomales System

Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Klassifizierung von Cytochrom-P450-Systemen nach Hannemann *et al* (2007). A) Klasse I, bakteriell; B) Klasse I, mitochondrial; C) Klasse II, mikrosomal. FdR = Ferredoxinreduktase, Fdx = Ferredoxin, P450 = Cytochrom P450, CPR = Cytochrom-P450-Oxidoreduktase, ER = endoplasmatisches Retikulum.

Neben den in Abb. 1.2 dargestellten Hauptkategorien existieren weitere Systeme, in denen die einzelnen Proteine zum Teil fusioniert vorliegen und/oder aus anderen Enzymen bestehen (Hannemann et al. 2007). Diese werden hier jedoch nicht näher diskutiert.

Aufgrund ihrer Vielfältigkeit und weiten Verbreitung ist es nicht verwunderlich, dass Cytochrome P450 eine Vielzahl verschiedener Reaktionen katalysieren. In der menschlichen Leber vollführen sie beispielsweise 75 % der Phase-I-Reaktionen (Guengerich 2006). Aus diesem Grund sind sie äußerst interessant für die pharmazeutische Industrie, da das Wissen über die genaue Verstoffwechselung von neuen Arzneimittelkandidaten während der Medikamentenentwicklung von höchster Wichtigkeit ist (Schroer et al. 2010). Die eingesetzte Verbindung kann z.B. erst durch den P450-abhängigen Metabolismus in ihre aktive Form (Prodrug) überführt werden (Guengerich 2002) und unreaktive Xenobiotika können zu hoch reaktiven, elektrophilen Zwischenstufen umgewandelt werden, die die DNA alkylieren und dadurch eine krebserzeugende Wirkung entwickeln (Omura 2005). Neben ihrer Fähigkeit, Arzneimittel zu metabolisieren, spielen sie in Säugern eine zentrale Rolle in der Biosynthese von Steroidhormonen (Bernhardt 1996; Bernhardt und Waterman 2007), von Vitamin D und Gallensäuren. In Pflanzen sind sie ebenfalls an verschiedenen biochemischen Stoffwechselwegen beteiligt. Dies umfasst die Bildung von primären und sekundären Metaboliten wie z.B. Alkaloiden, Terpenoiden, Lipiden und Pflanzenhormonen (Mizutani und Ohta 2010). So wurde in der Weihrauchkiefer ein multifunktionelles Cytochrom P450 (CYP720B1) entdeckt, das zahlreiche Diterpenoide als Substrate akzeptiert (Ro et al. 2005). Es katalysiert die letzten beiden Oxidationsschritte bei der Bildung von Abietinsäure aus Abietadiene (Zulak und Bohlmann 2010). Die gebildete Diterpenresinsäure, ist eine wichtige Verbindung der Pflanze, um sich gegen Pflanzenfresser und Krankheitserreger zu verteidigen (Mizutani und Ohta 2010). Dieser von der Kiefer vollführte Sekundärmetabolismus ähnelt dabei stark der Oxidation von *ent*-Kauren zur *ent*-Kaurensäure während der Biosynthese der Gibberellinphytohormone (Ro et al. 2005). In Bakterien übernehmen Cytochrome P450 ebenfalls eine zentrale Rolle, so sind sie am biologischen Abbau von Verbindungen beteiligt, die von den Mikroorganismen als Kohlenstoffquelle verwendet werden und sind in die Produktion von biologisch aktiven Sekundärmetaboliten wie Antibiotika und Antimykotika involviert. 65 % aller Antibiotika mikrobiellen Ursprungs stammen von Streptomyceten ab (Lamb et al. 2006). Das Cytochrom P450_{PICK} (CYP107L1) aus *Streptomyces venezuelae* ist beispielsweise in der Lage, zwei

Makrolide unterschiedlicher Größe zu binden und diese an zwei unterschiedlichen Positionen zu hydroxylieren, wodurch nicht weniger als vier Makrolidantibiotika gebildet werden (Cryle et al. 2003). Ebenfalls erwähnenswert ist die Beteiligung von Cytochromen P450 an der Biosynthese der Epothilone aus *Songarium cellulorum*. Epothilone besitzen zwar nur eine begrenzte antimykotische Wirkung, allerdings haben sie eine starke zytostatische Wirkung, die auf der Stabilisierung der Mikrotubuli beruht, einem Wirkmechanismus, den bislang nur Taxol gezeigt hat (Ogura et al. 2004).

Eine kurze Übersicht über die von Cytochromen P450 katalysierten Reaktionen ist in Abb. 1.3 gegeben (Sono et al. 1996; Meunier et al. 2004; Bernhardt 2006).

<ul style="list-style-type: none"> • Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen • Epoxidierung von Alkenen, Oxygenierung von Alkinen • Epoxidierung von Aren, aromatische Hydroxylierung, NIH shift • N-, S-, O-Dealkylierung • N-Hydroxylierung • N-, S-Oxidation • Oxidative Desaminierung • Oxidative Dehalogenierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Dehydrierung • Dehydratisierung • Reduktive Dehalogenierung • Reduktion von N-Oxid • Reduktion von Epoxid • Reduktive β-Spaltung von Alkylperoxiden • Reduktion von NO • Isomerisierungen • Oxidative C-C Bindungsspaltung • Oxidation von Alkoholen und Aldehyden
--	--

Abb. 1.3 Schematische Zusammenfassung P450 katalysierter Reaktionen.

Der sequentielle Reduktionsmechanismus der Cytochrome P450 und die Existenz von zahlreichen Zwischenstufen wurde als erstes im bakteriellen CYP101A1 (P450_{cam}) aus *Pseudomonas putida* und in mikrosomalen Systemen in den späten 60er und frühen 70er Jahren beschrieben (Katagiri et al. 1968; Estabrook et al. 1971). Heute ist ein katalytischer Zyklus bekannt, der acht Intermediate beinhaltet (Abb. 1.4) (Denisov et al. 2005). Die Aufklärung des Reaktionszykluses erfolgte mit Hilfe von Kristallstrukturen sowie zahlreichen spektroskopischen Methoden wie EPR-, Mössbauer-, EXAFS-, Raman-, NMR- MCD- und UV/Vis-Spektroskopie (Isin und Guengerich 2008). Dies war jedoch nur möglich, weil die in Abb. 1.4 dargestellten Häm-Sauerstoff-Intermediate sowie die prosthetischen Gruppenkomplexe (mit anderen kleinen Liganden und/oder Inhibitoren) innerhalb der verschiedenen P450 Isoformen die gleichen oder ähnliche spektrale Eigenschaften aufweisen

(Luthra et al. 2011). So konnte die sog. „*compound I*“ (Intermediat **7**, Abb. 1.4) erst kürzlich zum ersten Mal direkt spektroskopisch unter Verwendung von CYP119 aus dem thermophilen Organismus *Sulfolobus acidocaldarius* charakterisiert werden (Rittle und Green 2010).

Der katalytische Zyklus der Cytochrome P450 beinhaltet, wie bereits erwähnt, acht Zwischenstufen, in denen das Häm-Eisen drei verschiedene Oxidationszustände durchläuft (Fe^{2+} , Fe^{3+} und Fe^{4+}). Im substratfreien Zustand **1** ist das Häm-Eisen sechsfach koordiniert und bildet einen oktaedrischen Komplex, in dem die äquatorialen Positionen von den vier Stickstoffatomen des Protoporphyrinrings besetzt sind und die axialen Positionen von einem Wassermolekül und einem Cysteinat eingenommen werden. Die Bindung des Substrats an das sechsfach koordinierte low-spin (LS) Fe^{3+} -Enzym **1** verdrängt gewöhnlich das als sechsten Liganden, *trans* zum Cysteinat gebundene Wassermolekül und führt zur Bildung eines fünffach koordinierten high-spin (HS) Enzym-Substrat-Komplexes **2**. Das HS Fe^{3+} besitzt nun ein positiveres Reduktionspotential, wodurch sich das Eisen leichter zu Fe^{2+} **3** reduzieren lässt. In Studien unter Verwendung von CYP3A4 Nanodiscs konnte nach der Substratbindung beispielsweise eine Steigerung des Redoxpotentials um 80 mV beobachtet werden (Das et al. 2007). Die Bindung von Sauerstoff führt zu einem Oxy-P450 Komplex **4**. Im nachfolgenden Schritt wird dieser durch die Aufnahme des zweiten Elektrons zu einem Peroxo- Fe^{3+} -Zwischenprodukt **5** reduziert, das durch Protonierung in das Hydroperoxo- Fe^{3+} -Intermediat **6** übergeht. Nach einer zweiten Protonierung und anschließender O-O-Bindungsspaltung wird unter Eliminierung von Wasser Verbindung **7** gebildet, die als „*compound I*“ bezeichnet wird. Die Insertion des Sauerstoffatoms in das Substrat führt schließlich zur Ausbildung von Intermediat **8**. Im Allgemeinen wird diese Reaktion als Radikalreaktion betrachtet und über einen sog. „*Rebound-Mechanismus*“ (Abb. 1.5) erklärt (Newcomb et al. 2003; Ortiz de Montellano 2010).

Der Zyklus beinhaltet desweiteren drei zusätzliche Verzweigungsreaktionen, die als „*shunt pathways*“ bezeichnet werden. Diese Reaktionen führen zu einer Dissoziation der reaktiven Sauerstoffspezies vom Häm-Eisen, wobei jedoch nicht das gewünschte Endprodukt gebildet wird. Der *autoxidase shunt* beinhaltet eine Autoxidation des Komplexes **4** unter Bildung eines Superoxidations und Intermediat **2**. Der *peroxide shunt* führt unter Wasserstoffperoxidabspaltung des Komplexes **6** ebenfalls zur Bildung von **2** und im *oxidase shunt* wird aus *compound I* unter Verbrauch von zwei Molekülen NAD(P)H der Fe^{III} -Komplex

2 und Wasser gebildet. Diese Reaktionen werden auch als Entkopplungsreaktionen bezeichnet, da sie zwar die Reduktionsäquivalente verbrauchen, aber nicht zur Produktbildung führen. Die Rückreaktion des *peroxide shunt pathways* ist allerdings für biotechnologische Prozesse interessant, da hier direkt aus dem high-spin-Komplex **2** unter Verwendung einer Peroxidspezies das Intermediat **6** gebildet wird, wodurch der Zyklus ohne Zusatz eines teuren Kofaktors (NAD(P)H) durchlaufen werden kann (Cirino und Arnold 2003). Allerdings führt dies zu einer schnellen Inaktivierung des Enzyms (Coon et al. 1996).

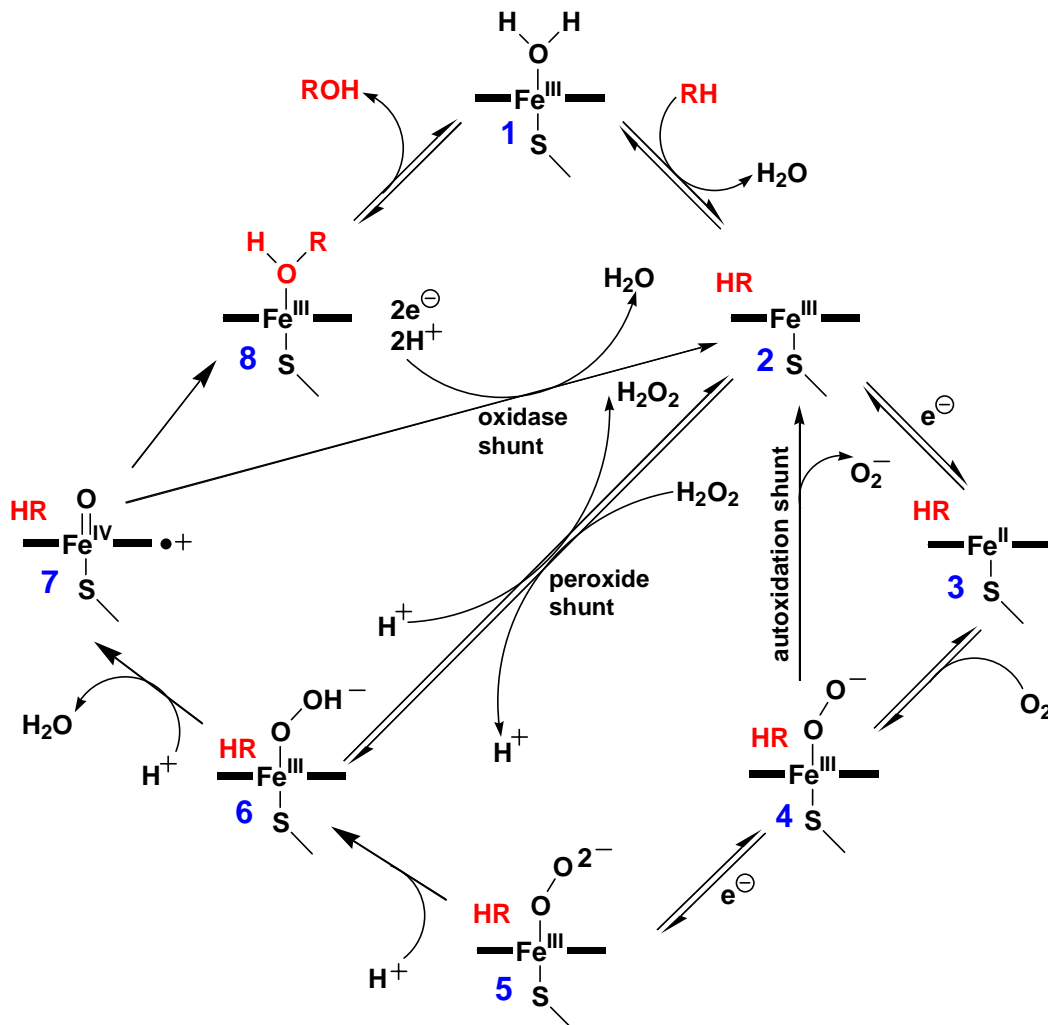


Abb. 1.4 Der katalytische Zyklus der Cytochrome P450 nach Ortiz de Montellano (2010).

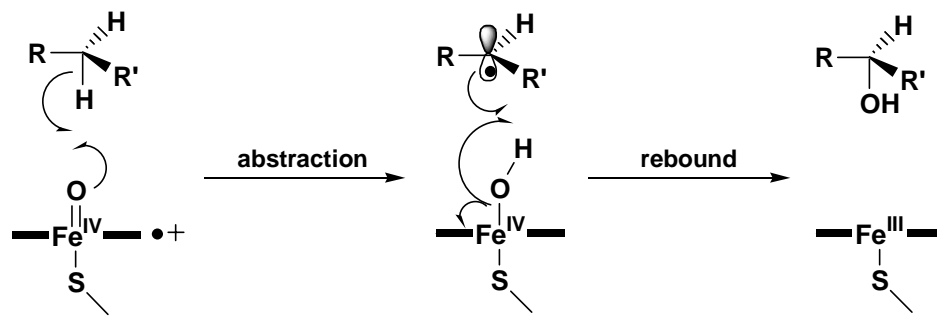


Abb. 1.5 Radikalischer Rebound-Mechanismus bei der P450-katalysierten Substrathydroxylierung.

1.2 Cytochrome P450 in der Biotechnologie

Aufgrund ihrer mannigfaltigen Funktionen, ihres immensen Substratspektrums und insbesondere ihrer Fähigkeit, atomaren Sauerstoff regio- oder stereoselektiv in allylische Positionen und sogar in nicht aktivierte C-H-Bindungen einzubringen, sind Cytochrome P450 von außerordentlichem Interesse für die Biotechnologie. Diese Art von Reaktionen sind nämlich meist nicht mit Hilfe der traditionellen organischen Synthese realisierbar oder erfolgen wenn, nur mit geringer Chemo-, Regio- und Enantioselektivität (Loughlin 2000). Die wichtigsten Anwendungsmöglichkeiten dieser Biokatalysatoren bestehen dabei wohl in der Synthese von Arzneimitteln, Medikamentenmetaboliten, Feinchemikalien und im Bereich der biologischen Dekontaminierung. Trotz dieses sehr großen Potentials existieren aber bisher nur einige wenige Beispiele für den Einsatz von Cytochromen P450 in industriellen Prozessen (Tab. 1.1) (Julsing et al. 2008).

Tab. 1.1 Industrielle Biotransformationen mit Cytochromen P450 nach Julsing *et al.* (2008). n.a. = nicht angegeben.

Prozess	Biokatalysator	Ausbeute	Unternehmen
n-Tridecan → α,ω-Tridecansäure	<i>Candida Tropicalis</i> (CYP52A1)	166 g/L	Cognis
Compactin → Pravastatin	<i>Streptomyces</i> Y-110 (CYP105A3)	1 g/L	Bristol-Myers-Squibb/Sankyo
Amorpha-4,11-dien → Artemisininsäure	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CYP71AV1)	0.12 g/L	Amyris Biotechnologies
11-Deoxycortisol → Hydrocortison	<i>Curvularia lunata</i> (P450 _{lun})	n.a.	Pfizer/Bayer-Schering
Simvastatin → 6β-Hydroxymethylsimvastatin	<i>Nocardia autotropica</i> (unbekanntes P450)	0.8 g/L	Merck

Anzumerken ist, dass in diesen Prozessen der Einsatz des Biokatalysators bislang auf Ganzzellsysteme beschränkt ist und die verwendeten Mikroorganismen das P450 bereits

endogen beinhalten. Lediglich bei der Produktion von Artemisininsäure, einer Vorstufe des Anti-Malaria-Medikaments Artemisinin, wird ein Hefestamm zur heterologen Expression von CYP71AV1, welches aus der Pflanze *Artemisia annua* isoliert wurde, verwendet. Erst kürzlich wurde von Dietrich *et al.* eine neue semi-biosynthetische Route zur direkten Herstellung von Artemisinin in *E. coli* veröffentlicht, bei der eine P450 BM3-Mutante verwendet wird, die selektiv die Bildung des Precursors Artemisinin-11S,12-epoxid aus Amorphadien mit Titern von 250 mg/L katalysiert (Dietrich et al. 2009). Obwohl der Einsatz der Monooxygenasen bisher auf wenige großtechnische Prozesse beschränkt ist, sind sie trotzdem sehr interessant für die Pharma-Branche. So werden bereits heute von Novartis und Roche zahlreiche Arzneimittelmetabolite während der Medikamentenentwicklung im mg-Maßstab mit Hilfe der heterologen Koexpression von humanen Cytochromen P450 und der Cytochrom-P450-Oxidoreduktase in *E.coli* hergestellt, um frühstmöglich Toxizitäten von Verbindungen festzustellen, Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Medikamenten zu bestimmen und Stoffwechselwege zu untersuchen (Hanlon et al. 2007; Schroer et al. 2010). Als ebenfalls sehr vielversprechend gilt eine mögliche Anwendung der P450 im Bereich biologischer Dekontaminierung, bei der Mikroorganismen, Pilze und Pflanzen eingesetzt werden können, um Schadstoffe aus dem Erdreich oder Wasser zu entfernen. Rylott *et al.* berichteten beispielsweise von einem Cytochrom P450 aus *Arabidopsis thaliana*, das in der Lage ist, den Militärsprengstoff Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX), mit dem bereits große Bodenareale kontaminiert sind, selektiv abzubauen. In ihren Untersuchungen züchteten sie transgene Pflanzen, die gegen XRD resistent sind, ein besseres Wachstum als der Wildtyp zeigen und den Sprengstoff selektiv degradieren (Rylott et al. 2006).

Diese Beispiele demonstrieren das immense Anwendungspotential dieser Protein-Superfamilie. Allerdings ist ihr industrieller Einsatz, wie bereits erwähnt, bisher auf einige wenige Anwendungen beschränkt. Auf die dafür verantwortlichen Gründe, soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.3 Limitierende Faktoren bei der Anwendung von Cytochromen P450

Gründe für den limitierten Einsatz der Cytochrome P450 in biotechnologischen Prozessen sind die oftmals geringen katalytischen Aktivitäten und schlechten Stabilitäten der Monooxygenasen sowie ihre strikte Abhängigkeit von stöchiometrischen Mengen des teuren Kofaktors NAD(P)H und der Notwendigkeit mit Elektronentransferpartnern zu interagieren,

um überhaupt katalytisch aktiv zu sein. Diese und andere mögliche Limitierungen sind schematisch in Abb. 1.6 dargestellt.

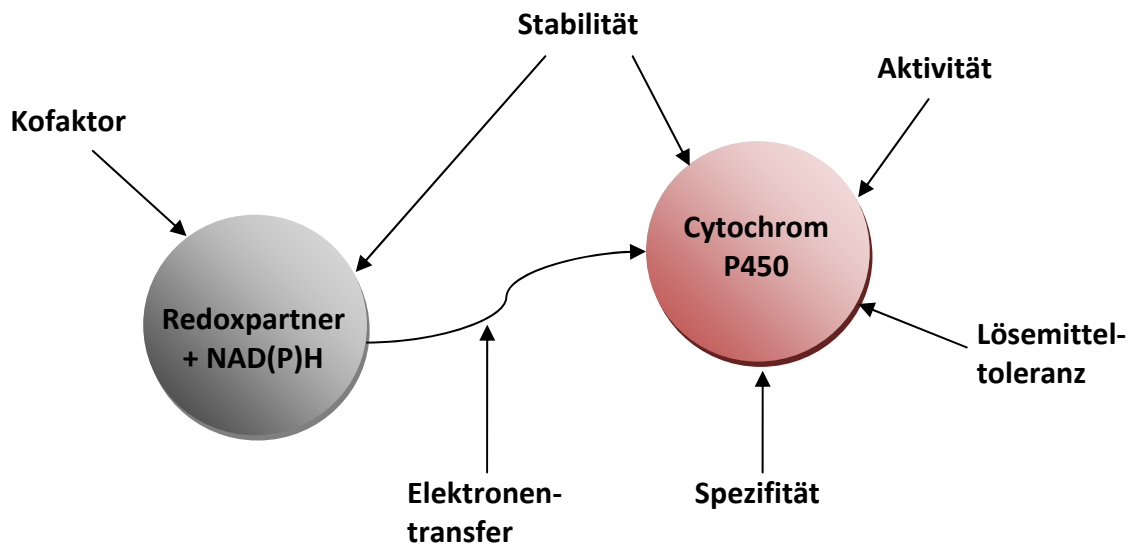


Abb. 1.6 Limitierende Faktoren für die Verwendung von Cytochromen P450 in der Biokatalyse nach O'Reilly *et al.* (2011).

1.3.1 Aktivität und Spezifität

Einer der Faktoren, der auf einen umfassenden Einsatz der Cytochrome P450 stark limitierend wirkt, ist ihre oftmals geringe katalytische Aktivität. Menschliche P450 erscheinen für die Entwicklung von Biokatalysatoren aufgrund ihres breitgefächerten Substratspektrums auf den ersten Blick zwar besser geeignet als die P450 bakteriellen Ursprungs, allerdings sind sie von schlechteren Umsatzzahlen, geringeren Selektivitäten und aufgrund ihrer Membranverankerung von niedrigeren heterologen Expressionsraten geprägt als ihre bakteriellen Gegenspieler. Deshalb wurden bereits zahlreiche Versuche unternommen, die Substratspezifität bakterieller P450 so zu erweitern und zu modifizieren, dass sie sich eher wie „menschliche P450“ verhalten (O'Reilly *et al.* 2011). Weis *et al.* generierten beispielsweise eine Bibliothek autarker CYPs aus Bakterien und Pilzen, die die gleichen Metabolite von Diclofenac und Chlorzoxazon bildeten wie menschliche P450 (Weis *et al.* 2009). Mit Hilfe der gerichteten Evolution konnten Mitarbeiter von Frances Arnold das natürliche Fusionsprotein CYP102A1 (P450 BM3) aus *Bacillus megaterium*, welches von allen bekannten P450 die größte katalytische Aktivität besitzt, so verändern, dass es unter

Verwendung von Wasserstoffperoxid (peroxide shunt pathway) die authentischen menschlichen Stoffwechselprodukte von Propanolol, die sehr attraktive Zielprodukte der Pharmaindustrie darstellen, produziert (Otey et al. 2006; Gillam 2008). Allerdings waren die totalen Umsatzzahlen sehr niedrig, so dass weitere Mutageneseschritte erfolgen müssten, um die Ausbeute zu optimieren.

1.3.2 Stabilität

Ein weiteres Hindernis für die synthetische und industrielle Anwendung liegt in der oftmals geringen Thermostabilität der Enzyme. Allerdings existieren auch Monooxygenasen wie CYP119 aus dem thermophilen Archaeobakterium *Sulfolobus solfataricus*, das sich durch eine extrem hohe Schmelztemperatur (~ 90°C) auszeichnet (Park et al. 2002). Eiben *et al.* konnte durch Austausch der weniger stabilen Reduktasedomäne von CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* gegen die stabilere von CYP102A3 aus *Bacillus subtilis* eine Chimäre mit erhöhter Thermostabilität bilden (Eiben et al. 2007). Ein weiterer interessanter Ansatz zur Erhöhung der Stabilität von Enzymen für *in vitro* Biotransformationen stellt die Immobilisierung dar (O'Reilly et al. 2011), die die Enzyme während ihrer Verwendung und Lagerung stabilisiert (Tischer und Kasche 1999). Eine erfolgreiche Immobilisierung eines P450 erfolgte mit Hilfe der mikrosomalen Fraktion von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen und Calciumalginat, wobei nach einer Lagerung von zwei Wochen bei 4°C noch eine Aktivität von 84 % vorhanden war (King et al. 1988). Allerdings wurde seither nur wenig zu diesem Thema publiziert.

1.3.3 Elektronentransfer

Der Elektronentransfer stellt oftmals den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt während der Biotransformation dar und ist somit ein wichtiger Angriffspunkt für eine Verbesserung des Biokatalysators. Selbst nach einer erfolgreichen Elektronenübertragung auf das Häm-Protein kann es zu Entkopplungsreaktionen kommen, die zwar Reduktionsäquivalente verbrauchen, aber nicht das gewünschte Produkt bilden. Autarke Cytochrome P450 wie das natürliche Fusionsprotein CYP102A1 (P450 BM3), in dem die Häm-Domäne und Diflavinreduktase-Domäne fusioniert vorliegen, sind daher besonders interessant. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass bereits zahlreiche synthetische P450-Fusionsproteine konstruiert wurden (Deeni et al. 2001; Inui et al. 2007). Weiterhin erfolgt die

Charakterisierung der Cytochrome P450 oftmals in Systemen, in denen die Elektronen nicht über ihre physiologischen Redoxpartner transferiert werden (Urlacher und Girhard 2011), da die Gene der Elektronentransferpartner oft nicht in der Nähe des P450 lokalisiert sind, sondern über das Genom verteilt vorliegen und somit oftmals nicht bekannt sind (Bell et al. 2006; Ewen et al. 2009). Die Effizienz des heterologen Elektronentransfers ist aber oftmals geringer als die unter Verwendung der homologen Redoxpartner (Hannemann et al. 2007).

1.3.4 Lösemitteltoleranz

Als ebenfalls problematisch gestaltet sich die Instabilität der P450 Monooxygenasen in Gegenwart bereits relativ geringer Mengen an organischem Lösemittel. Allerdings handelt es sich bei den meisten Substraten der P450 um stark hydrophobe Verbindungen, die nur in organischen Lösemitteln löslich sind, weshalb zahlreiche Studien zur Erhöhung der Stabilität der P450 mittels Zufalls- und Sättigungsmutagenese existieren (Gillam 2008). Die Toleranz von CYP102A1 gegenüber DMSO und THF konnte dadurch erheblich gesteigert werden (Wong et al. 2004). Eine weitere Alternative stellen Zweiphasensysteme dar, in denen das Cytochrom P450 in der wässrigen Phase und das Substrat in einer mit Wasser nicht mischbaren Phase vorliegt. Die biokatalytische Reaktion findet dann im Grenzbereich zwischen den beiden Phasen statt (Maurer et al. 2005; Zhao et al. 2007).

1.3.5 Kofaktor-Regeneration

Die schwierigste Herausforderung für eine *in vitro* Verwendung von isolierten, externen Monooxygenasen besteht wohl in ihrer Versorgung mit stöchiometrischen Mengen eines teuren Kofaktors (NAD(P)H) und der Bereitstellung von Redoxäquivalenten (Chefson und Auclair 2006). Daher existieren zahlreiche Ansätze, um das Versorgungsproblem mit ausreichenden Mengen des Kofaktors zu überwinden z.B. durch die Verwendung von Peroxiden im peroxide shunt pathway. Diese Methode führt aber zu einer raschen Inaktivierung des Cytochroms (Coon et al. 1996), was wiederum eine Verbesserung der Stabilität des Enzyms gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch direkte Evolution erfordert (Cirino und Arnold 2003). Die direkte Elektrochemie der Monooxygenasen, immobilisiert auf einer Kathode, gestaltet sich ebenfalls aufgrund der Instabilität des P450, die durch Interaktion des CYPs mit der Elektrodenoberfläche hervorgerufen wird, als schwierig, so dass Mediatoren zugesetzt werden müssen, die im katalytischen Zyklus

unterstützend wirken (Urlacher et al. 2004). Weiterhin führt die elektrochemische Regeneration von NAD(P)H zu unerwünschten Nebenreaktionen, die nur durch Zugabe von Organometallkomplexen vermieden werden können (Hollmann et al. 2002). Die wohl populärste Methode zur NAD(P)H-Regeneration besteht in der Kopplung der Reaktion mit einem zweiten Enzym, in den meisten Fällen einer Dehydrogenase. Dies erfordert allerdings den Einsatz eines zweiten Substrats (Maurer et al. 2003). Am häufigsten werden dabei Glucosedehydrogenasen und Formiatdehydrogenasen verwendet.

Ganzellumsätze sind *in vitro* Umsätzen im Allgemeinen vorzuziehen, da hier eine Regeneration des Kofaktors durch den zelleigenen Metabolismus erfolgt und ein zusätzliches Regenerationssystem koexprimiert werden kann, falls die Regeneration durch den Stoffwechsel nicht ausreichend ist. Ein interessantes Beispiel ist die regioselektive Epoxidierung des Monoterpens α -Pinen unter Verwendung einer Fünffachmutante von CYP102A1, die mit einem NADPH-Regenerationssystem in *E. coli* koexprimiert wurde (Schewe et al. 2008).

1.4 CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368

Die 15 β -Hydroxylase CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368 ist ein lösliches 47.5 kDa großes Protein, welches 410 Aminosäuren beinhaltet. Einen ersten Hinweis auf die Existenz dieses Proteins lieferte McAleer *et al.* im Jahr 1958, als er von einer Hydroxylierung des Progesterons in Position 15 β des Steroidgerüsts durch den *Bacillus megaterium* Stamm ATCC 13368 berichtete (McAleer et al. 1958). Bereits sieben Jahre später erbrachte Berg *et al.* den Nachweis, dass die Hydroxylierung auf ein NADPH-abhängiges Cytochrom-P450-System zurückzuführen ist (Berg et al. 1975) und 1979 gelang es ihm schließlich, das Protein zur Homogenität zu reinigen sowie eine erste Charakterisierung der 15 β -Hydroxylase durchzuführen (Berg et al. 1979b). Er postulierte, dass der homologe Elektronentransfer in *B. megaterium* wahrscheinlich über ein NADPH-abhängiges, FMN enthaltendes Flavoprotein (Megaredoxinreduktase) und ein Eisen-Schwefelprotein (Megaredoxin) verläuft (Berg 1982; Berg et al. 1976). Hier ist anzumerken, dass die natürlichen Redoxpartner bis heute noch nicht identifiziert wurden. Weiterhin stellte er die Behauptung auf, dass CYP106A2 eine Vielzahl von 3-oxo- Δ^4 -Steroiden in 15 β -Position zu hydroxylieren vermag (Abb. 1.7), 3 β -hydroxy- Δ^5 -, aromatische oder Ring A-reduzierte Steroide dagegen nicht umgesetzt werden.

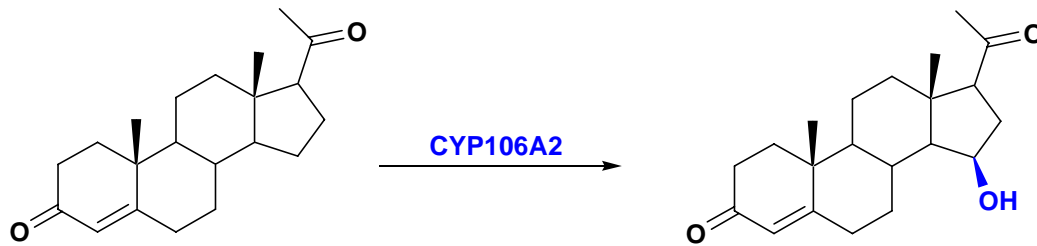


Abb. 1.7 15 β -Hydroxylierung eines 3-oxo- Δ^4 -Steroids durch CYP106A2 am Beispiel von Progesteron.

Diese These stützte er auf die Annahme, dass die 3-oxo- Δ^4 -Struktur essentiell für die Verankerung des Substrats in der Bindungsstelle sei, da die Distanz zwischen der Bindungsstelle und dem katalytischen Zentrum des Enzyms gerade 9.1 Å betrage, was gerade den Abstand zwischen der 3-oxo-Gruppe und dem C-Atom an Position 15 des Steroidmoleküls darstellt (Berg et al. 1976). CYP106A2 wurde schließlich 1993 erstmals durch Rauschenbach *et al.* kloniert, vollständig sequenziert sowie erfolgreich in *E. coli* und *B. subtilis* heterolog exprimiert. Nach Expression in *Bacillus subtilis* 168 war das P450 katalytisch aktiv, was auf ein Elektronentransportsystem in diesem Stamm schließen lässt, das in der Lage ist, Elektronen auf die 15 β -Hydroxylase zu übertragen (Rauschenbach et al. 1993). Heute weiß man, dass ein heterologer Elektronentransfer, ausgehend von NADPH, auch über die Putidaredoxinreduktase und das Putidaredoxin aus *Pseudomonas putida* (Lisurek 2004), über die *Anabaena* PCC 7119 Ferredoxin-NADP-Reduktase und das *Anabaena* PCC 7119 Ferredoxin (Fd) bzw. *Anabaena* PCC 7119 Flavodoxin (Fld) sowie über die bovine Adrenodoxinreduktase und das bovine Adrenodoxin möglich ist (Goni et al. 2009; Virus und Bernhardt 2008). Allerdings lassen die geringen Umsatzraten von CYP106A2 gegenüber anderen bakteriellen Systemen darauf schließen, dass Steroide nicht die physiologischen Substrate von CYP106A2 darstellen (Simgen et al. 2000). Das natürliche Substrat von CYP106A2 konnte bisher leider noch nicht identifiziert werden. Eine Liste der bisher bekannten von CYP106A2 umgesetzten Verbindungen ist in Tab. 1.2 gegeben.

Tab. 1.2 Übersicht über die bisher bekannten Substrate von CYP106A2.

Substrat	Referenz
Progesteron	(Berg et al. 1976; Berg et al. 1979a)
Deoxycorticosteron (DOC)	(Berg et al. 1976; Berg et al. 1979a)
6-Fluor-16-methyl-DOC	(Rauschenbach et al. 1993)
17 α -Hydroxyprogesteron	(Berg et al. 1976; Berg et al. 1979a)
20 α -Dihydroprogesteron	(Berg et al. 1976; Berg et al. 1979a)
6 β -Hydroxyprogesteron	(Lisurek 2004)
15 β -Hydroxyprogesteron	(Lisurek 2004)
Cortexolon	(Virus 2006)
Androstendion	(Berg et al. 1976; Berg et al. 1979a)
Testosteron	(Berg et al. 1976; Berg et al. 1979a)
Corticosteron	(Berg et al. 1976; Berg et al. 1979a)
Cholestenon	(Lisurek 2004)
Spironolacton	(Lisurek 2004)
Anilin	(Berg und Rafter 1981)
Imipramin	(Berg und Rafter 1981)
4-Pregnen-20 β -ol-3-on	(Bleif 2007)
11-Keto- β -boswelliasäure	(Bleif 2007)
Dihydrochinopimarsäure	(Bleif 2007)
Ethisteron	(Bleif 2007)
17 α -Methyltestosteron	(Bleif 2007)
4-Pregnen-17 α ,20 α ,21-triol-3-on	(Bleif 2007)

Cytochrome P450 zeigen in der Regel bei Substratbindung einen sog. high-spin- (Typ I) Shift, dieser konnte bisher jedoch für CYP106A2 nur mit Cholestenon nachgewiesen werden (Lisurek 2004). Versuche, die 15 β -Hydroxylase in unserer Arbeitsgruppe zu kristallisieren, führten leider zu keinem positiven Ergebnis, da sich das Enzym nach längerer Lagerung zersetzt (Virus et al. 2006). Allerdings konnte durch Homologie-Modellierung ein Modell von CYP106A2 erstellt werden (Abb. 1.8) (Lisurek et al. 2008). Bereits 1992 wurden von Gotoh *et al.* sechs sog. Substraterkennungsstellen (Substrate recognition Sites, SRSs) postuliert, die in allen Cytochromen P450 für die Substratbindung verantwortlich sind (Gotoh 1992). Lisurek *et al.* konnte durch Docking von Progesteron in das Strukturmodell von CYP106A2 die Aminosäurereste in den SRSs identifizieren (Lisurek 2004) (vgl. Tab. 1.3).



Abb. 1.8 Homologie-Modell von CYP106A2 nach Lisurek *et al.* (2008).

Tab. 1.3 Anhand des Dockings von Progesteron in das Homologie-Modell von CYP106A2 abgeleitete Aminosäuren, die die SRSs bilden (Lisurek 2004).

SRS	Aminosäuren
1. B/B`-und B`/C-Loop	R66, E78, S81, E84, N87, I88, T89
2. F-Helix	L171, F175, F178
3. G-Helix	nicht vorhanden
4. I-Helix	R235, M238, L239, A243, T247, T248
5. β 1-4	F289, N290, L291, K293, L294, R296
6. β 4-1/ β 4-2-Loop	A395, T396

Diese SRSs stellen die variabelsten Regionen in den ansonsten stark konservierten Strukturen dieser Enzyme dar. Allerdings ist diese Eigenschaft aber auch der Grund für die hohe Variabilität der Substratspezifität der Cytochrome P450.

1.5 *Bacillus megaterium*

Bereits vor mehr als einem Jahrhundert (1884) wurde das grampositive Bakterium *Bacillus megaterium* („megat(h)erium“ griech. = großes Tier) von Anton De Bary erstmals beschrieben (De Bary 1884). Mit ca. $60 \mu\text{m}^3$ hat es ein mehr als 100-mal größeres Volumen als *E. coli* (Abb. 1.9) und ist mit einer Größe von $1.5 \times 4 \mu\text{m}$ das Größte aller Bazillen (Vary et al. 2007). Obwohl generell als Bodenbakterium deklariert, ist *B. megaterium* in Meerwasser, Sedimenten, Fischen und sogar in Bienenhonig zu finden (Vary 1994). Aufgrund der enormen Größe seiner vegetativen Zellen und Sporen ist es für morphologische Studien der Zellstruktur, der Proteinlokalisierung, von Membranen und der Sporenbildung bestens geeignet (Bunk et al. 2010). So wurde *Bacillus megaterium* lange Zeit vor der Einführung von *Bacillus subtilis* als Modellorganismus grampositiver Bakterien zur Untersuchung von Bakteriophagen und für biochemische Studien eingesetzt (Eppinger et al. 2011).

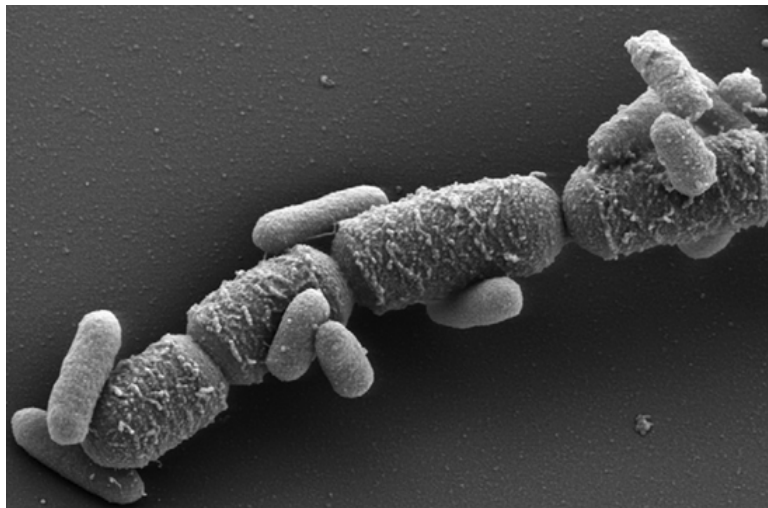


Abb. 1.9 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Bacillus megaterium* zusammen mit *E. coli* aus (Biedendieck et al. 2007a).

Anhand einer phylogenetischen Analyse wurde gezeigt, dass *B. megaterium*, anders als bisher angenommen, nur weitläufig mit *B. cereus* und *B. subtilis* verwandt zu sein scheint und in der Gruppe der Bazillen eher isoliert angesiedelt ist (Porwal et al. 2009). Erst kürzlich wurde das Genom von zwei *Bacillus megaterium* Stämmen (QM B1551 und DSM319) veröffentlicht (Eppinger et al. 2011), wobei die Größe des Genoms in beiden Stämmen 5.1 Mbp umfasst und einen GC-Gehalt von 38.2 % zeigt. Der Hauptunterschied zwischen QM B1551 und DSM319 besteht darin, dass *B. megaterium* QM B1551 sieben Plasmide mit

Größen von 5.4-164 kb in sich trägt, wohingegen DSM319 plasmidfrei vorliegt (Eppinger et al. 2011).

Unter den 5124 kodierenden Sequenzen des Genoms von DSM319 befinden sich auch drei Cytochrome P450 (CYP106A1 (P450 BM1) sowie zwei zusätzliche P450 Monooxygenasen, die bisher jedoch noch keiner P450-Familie zugeordnet wurden) und selbst auf einem Plasmid des Stammes QM B1551 ist eine P450 Monooxygenase lokalisiert (Eppinger et al. 2011). Der *Bacillus megaterium* Stamm ATCC 14581 enthält neben der wohl bekanntesten P450 Monooxygenase CYP102A1 (P450 BM3) zwei weitere Cytochrome P450 (P450 BM1 und P450 BM2) und *Bacillus megaterium* ATCC 13368 ist Träger der 15 β -Hydroxylase CYP106A2 (vgl. 1.4). Cytochrome P450 zählen somit mit zu den interessantesten Proteinen, die von diesem Mikroorganismus produziert werden (He und Fulco 1991; Vary et al. 2007).

Bacillus megaterium ist in der Lage, auf einer Vielzahl verschiedener Kohlenstoffquellen zu wachsen, was ihn seit mehr als 50 Jahren zu einem idealen Organismus für industrielle Anwendungen macht (Vary et al. 2007). *B. megaterium* Stämme werden dabei vielseitig eingesetzt, beispielsweise zur Herstellung von α - und β -Amylasen, die zur Stärkemodifikation in der Backindustrie verwendet werden, zur Produktion von Penicillin-Acylasen, die zur Synthese von synthetischen Antibiotika dienen und zur Herstellung von Vitamin B₁₂ (Vary 1994; Vary et al. 2007; Biedendieck et al. 2010).

1.6 *Bacillus megaterium* als Expressionswirt für rekombinante Proteine

Bacillus megaterium birgt als Expressionsstamm zur Herstellung rekombinanter Proteine im Vergleich zu anderen Mikroorganismen einige Vorteile: 1) wie bereits erwähnt, ist er ähnlich wie *E. coli* in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Kohlenstoffquellen zu nutzen, was es ihm erlaubt, auf kostengünstigen Substanzen zu wachsen; 2) er produziert keine Endotoxine, die mit der äußeren Membran gramnegativer *E. coli*-Zellen assoziiert sind; 3) *B. megaterium* Stämme besitzen hochstabile, frei-replizierende Plasmide und sind im Vergleich zu industriell verwendeten *B. subtilis* Stämmen frei von alkalischen Proteasen.

Da *B. megaterium* keinerlei pathogene und toxische Eigenschaften aufweist, wird er zur Gruppe der „GRAS“ (generally recognized as safe) Organismen gezählt und ist somit bestens für Ganzzellenanwendungen geeignet.

1980 legten Brown *et al.* mit der Entwicklung einer auf Protoplasten basierten Transformation den Grundstein für die heterologe Proteinexpression in *B. megaterium*

(Brown und Carlton 1980). Rygus *et al.* konnten 1991 den Xylose induzierbaren Promotor P_{xyIA} zusammen mit dem Gen für das regulatorische Repressorprotein XylR aus dem Genom von *B. megaterium* isolieren und basierend auf diesem Promotor ein frei replizierendes Plasmidsystem für die Xylose-induzierte Überexpression rekombinanter Proteine entwickeln (Rygus und Hillen 1991; Vary *et al.* 2007). Mit Hilfe dieses Shuttle-Vektors konnten zahlreiche prokaryotischen und eukaryotischen Proteine erfolgreich in *B. megaterium* exprimiert werden (Rygus und Hillen 1991; Burger *et al.* 2003). In weiteren Studien wurde die Promotorregion des von Rygen *et al.* entwickelten Plasmids weiter optimiert (Malten *et al.* 2005) und es folgte die Entwicklung von Vektoren, mit deren Hilfe die rekombinanten Proteine direkt mit fusioniertem N-oder C-terminalen Affinitätstag produziert werden können, was die anschließende Proteinreinigung erheblich erleichtert (Biedendieck *et al.* 2007b). Durch die Deletion der neutralen Metalloprotease *nprM* in *B. megaterium* DSM319, wodurch der Stamm MS941 erhalten wurde (Wittchen und Meinhardt 1995), und die Herstellung von Plasmiden, mit deren Hilfe eine Sekretion der überexprimierten Proteine direkt ins Kulturmedium erfolgen kann (Malten *et al.* 2005; Yang *et al.* 2006; Stammen *et al.* 2010), können getaggte Proteine nun in einem Schritt direkt aus dem Kulturüberstand gereinigt werden (Malten *et al.* 2006). Erst kürzlich wurde die Entwicklung eines viralen T7 Expressionssystems für *B. megaterium* beschrieben (Gamer *et al.* 2009). Dieses System wird bereits seit längerem für die heterologe Proteinexpression in *E. coli* verwendet (Dubendorff und Studier 1991) und stellt das stärkste System dar, welches bisher zur Expression rekombinanter Proteine entwickelt wurde.

1.7 Aufgabenstellung

Cytochrome P450 besitzen aufgrund ihrer Fähigkeit, atomaren Sauerstoff regio- und stereoselektiv in nicht aktivierte C-H-Bindungen einzuführen, ein großes biotechnologisches Potential. Insbesondere der Einsatz bakterieller CYPs ist hierbei höchst interessant, da sie im Vergleich zu tierischen und pflanzlichen P450 Monooxygenasen nicht membrangebunden vorliegen und sich zusätzlich durch höhere Expressionsraten, Stabilitäten und oftmals höhere Substratspezifitäten auszeichnen.

Um einen tieferen Einblick in die Substratspezifität der prokaryotischen 15 β -Hydroxylase (CYP106A2) aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368 zu erhalten, sollten im Zuge der vorliegenden Arbeit anhand von Strukturvergleichen bisher bekannter Substrate neue potentielle Verbindungen ausgewählt werden, die als Substrate von CYP106A2 agieren könnten. Diese Verbindungen sollten zunächst *in vitro* auf einen möglichen Umsatz mit CYP106A2 getestet und bei erfolgreicher Produktbildung sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Untersuchungen eingehend charakterisiert werden.

Anhand differenzspektroskopischer Studien sollten zunächst diejenigen Verbindungen identifiziert werden, die in der Lage sind, in CYP106A2 einen Typ-I Shift zu induzieren, da dies bereits einen ersten Hinweis auf einen möglichen Cytochrom P450 abhängigen Substratumsatz liefert und weiterhin die Bestimmung der Bindungskonstanten zum Enzym erlaubt. Da die Ausbildung eines Typ-I Spektrums zwar eine gute, aber nicht zwingende Voraussetzung für einen erfolgreichen Umsatz darstellt, sollte weiterhin ein *in vitro* Rekonstitutionsassay zum Einsatz kommen, in dem die einzelnen Verbindungen in Gegenwart von CYP106A2, der heterologen Redoxpartner (Adx_{4-108} , AdR) und eines NADPH regenerierenden Systems auf einen positiven Umsatz getestet und anschließend mittels HPLC analysiert werden können. Daraufhin sollten kinetische Analysen zur Ermittlung der Enzymaktivität von CYP106A2 gegenüber neu entdeckter Substrate folgen, um die korrespondierenden K_M - und V_{max} -Werte zu bestimmen.

Mit Hilfe von HPLC Messungen lässt sich zwar verifizieren, ob und wie viele Produkte entstehen, eine exakte Bestimmung der Struktur neu gebildeter Verbindungen ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Eine genaue Strukturbestimmung der erhaltenen Produkte sollte deshalb durch NMR-Spektroskopie erreicht werden. Für diese Analysemethode werden jedoch mg-Mengen der einzelnen Verbindungen benötigt, was eine Benutzung

gereinigter Proteine und den Zusatz des teuren Kofaktors NADPH für einen *in vitro* Substratumsatz in größerem Umfang sehr zeitaufwendig und kostspielig gestaltet. Aus diesem Grund sollte ein auf CYP106A2 basierender Ganzzellbiokatalysator etabliert werden, mit dessen Hilfe ein selektiver Substratumsatz ohne den Zusatz von externem NADPH ermöglicht werden kann. Dieses System sollte zum einen ausreichende Mengen der Produkte für NMR-spektroskopische Studien liefern und zum anderen eine erste Charakterisierung des Ganzzellsystems durch Bestimmung der CYP106A2 abhängigen Umsatzraten ermöglichen, um erste Grundlagen für einen möglichen biotechnologischen Einsatz von CYP106A2 zu schaffen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien und Enzyme stammten aus Standardbezugsquellen und waren von analytischer Reinheit.

2.1.1 Enzyme und Proteine

Die Reinigung von boviner AdR, bovinem Adx₄₋₁₀₈ und CYP106A2 aus rekombinanten *E. coli* Bakterien erfolgte in der Arbeitsgruppe durch Frau Katharina Bompais und Herrn Wolfgang Reinle nach (Sagara et al. 1993; Uhlmann et al. 1992; Lisurek et al. 2004).

2.1.2 Oligonukleotide

Tab. 2.1 Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Primer mit Verwendungszweck und Nukleotidsequenz. Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Nukleotidsequenz (Richtung 5'→ 3')
Bla_Eco_RBS	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von <i>LbADH</i> mit <i>EcoRI</i> -Schnittstelle und RBS	GAT CGA ATT CTT TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGT CTA ACC GTT TGG ATG GTA AGG TAG
Bla_sal	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von <i>LbADH</i> mit <i>Sall</i> -Schnittstelle	GAT CGT CGA CTA CTA TTG AGC AGT GTA GCC ACC GTC
KO_Pacl	Quickchange-Primer vorwärts zur Deletion der <i>Pacl</i> -Schnittstelle in pKMBm4	CAT TGA AAT AAA CAT TAA ATT AAT ATA TGA TGG AAT TG
KO_Pacl_2	Quickchange-Primer rückwärts zur Deletion der <i>Pacl</i> -Schnittstelle in pKMBm4	CAA TTC CAT CAT ATA TTA ATT TAA TGT TTA TTT CAA TG
MCS1a	Oligonukleotid 1 zur Herstellung einer neuen MCS für pSMF2	CTA GCT GAT GGA TAA ACT TGT TCA CTT AAT TAA ACT AGT ACG CGT GGT ACC GAG CTC TGT ACA GCA TGC GCG GCC GCC ATG
MCS1b	Oligonukleotid 2 zur Herstellung einer neuen MCS für pSMF2	GCG GCC GCG CAT GCT GTA CAG AGC TCG GTA CCA CGC GTA CTA GTT TAA TTA AGT GAA CAA GTT TAT CCA TCA G
Seq_Pacl	Sequenzierprimer vorwärts zur Überprüfung der <i>Pacl</i> Deletion in pKMBm4	GAA TTA GAT ATT TAA AAG TAT CAT ATC

MCS_Check_for	Sequenzierprimer vorwärts zur Überprüfung der MCS in pSMF2.1, pSMF2.1C, pSMF2.1CA und pSMF2.1CAA	TGA TGG ATA AAC TTG TTC ACT TAA TTA A
MCS_Check_rev	Sequenzierprimer rückwärts zur Überprüfung der MCS in pSMF2.1, pSMF2.1C, pSMF2.1CA und pSMF2.1CAA	GAC AGG TAT CCG GTA AGC GG
106A2_BM_a	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von CYP106A2 mit <i>SpeI</i> -Schnittstelle und RBS	ACT AGT AAA TCA AGG AGG TGA ATA TAC AAT GGA AGA AGT TAT TGC AGT AAA AG
106A2_BM_b	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von CYP106A2 mit <i>MluI</i> -Schnittstelle	ACG CGT TAC ATG CGG CTT GCC TTA AGC GGT
Adx_BM_a2	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Adx mit <i>SacI</i> -, <i>BsrGI</i> -Schnittstelle und RBS	GAG CTC TGT ACA AAT CAA GGA GGT GAA TAT ACA ATG TCT TCT TCT GAA GAT AAA ATA ACA GTC
Adx_BM_b	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von Adx mit <i>SphI</i> -Schnittstelle	GCA TGC TAT GGT ACT CGA ACA GTC ATA TTG

2.1.3 Vektoren

Der *Bacillus megaterium* Shuttle-Vektor pKMBm4 wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn (TU Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Die Plasmidkarten der in dieser Arbeit erstellten Expressionsvektoren sind in Abb. 3.31 und im Anhang unter 6.1 dargestellt.

Tab. 2.2 Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Klonierungs- und Expressionsvektoren.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pCR4 [®] Blunt-TOPO [®]	Klonierungsvektor für <i>E. coli</i> , Kan ^r , Ap ^r	Invitrogen (2010)
pBTacLbADH	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , LbADH, Ap ^r	IBT 2, Jülich
pBarTwin	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , AdR (<i>Nde</i> I/ <i>Kpn</i> I), Adx (<i>Kpn</i> I/ <i>Eco</i> RI), Ap ^r	Hannemann <i>et al.</i> (2006)
pBarTriple	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Insertion von LbADH (<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I) in pBarTwin, Ap ^r	Diese Arbeit
pACYC_FHH2.8	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , CYP106A2 (<i>Nco</i> I/ <i>Hind</i> III), Cm ^r	Hannemann <i>et al.</i> (2006)
0838499_AdR_Bmeg_pMK-RQ	Klonierungsvektor für <i>E. coli</i> , Insertion von AdR (<i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I) in pMK-RQ, Kan ^r	Geneart GmbH
pKMBm4	<i>Bacillus megaterium</i> Shuttle-Vektor, Ap ^r , Tc ^r	Stammen <i>et al.</i> (2010)

pSMF2	<i>Bacillus megaterium</i> Shuttle-Vektor, Deletion der <i>Pac</i> I site in pKMBm4, Ap ^r , Tc ^r	Diese Arbeit
pSMF2.1	<i>Bacillus megaterium</i> Shuttle-Vektor, Deletion der <i>Sph</i> I site und Insertion einer neuen MCS in pSMF2, Ap ^r , Tc ^r	Diese Arbeit
pSMF2.1C	<i>Bacillus megaterium</i> Shuttle-Vektor, Insertion von CYP106A2 (<i>Spe</i> I/ <i>Mlu</i> I) in pSMF2.1, Ap ^r , Tc ^r	Diese Arbeit
pSMF2.1CA	<i>Bacillus megaterium</i> Shuttle-Vektor, Insertion von AdR (<i>Kpn</i> I/ <i>Sac</i> I) in pSMF2.1C, Ap ^r , Tc ^r	Diese Arbeit
pSMF2.1CAA	<i>Bacillus megaterium</i> Shuttle-Vektor, Insertion von Adx (<i>Sac</i> I/ <i>Sph</i> I) in pSMF2.1CA, Ap ^r , Tc ^r	Diese Arbeit

2.1.4 Bakterienstämme

Tab. 2.3 Übersicht über die verwendeten *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
JM109	<i>F'</i> <i>traD36 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV44 e14⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i>	NEB (2010)
Top10	<i>F</i> ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen (2010)
Top10F'	<i>F'</i> { <i>lacI^q Tn10 (Tet^R)</i> } <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen (2010)

Der *Bacillus megaterium* Stamm MS941 wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn (TU Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

Tab. 2.4 Übersicht über die verwendeten *Bacillus megaterium* Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
ATCC 13368	Wildtyp	Rauschenbach <i>et al.</i> (1993)
ATCC 13368 K.O.	Mutante von ATCC 13368, <i>ΔCYP106A2</i>	Rauschenbach <i>et al.</i> (1993)
MS941	Mutante von DSM319, <i>ΔnprM</i>	Wittchen und Meinhardt (1995)

2.1.5 Kultivierung von Bakterien

2.1.5.1 Kultivierung von *E. coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* wurden Super Broth (SB)- und Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedien verwendet. Für Expressionen und *in vivo* Substratumsätze wurden die Medien entsprechend supplementiert. LB-Agarplatten wurden mit einer Konzentration von 1.5 % Agar-Agar verwendet. Zur Selektion wurden die Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol in einer Konzentration von 100 µg/ml bzw. 35 µg/ml eingesetzt.

2.1.5.2 Kultivierung von *Bacillus megaterium*

Zur Kultivierung von *Bacillus megaterium* wurde Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium und ein Komplexmedium bestehend aus Hefeextrakt (24 g), Soyton (12 g), Glycerin (4 ml), KH₂PO₄ (2.31 g), K₂HPO₄ (12.5 g) und destilliertem Wasser (1000 ml) verwendet. Für Expressionen und *in vivo* Substratumsätze wurden die Medien entsprechend supplementiert. LB-Agarplatten wurden mit einer Konzentration von 1.5 % Agar-Agar verwendet. Zur Selektion wurde das Antibiotikum Tetracyclin in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

2.1.6 Lagerung von Bakterien

E. coli und *Bacillus megaterium* Stämme wurden auf 1.5 %igen LB-Agarplatten, die falls nötig, mit den entsprechenden Antibiotika supplementiert waren, bei 4°C gelagert. Für die Langzeitlagerung der Bakterien wurde eine ÜN-Kultur, die mit den entsprechenden Antibiotika supplementiert war, 1:1 mit einer 87 %igen Glycerinlösung verdünnt und zu 1 ml in sterile Kryoröhrchen aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 Bioinformatische Methoden

2.2.1.1 Homologiemodell von CYP106A2 und Substratdocking

Für molekulare Docking-Kalkulationen wurde ein von Lisurek *et al.* erstelltes Homologiemodell von CYP106A2 verwendet (Lisurek *et al.* 2008). Das Docking der Substrate 17α-Methyltestosteron und Abietinsäure erfolgte in Kooperation mit Matthias Dietzen am

Max-Planck-Institut für Informatik an der Universität des Saarlandes unter Verwendung des Dockingprogramms FlexX (Rarey et al. 1997; Rarey et al. 1996).

2.2.1.2 Bestimmung des Codon Adaptation Index (CAI)

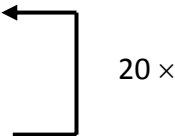
Um die Anpassungsfähigkeit der codon usage der cDNA-Sequenzen von AdR, Adx und CYP106A2 auf die codon usage des Expressionswirts *Bacillus megaterium* zu untersuchen, wurde der jeweilige Codon Adaptation Index (CAI) bestimmt. Hierzu wurde das Programm JCat (Java Codon Adaptation Tool) verwendet (Grote et al. 2005), wobei ein CAI von 1 einer optimalen codon usage entspricht.

2.2.2 Gentechnische Manipulationen

Alle gentechnischen Arbeiten wurden, sofern nicht anders beschrieben, nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook und Russell 2001). Die verwendeten Restriktionsendonukleasen stammten von Promega und New England BioLabs Inc. und wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Deletion der *Pac* I Schnittstelle im Plasmid pKMBm4 erfolgte nach dem Protokoll des QuikChange™ Site directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase (Stratagene) und dem entsprechendem Inkubationspuffer in einem PTC-200 Thermocycler (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) nach folgendem PCR-Programm:

1. 95°C für 3 min
 2. 95°C für 1 min
 3. 55°C für 1 min
 4. 72°C für 2 min/kb
 5. 4°C for ever
- 

2.2.2.2 Konstruktion einer neuen Multiple Cloning Site (MCS)

Zur Herstellung einer neuen MCS für das Plasmid pSMF2 wurden jeweils 5 pmol der Primer MCS1a und MCS1b für 5 min bei 95°C in einem Wasserbad denaturiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die resultierende doppelsträngige DNA wurde anschließend in den Vektor pSMF2 ligiert. Die verwendeten Primer wurden hierbei so

gewählt, dass der *Sph I* Überhang nach erfolgreicher Ligation nicht mehr geschnitten werden konnte.

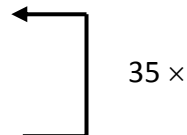
2.2.2.3 Amplifikation von Genen

Die gewünschten Gene wurden mittels PCR mit unterschiedlicher Plasmid-DNA als Template und den entsprechenden Primern amplifiziert. Zur Amplifikation wurde die Phusion DNA Polymerase (Finnzymes, Vantaa, Finnland) verwendet. Ein PCR-Ansatz (50 μ l) war wie folgt zusammengesetzt:

- 5.0 μ l Template DNA (1 ng/ μ l)
- 10.0 μ l Puffer HF (5x)
- 2.0 μ l dNTPs (5 mM)
- 5.0 μ l Vorwärtsprimer (10 μ M)
- 5.0 μ l Rückwärtsprimer (10 μ M)
- 0.5 μ l Phusion Polymerase (2 U/ μ l)
- 22.5 μ l ddH₂O

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 98°C für 60 s
2. 98°C für 10 s
3. 60°C für 35 s
4. 72°C für 30 s
5. 72°C für 10 min
6. 4°C for ever



2.2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten und Ligation

Nach der Amplifikation wurden die entsprechenden PCR-Produkte mit Hilfe des „NucleoSpin Extract 2 in 1“ Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus einem Agarosegel isoliert und anschließend in den pCR4Blunt-TOPO-Vektor (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) kloniert. Nach der Zwischenklonierung wurden die Fragmente über die in der PCR generierten Schnittstellen ausgeschnitten, einem erneuten Reinigungsschritt unterzogen und mit dem FastLink™ DNA Ligation Kit (Epicentre, Madison, WI, USA) in die Expressionsvektoren ligiert.

Die Ligation erfolgte in einem PTC-200 Thermocycler (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) mit Hilfe des folgenden Programms:

1. 16°C für 15 min
2. 20°C für 15 min
3. 70°C für 15 min
4. 4°C for ever

Das Verhältnis von Vektor:Insert betrug hierbei jeweils 1:5. Eine Liste der erstellten Plasmide ist in Tab. 2.2 zu finden.

2.2.2.5 Plasmidisolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem Kit Nucleobond Plasmid Purification AX 100 bzw. mit dem Kit NucleoSpin Plasmid QuickPure der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der aus der Plasmidpräparation erhaltenen DNA erfolgte spektrophotometrisch mit Hilfe des Spektralphotometers UV-2101 PC der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan). Die zu vermessende DNA wurde 1:100 mit dH₂O verdünnt und ihre Absorption im Bereich von 200 nm bis 300 nm aufgezeichnet. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Somit lässt sich die Konzentration jeder Probe berechnen.

2.2.2.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Zwischenklonierungsvektoren und der Expressionsvektoren erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland).

2.2.2.8 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen und Transformation

Die Herstellung chemisch kompetenter bzw. elektrokompenter *E. coli* Zellen erfolgte nach Sambrook *et al.* (Sambrook und Russell 2001). Zur Bestimmung der Kompetenz wurden die Zellen mit Test-DNA (pUC19), die eine Ampicillinresistenz codiert, transformiert und schließlich auf einer LB_{Amp.}-Agarplatte ausplattiert. Für Zwischenklonierungen wurden *E. coli* Top 10 Zellen verwendet. Die Transformation von *E. coli* Top 10 bzw. Top 10 F' bei

Klonierungsschritten erfolgte mittels Elektroporation, da mit ihr eine deutlich höhere Transformationseffizienz erreicht wird (Fregel et al. 2008). Für die heterologe Proteinexpression wurden *E. coli* JM109 Zellen mit Hilfe der Hitzeschockmethode transformiert.

2.2.2.9 Protoplastenpräparation und Transformation von *Bacillus megaterium*

50 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer ÜN-Kultur von *Bacillus megaterium* angeimpft und bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 1.0 wurden die Zellen bei 5000 Upm, 4°C für 15 min zentrifugiert und das erhaltene Zellpellett wurde anschließend in 5 ml SMMP-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Lysozym (10 mg/ml in SMMP-Puffer) wurden die Zellen bei 37°C inkubiert und die Protoplastenbildung unter dem Mikroskop kontrolliert. Nachdem 80-100 % der Zellen als Protoplasten vorlagen, wurden diese bei 3000 Upm, RT für 10 min zentrifugiert und das Sediment in 5 ml SMMP-Puffer resuspendiert und einem zweiten Zentrifugationsschritt unterzogen. Das erhaltene Zellpellet wurde erneut in 5 ml SMMP-Puffer resuspendiert und mit 750 µl einer 87 %igen Glycerinlösung versetzt. Die protoplastierten Zellen wurden zu 500 µl aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden 500 µl protoplastierte *Bacillus megaterium*-Zellen mit 5 µg Plasmid-DNA (gelöst in 20 µl SMMP-Puffer) versetzt und anschließend zu 1.5 ml einer PEG-P-Lösung gegeben und für 2 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml SMMP-Puffer wurden die Zellen bei 3000 Upm, RT für 10 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abdekantiert. Das erhaltene Pellet wurde in 500 µl SMMP-Puffer resuspendiert und bei 30°C für 45 min im Thermomixer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) ohne Schütteln und anschließend bei 30°C für 45 min bei 300 Upm inkubiert. Die transformierten Zellen wurden anschließend vorsichtig mit 3.5 ml CR5-Topagar gemischt und auf LB-Agarplatten gegeben, die für die Selektion 10 µg/ml Tetracyclin enthielten. Die so erhaltenen Agarplatten wurden bei 37°C, ÜN inkubiert. Transformierte Kolonien wurden anschließend erneut auf LB-Agarplatten ausgestrichen, bei 37°C, ÜN inkubiert und schließlich bei 4°C gelagert.

Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer ist im Anhang unter 6.2 zu finden.

2.2.3 Proteinanalysen

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Aliquote von *Bacillus megaterium* Zellsuspensionen wurden mit Komplexmedium auf eine OD₅₇₈ von 1 (1x 10⁹ Zellen) eingestellt und für 15 min bei 10000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die Zellpellets wurden in 1 ml Lysepuffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mg/ml Lysozym, 20 mM EDTA, 0.1 µg/ml PMSF) resuspendiert und bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 15 min bei 10000 g zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile abzutrennen. 100 µl des Zellysats wurden mit 100 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 100°C gekocht. 10 µl dieser Lösung wurde für die anschließende Analyse verwendet. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in 15 %igen denaturierenden Polyacrylamid-Gelen nach Laemmli (Laemmli 1970) in einer vertikalen Hoefer Mighty-Small-Mini-Gel-Apparatur (Amersham Pharmacia Biotech) bei 20 mA durchgeführt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch Färbung der Gele mit Coomassie Blue R250.

2.2.3.2 Western-Blot-Analyse

Für Western-Blot-Analysen wurden die Proteine zunächst mittels SDS-PAGE (vgl. 2.2.3.1) aufgetrennt und anschließend im Semidry-Verfahren innerhalb von 45 min bei 10 mA auf eine Nitrocellulose-Membran (Biorad, Richmond, CA, USA) übertragen (Towbin et al. 1992). Die Membran wurde über Nacht mit 3%iger Magermilchpulverlösung versetzt, um unbesetzte Bindungsstellen der Membran zu blockieren. Der Blot wurde zunächst für 2 h mit polyklonalen Primärantikörpern gegen CYP106A2, AdR bzw. Adx (jeweils 1:1000 verdünnt) inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit goat antirabbit IgG Sekundärantikörper (1:2000 verdünnt in PBS) (Dako, Glostrup, Dänemark) inkubiert, der mit Meerrettich-Peroxydase gekoppelt war. Als Inkubationspuffer wurde 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.1 % Tween 20 verwendet. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der 4-Chlor-1-naphtol-Farbreaktion.

2.2.4 Spektroskopische Methoden

2.2.4.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte einer *E. coli*-Bakterienkultur erfolgte durch Messung der Absorption bei 600 nm (OD_{600}). Die optische Dichte einer *Bacillus megaterium*-Bakterienkultur wurde durch Messung der Absorption bei 578 nm (OD_{578}) bestimmt.

2.2.4.2 CO-Differenzspektroskopie

CO-Differenzspektren wurden an einem Zweistrahlphotometer UV2101PC der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) aufgenommen. Die Aufnahme von CO-Differenzspektren erfolgte nach der Methode von Omura und Sato (Omura und Sato 1964). Für die Konzentrationsbestimmung wurde das gereinigte Protein 1: 40 mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7.4) verdünnt und eine Spatelspitze Natriumdithionit ($Na_2S_2O_4$) zugegeben, um das Cytochrom zu reduzieren. Für die P450-Konzentrationsbestimmung in *Bacillus megaterium*-Lysaten wurde das Natriumdithionit direkt zur Lysatlösung gegeben. In beiden Fällen erfolgte eine anschließende Aufteilung der Probe in zwei Fraktionen. Eine Fraktion diente als Referenz, die andere wurde 1 min mit Kohlenstoffmonoxid begast und schließlich ein Differenzspektrum gemessen.

2.2.4.3 Typ I-Differenzspektroskopie

Die Aufnahme Substrat-induzierter Typ I-Differenzspektren erfolgte mit Hilfe des Spektralphotometers UV-2101PC der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) nach Schenkman und Jansson (Schenkman und Jansson 1998). Die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 417 nm (low-spin Zustand) zu kleineren Wellenlängen (high-spin Zustand) wird hierbei durch die Verdrängung des Wassers von der sechsten Koordinationsstelle des Häm-Eisens durch das Substrat ausgelöst (Denisov et al. 2005). Für die Aufnahme der Spektren wurden Tandem-Küvetten verwendet (vgl. Abb. 2.1). In den Kammern P_2 und R_2 befand sich eine 10 μ M Lösung von CYP106A2 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.4), in den Kammern P_1 und R_1 lediglich 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.4). Schließlich wurde eine 100 μ M Substratlösung zu den Kammern R_1 und P_2 gegeben und nach einer Inkubationszeit von 25 min ein Spektrum gemessen (Jefcoate 1978).

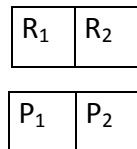


Abb. 2.1 Schema der verwendeten Tandem-Küvetten

2.2.4.4 Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D

Die Dissoziationskonstante K_D des Substrats zum Enzym wurde ebenfalls mit Hilfe von Typ I-Differenzspektren ermittelt. Zur Bestimmung der Konstanten wurden Tandem-Küvetten verwendet, die eine 10 μM Lösung von CYP106A2 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.4) enthielten und mit steigenden Konzentrationen an Substrat versetzt wurden (vgl. Abb. 2.1). Zwischen jeder neuen Konzentrationszugabe lagen 25 min. Die Dissoziationskonstante K_D wurde durch Auftragung der Substratkonzentration gegen die Δ Absorptionswerte ($A(\text{high-spin Zustand}) - A(\text{low-spin Zustand})$) und anschließender hyperbolischer Regression ($f(x) = y_0 + ax/(b + x)$) mit dem Programm Origin (OriginLab Corporation, MA, USA) bestimmt.

2.2.4.5 NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme von NMR-Spektren erfolgte durch Herrn Dr. Josef Zapp (Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken) an einem DRX 500 NMR-Spektrometer der Firma Bruker (Karlsruhe, Deutschland). NMR-Spektren wurden in CDCl_3 oder CD_3OD aufgenommen. Chemische Verschiebungen wurden in parts per million (ppm) auf der δ -Skala relativ zu den Lösemittelpeaks von CH_3OH ($\delta_{\text{H}} = 4.84$ ppm und $\delta_{\text{C}} = 49.05$ ppm) bzw. CHCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.27$ ppm und $\delta_{\text{C}} = 77.0$ ppm) angeben. ^{13}C Multiplizitäten wurden mit Hilfe der DEPT-135 Pulssequenz ermittelt. Alle Peakzuweisungen wurden mit 2D NMR-, ^1H , ^1H -COSY-, HSQC-, HMBC- und NOESY-Spektren bestätigt.

2.2.5 CYP106A2 abhängiger *in vitro* Substratumsatz

Die CYP106A2 abhängigen *in vitro* Substratumsätze wurden in einem Volumen von 500 μl in 50 mM HEPES-Puffer, 0.05% Tween 20, pH 7.4 durchgeführt. Die verwendeten Reaktionsansätze enthielten jeweils ein NADPH-regenerierendes System (5 mM Glucose-6-phosphat, 1 U Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, 1 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) sowie 10 μM Adx₄₋₁₀₈, 1 μM AdR, 0.5 μM CYP106A2 und 150 μM Substrat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μM NADPH gestartet und nach einer Reaktionszeit von 10 min bei 30°C im

Thermomixer mit 500 µl Chloroform gestoppt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10.000 Upm, 10 min, 4°C) und die Chloroformphase in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Nach erneuter Extraktion mit 500 µl Chloroform und Vereinigung der organischen Phasen wurden die Proben bis zur Trockne an der Vakuumzentrifuge eingedampft und bei –20°C gelagert.

2.2.6 Bestimmung der Enzymaktivität

Die Bestimmung der Enzymaktivität gegenüber den Substraten 17α-Methyltestosteron, Abietinsäure, 11-Keto-β-boswelliasäure (KBA) und 18β-Glycyrrhetinsäure (GA) erfolgte mit Hilfe eines rekonstituierten Systems in einem Volumen von 250 µl bei 30°C in 50 mM HEPES-Puffer, 0.05% Tween 20, pH 7.4. Das rekonstituierte System bestand jeweils aus 1 µM AdR, 10 µM Adx, 0.5 µM CYP106A2 und einem NADPH-regenerierenden System (1 mM MgCl₂ × 6H₂O, 5 mM Glucose-6-phosphat, 1 U Glucose-6-phosphat-dehydrogenase und 0.1 mM NADPH). Die einzelnen Substrate wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 40-900 µM 17α-Methyltestosteron, 40-600 µM Abietinsäure, 10-250 µM KBA und 10-500 µM GA. Die Reaktionszeit für Umsätze mit 17α-Methyltestosteron betrug 5 min, für Abietinsäure 10 min, für KBA 3 min und für GA 5 min. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 250 µl Chloroform gestoppt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10.000 Upm, 10 min, 4°C) und die Chloroformphase in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Nach erneuter Extraktion mit 250 µl Chloroform und Vereinigung der organischen Phasen wurden die Proben bis zur Trockne an der Vakuumzentrifuge eingedampft und bis zur HPLC-Analyse bei –20°C gelagert. Jede Reaktion wurde dreimal durchgeführt. Nach erfolgter HPLC-Analyse (vgl. 2.2.10), wurden die erhaltenen Daten durch hyperbolische Regression ($f(x) = y_0 + ax/(b + x)$) mit Origin (OriginLab Corporation, MA, USA) ausgewertet.

2.2.7 CYP106A2 abhängiger *in vivo* Substratumsatz

2.2.7.1 Substratumsatz in *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli* JM109 Zellen wurden mit den Plasmiden pACYC_FHH2.8 und pBarTwin kotransformiert (Hannemann et al. 2006) und auf LB-Agarplatten, die 100 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol enthielten, ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Für die Vorkultur wurden 50 ml SB-Medium (supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol) in einem 300 ml Erlenmeyerkolben mit einer *E.*

coli JM109 Kolonie, welche die Plasmide pACYC_FHH2.8 und pBarTwin enthielt, angeimpft und ÜN bei 150 Upm und 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur (200 ml SB-Medium, supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol) in einem 1 l Erlenmeyerkolben 1/100 mit der Vorkultur angeimpft und bei 180 Upm und 37°C inkubiert. Sobald die Kultur eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 1.0 erreichte, wurde die Expression von CYP106A2, AdR und Adx durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Der Hämprecursor δ -Aminolävulinsäure wurde zeitgleich in einer Endkonzentration von 0.5 mM zugesetzt. Nach einer 24 h Inkubationsperiode bei 180 Upm und 30°C wurde der Substratumsatz durch die Zugabe von Abietinsäure (500 µM), 17 α -Methyltestosteron (500 µM), GA (100 µM) bzw. KBA (100 µM) gestartet. Umsatzproben (500 µl) wurden nach 48 h durch die Zugabe von 500 µl Chloroform gestoppt, zentrifugiert (10.000 Upm, 10 min, 4°C) und die Chloroformphase in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Nach erneuter Extraktion mit 500 µl Chloroform und Vereinigung der organischen Phasen wurden die Proben bis zur Trockne an der Vakuumzentrifuge eingedampft und bis zur HPLC-Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.7.2 Substratumsatz in *Bacillus megaterium* ATCC 13368

Für die Vorkultur wurden 50 ml Komplexmedium mit einer *Bacillus megaterium* ATCC 13368 Kolonie angeimpft und ÜN bei 100 Upm und 30 °C in einem 300 ml Schikanenkolben inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur (50 ml Komplexmedium) 1/100 mit der Vorkultur inokuliert und bei 160 Upm und 30°C in einem 300 ml Schikanenkolben geschüttelt. Nach einer 24 h Inkubationsperiode wurde der Substratumsatz durch Zugabe von KBA (100 µM), GA (100 µM), Abietinsäure (100 µM) bzw. 17 α -Methyltestosteron (500 µM) gestartet. Proben (500 µl) zur Untersuchung des Substratumsatzes wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch die Zugabe von 500 µl Chloroform gestoppt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10.000 Upm, 10 min, 4°C) und die Chloroformphase in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Nach erneuter Extraktion mit 500 µl Chloroform und Vereinigung der organischen Phasen wurden die Proben bis zur Trockne an der Vakuumzentrifuge eingedampft und bis zur HPLC-Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.7.3 Substratumsatz in *Bacillus megaterium* MS941

Protoplastierte *Bacillus megaterium* MS941 Zellen wurden zunächst mit den entsprechenden Expressionsplasmiden (vgl. Tab. 2.2) transformiert (vgl. 2.2.2.9) (Barg et al. 2005) und auf

Agarplatten, die 10 µg/ml Tetracyclin enthielten, ausgestrichen und bei 37°C ÜN inkubiert. Für die Vorkultur wurde 50 ml Komplexmedium (supplementiert mit 10 µg/ml Tetracyclin) in einem 300 ml Schikanenkolben mit einer tetracyclinresistenten *Bacillus megaterium* MS941 Kolonie angeimpft und ÜN bei 100 Upm und 30°C geschüttelt. Anschließend wurde die Hauptkultur (50 ml Komplexmedium, supplementiert mit 10 µg/ml Tetracyclin) 1/100 mit der Vorkultur inokuliert und bei 160 Upm und 30°C in einem 300 ml Schikanenkolben inkubiert. Sobald die Kultur eine optische Dichte bei 578 nm (OD_{578}) von 0.4 erreichte, wurde die rekombinante Expression der gewünschten Gene durch die Zugabe von 0.5 % (w/v) Xylose gestartet. Nach einer 24 h Expressionsperiode wurde der Substratumsatz durch Zugabe von KBA (100 µM), GA (100 µM), Abietinsäure (100 µM) bzw. 17 α -Methyltestosteron (500 µM) gestartet. Proben (500 µl) zur Untersuchung des Substratumsatzes wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch die Zugabe von 500 µl Chloroform gestoppt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10.000 Upm, 10 min, 4°C) und die Chloroformphase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach erneuter Extraktion mit 500 µl Chloroform und Vereinigung der organischen Phasen wurden die Proben bis zur Trockne an der Vakuumzentrifuge eingedampft und bis zur HPLC-Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.8 Large-scale Substratumsatz in *Bacillus megaterium*

Die Synthese der Reaktionsprodukte von Abietinsäure, 17 α -Methyltestosteron, KBA und GA im großen Maßstab zur anschließenden Strukturbestimmung mittels NMR erfolgte mit Hilfe des *Bacillus megaterium* Stammes ATCC 13368. Für die Vorkultur wurden 50 ml Komplexmedium mit einer *Bacillus megaterium* ATCC 13368 Kolonie angeimpft und ÜN bei 100 Upm und 30 °C in einem 300 ml Erlenmeyerkolben inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur (1000 ml Komplexmedium) 1/100 mit der Vorkultur inokuliert und bei 160 Upm und 30°C in einem 2 l Erlenmeyerkolben geschüttelt. Nach einer 24 h Inkubationsperiode wurde der Substratumsatz durch Zugabe von Abietinsäure (200 µM), 17 α -Methyltestosteron (500 µM), KBA (100 µM) bzw. GA (100 µM) gestartet. Nach 24 h (Im Fall von Methyltestosteron, KBA und GA) bzw. 48 h (Im Fall von Abietinsäure) wurden die Zellen für 20 min bei 4500 g abzentrifugiert und der Überstand zweimal mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zu Trockne eingedampft. Die Reinigung der Produkte erfolgte anschließend mittels Kieselgelchromatographie (vgl. 2.2.9).

2.2.9 Kieselgel-Chromatographie

Die erhaltenen Reaktionsrückstände (vgl. 2.2.8) wurden durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt, Deutschland) gereinigt. Zur säulenchromatographischen Trennung der Reaktionsprodukte von KBA wurde Hexan/Diethylether (1% Essigsäure) im Verhältnis 1/3 als Eluent eingesetzt, zur Trennung der Reaktionsprodukte von Abietinsäure Hexan/Ethylacetat im Verhältnis 7/3, zur Trennung der Reaktionsprodukte von GA Hexan/Ethylacetat (1% Essigsäure) im Verhältnis 4/6 und zur Trennung der Reaktionsprodukte von 17α -Methyltestosteron Hexan/Ethylacetat im Verhältnis 1/5. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelfolie (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Deutschland) überprüft. Saubere Produktfraktionen wurden anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft und mittels NMR-Spektroskopie analysiert (vgl. 2.2.4.5).

2.2.10 HPLC-Analyse

Die HPLC-Analysen wurden an einem 900er-System der Firma Jasco durchgeführt. Alle verwendeten Lösemittel waren von HPLC-Reinheit und das benötigte Wasser wurde zuvor mit der Milli-Q Biocel (Millipore, Bedford, MA, USA) gereinigt. Alle mobilen Phasen wurden vor Einsatz entgast. Zur Trennung der Substanzen wurde eine Nova Pak Nukleosil C₁₈ Säule (4 μ m, 3.9 x 150 mm) der Firma Waters (Milford, MA, USA) oder eine ec MN Nucleodor C₁₈ Säule (5 μ m, 4.0 x 125 mm) der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Die Detektion der Verbindungen erfolgte bei 254 nm bzw. für Substanzen mit 3-oxo- Δ^4 -Struktur bei 240 nm an einem 975 UV/Vis-Detektor der Firma Jasco. Als Fließmittel wurden Gemische aus Acetonitril/Wasser im Verhältnis 60/40 oder 40/60 und aus Methanol/Wasser (0.1 % TFA) im Verhältnis 75/25 oder 85/15 eingesetzt. Die Säulentemperatur wurde mit Hilfe eines Säulenofens der Firma Techlab konstant bei 40°C gehalten und die Fließmittelgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Die verwendeten Proben wurden in 200 μ l Acetonitril bzw. Methanol resuspendiert und anschließend vermessen.

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro* Charakterisierung neuer Substrate von CYP106A2

3.1.1 Potentielle Typ I-Shift induzierende Substrate von CYP106A2

Bereits in den späten 70er und frühen 80er Jahren wurden Untersuchungen zur Substratspezifität von CYP106A2 durchgeführt (Berg et al. 1979a; Berg und Rafter 1981; Berg 1982). Hierbei postulierten Berg *et al.*, dass CYP106A2 eine Vielzahl von 3-oxo- Δ^4 -Steroiden in 15 β -Position zu hydroxylieren vermag, aber 3 β -hydroxy- Δ^5 -, aromatische oder Ring A-reduzierte Steroide nicht umgesetzt werden (Berg et al. 1976). Allerdings war es Berg *et al.* nicht möglich, ein Substrat zu identifizieren, das einen Typ I-Shift in CYP106A2 induziert. Durch die Bindung eines Substrates im aktiven Zentrum eines Cytochrom P450 wird in den meisten Fällen ein sog. Typ I-Shift bzw. high-spin-Shift induziert. Hierbei wird das axial koordinierte Wassermolekül am Häm-Eisen durch das Substrat verdrängt, wodurch ein Übergang des Häm-Eisens vom sechsfachkoordinierten low-spin zum fünffachkoordinierten high-spin Zustand induziert wird (Jefcoate 1978; Schenkman und Jansson 1998). Dies führt im Differenzspektrum des Enzyms zu einem charakteristischen Absorptionsmaximum bei ~ 390 nm und einem Absorptionsminimum bei ~ 420 nm. Im Zuge meiner Diplomarbeit konnte ich erstmals neben dem von Herrn Michael Lisurek beschriebenen 3-oxo- Δ^4 -Steroid Cholestenon (Lisurek 2004), die Dihydroquinopimarsäure (Bleif et al. 2011a) und die pentacyclische Triterpensäure 11-Keto- β -boswelliasäure (KBA) als high-spin-Shift induzierende Substrate von CYP106A2 identifizieren (vgl. Abb. 3.1).

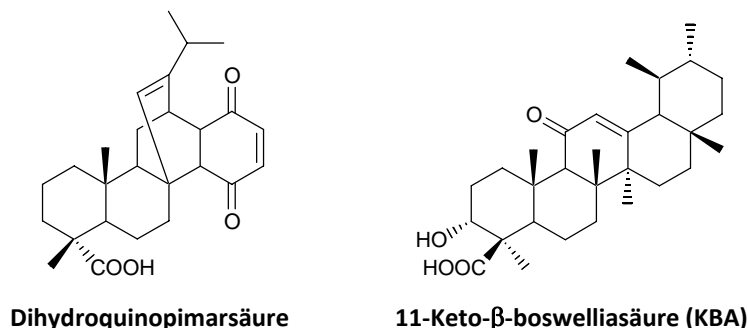
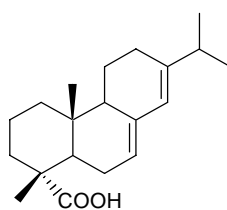


Abb. 3.1 Strukturformeln von Dihydroquinopimarsäure und 11-Keto- β -boswelliasäure (KBA).

Anhand von Strukturvergleichen mit diesen carbonsäurehaltigen Substraten von CYP106A2 sollten organische Verbindungen ausgewählt werden, die aufgrund ähnlicher Strukturmerkmale ebenfalls einen high-spin Shift mit der 15 β -Hydroxylase induzieren könnten, um weiterführende Einblicke in die Substratspezifität und Substratbindung von CYP106A2 zu erhalten. Hierzu wurde zunächst die zur Dihydroquinopimarsäure strukturell ähnliche Diterpenresinsäure Abietinsäure (vgl. Abb. 3.2) als potentiell Substrat von CYP106A2 ausgewählt. Sie enthält im Gegensatz zur Dihydroquinopimarsäure kein Keto-en-Motiv, so dass untersucht werden kann, ob dieses Strukturmotiv essentiell für die Bindung und den Umsatz mit CYP106A2 ist.



Abietinsäure

Abb. 3.2 Strukturformel des Diterpens Abietinsäure.

Desweiteren wurden vier zur KBA strukturverwandte pentacyclische Triterpensäuren (vgl. Abb. 3.3) ausgewählt, um herauszufinden, ob die Lokalisierung der Carbonsäurefunktion im Triterpenmolekülgerüst eine entscheidende Rolle bei der Substratbindung spielt.

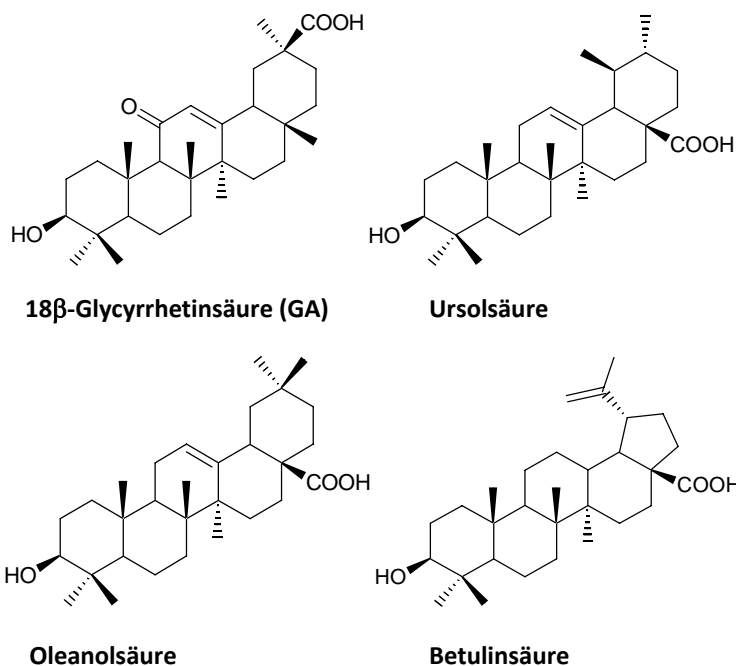


Abb. 3.3 Strukturformeln der pentacyclischen Triterpene 18 β -Glycyrrhetinsäure (GA), Ursolsäure, Oleanolsäure und Betulinsäure.

3.1.2 Typ-I Differenzspektroskopie

Um eine mögliche Substratbindung der in Abb. 3.2 und Abb. 3.3 aufgeführten Verbindungen im aktiven Zentrum von CYP106A2 nachzuweisen, wurden zunächst differenzspektroskopische Studien durchgeführt. Hierbei konnte mit allen ausgewählten pentacyclischen Triterpensäuren ein high-spin-Shift in CYP106A2 induziert werden (Abb. 3.4). Lediglich Abietinsäure war nicht in der Lage, das an der sechsten Position des Häm-Eisens gebundene Wassermolekül in CYP106A2 zu verdrängen.

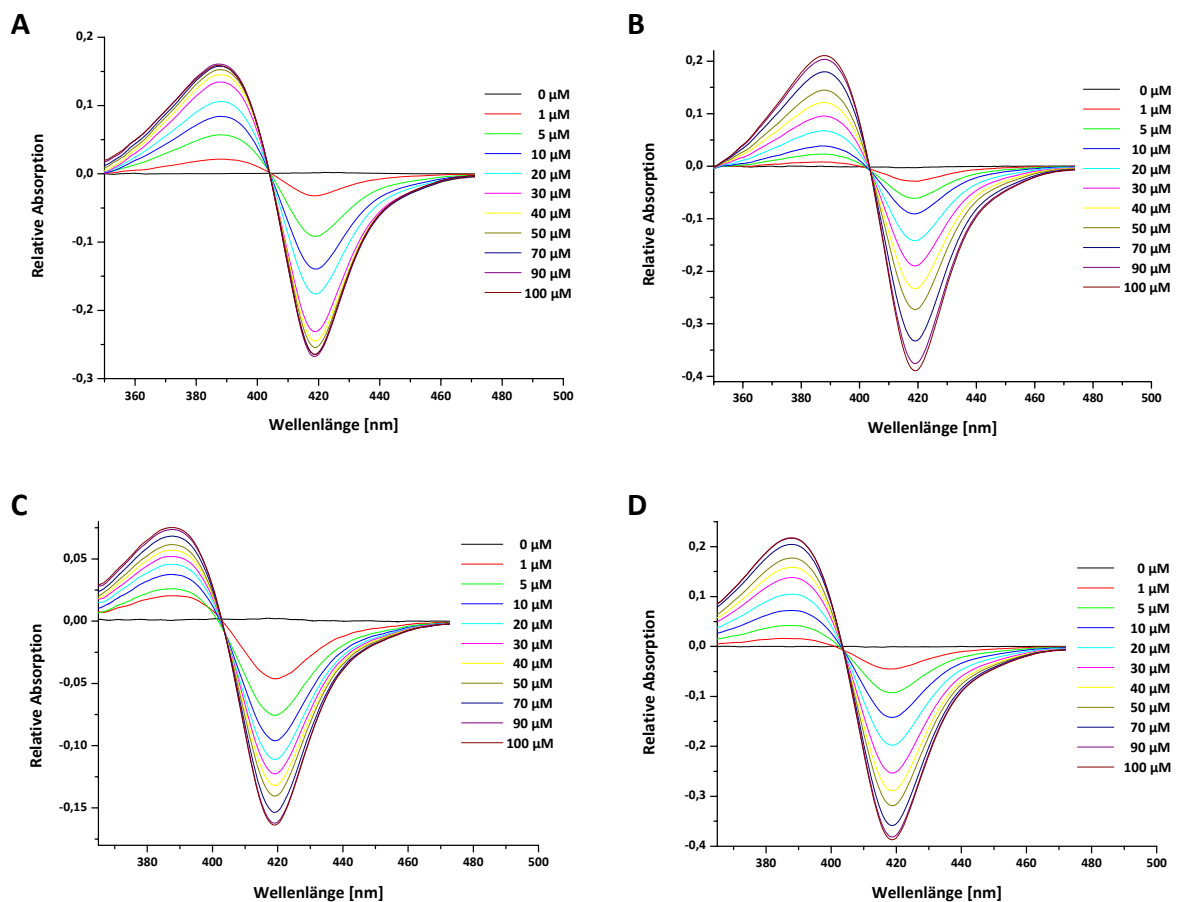


Abb. 3.4 Typ-I Differenzspektren von CYP106A2 mit A) Betulinsäure; B) 18β -Glycyrrhetinsäure; C) Oleanolsäure und D) Ursolsäure. $10\ \mu\text{M}$ CYP106A2 in $50\ \text{mM}$ Kaliumphosphatpuffer pH 7.4 wurden mit steigenden Mengen (1 - $100\ \mu\text{M}$) der jeweiligen Verbindung versetzt und die dazugehörigen Differenzspektren wurden nach einer Inkubationszeit von $25\ \text{min}$ bei RT aufgenommen.

Typ I-Differenzspektren eignen sich weiterhin zur Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_D) (Podust et al. 2007), die ein Maß für die Bindungsaffinität des Substrates zum Enzym darstellt. Durch Titration von CYP106A2 mit steigenden Mengen der Triterpensäuren (Abb. 3.4) und anschließender Auftragung der Δ Absorptionswerte (A_{max} -

A_{\min}) gegen die jeweilige Substratkonzentration ergaben sich die in Abb. 3.5 dargestellten Substratsättigungskurven. Die nach hyperbolischer Regression erhaltenen Dissoziationskonstanten (K_D) und Regressionskoeffizienten sind in Tab. 3.1 aufgelistet.

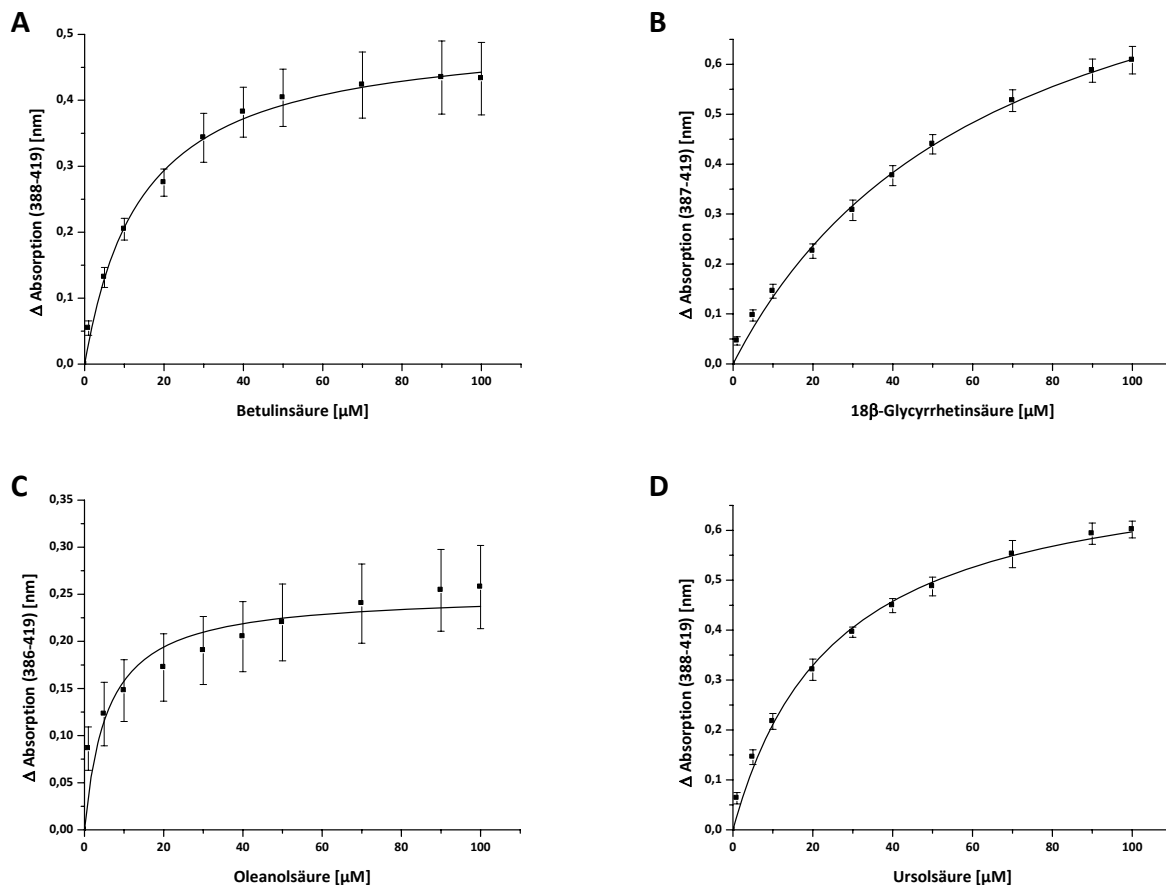


Abb. 3.5 Substratsättigungskurven von CYP106A2 mit A) Betulinsäure; B) 18 β -Glycyrrhetinsäure; C) Oleanolsäure und D) Ursolsäure. Die Daten wurden mittels hyperbolischer Regression $f(x) = y_0 + ax/(b + x)$ ausgewertet. Jede Titration wurde dreimal durchgeführt und die entsprechenden Mittelwerte bestimmt.

Tab. 3.1 Erhaltene Dissoziationskonstanten und Regressionskoeffizienten.

Verbindung	Dissoziationskonstante K_D [μM]	Regressionskoeffizient R^2
Betulinsäure	14.50 ± 0.51	0.995
18 β -Glycyrrhetinsäure	65.19 ± 1.01	0.996
Oleanolsäure	5.89 ± 0.25	0.927
Ursolsäure	25.44 ± 0.75	0.995

Oleanolsäure und Betulinsäure zeigten mit Dissoziationskonstanten von $5.89 \pm 0.25 \mu\text{M}$ bzw. $14.50 \pm 0.51 \mu\text{M}$ die stärkste Bindung zu CYP106A2. Für Ursolsäure ergab sich ein K_D von $25.44 \pm 1.01 \mu\text{M}$. Sie zeigte somit eine leicht höhere Affinität zu CYP106A2 als die bereits als

high-spin-Shift induzierendes Substrat identifizierte KBA ($K_D = 33.34 \pm 2.87 \mu\text{M}$). Die schwächste Bindung zu CYP106A2 wurde für 18 β -Glycyrrhetinsäure (GA) mit einer Dissoziationskonstanten von $65.19 \pm 0.51 \mu\text{M}$ ermittelt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Position der Carbonsäurefunktion im Triterpengerüst einen entscheidenden Einfluss auf die Stärke der Substratbindung im aktiven Zentrum von CYP106A2 ausübt.

3.1.3 *In vitro* Substratumsatz mit CYP106A2

Die Ausbildung eines Typ-I Shifts ist eine gute, aber nicht zwingende Voraussetzung für einen Substratumsatz. Mit Ausnahme von Cholestenon waren alle bisher identifizierten steroidalen Substrate von CYP106A2 nicht in der Lage, einen high-spin Shift zu induzieren, konnten aber durch das Enzym erfolgreich umgesetzt werden. Dieses Phänomen wurde erstmals mit CYP106A2 und seinem Substrat 11-Deoxycorticosteron (DOC) beschrieben (Simgen et al. 2000) und wurde später auch bei der Bindung von Substraten zu anderen Cytochromen P450 beobachtet (Sielaff und Andreesen 2005). Weiterhin ist es möglich, dass eine organische Verbindung ein Typ-I-Spektrum mit einem Cytochrom P450 ausbildet, sich von diesem jedoch nicht konvertieren lässt. Um herauszufinden, ob die pentacyclischen Triterpensäuren (vgl. 3.1.2), die bereits einen Typ-I-Shift mit CYP106A2 gezeigt haben, und ob Abietinsäure, die nicht in der Lage war, das an der sechsten Position des Häm-Eisens gebundene Wassermolekül in CYP106A2 zu verdrängen, von CYP106A2 umgesetzt werden, musste zunächst ein *in vitro*-Rekonstitutionsassay durchgeführt werden. Mit Hilfe dieses Assays sollte weiterhin die Produktbildung der bereits in meiner Diplomarbeit als Substrate von CYP106A2 identifizierten KBA und des 3-oxo- Δ^4 -Steroids 17 α -Methyltestosteron näher charakterisiert werden. Der *in vitro*-Rekonstitutionsassay beinhaltete CYP106A2, seine heterologen Redoxpartner Adx₄₋₁₀₈ und AdR sowie ein NADPH regenerierendes System. Die einzelnen Reaktionsansätze wurden anschließend mittels HPLC-Analyse auf erfolgreichen Umsatz untersucht.

Bei Einsatz von KBA als Substrat von CYP106A2 waren im HPLC-Chromatogramm ein Hauptprodukt (P2) sowie drei Nebenprodukte (P1, P3 und P4) zu erkennen (Abb. 3.6)(Bleif et al. 2011b). KBA eluierte bei einem Laufmittelgemisch von MeOH/H₂O (75/25) (0.1 % TFA) nach $t_R = 17.36 \pm 0.05$ min von der Säule. Die gebildeten Reaktionsprodukte besaßen Retentionszeiten von $t_R = 2.29 \pm 0.05$ min (P1), $t_R = 3.51 \pm 0.05$ min (P2), $t_R = 5.03 \pm 0.05$ min

(P3) und $t_R = 6.47 \pm 0.05$ min (P4). Betrachtet man die relative Produktbildung anhand der prozentualen Verteilung der Peakflächen und unter der Annahme, dass alle im Chromatogramm vorliegenden Verbindungen bei 254 nm etwa gleich stark absorbieren, so stellt man fest, dass KBA unter den gewählten Reaktionsbedingungen zu ca. 94 % von CYP106A2 umgesetzt werden konnte. Das Hauptprodukt P2 wurde zu 76.8 % gebildet, wohingegen die Nebenprodukte P1, P3 und P4 zu 12.3 %, 3.6 % und 1.4 % vorlagen.

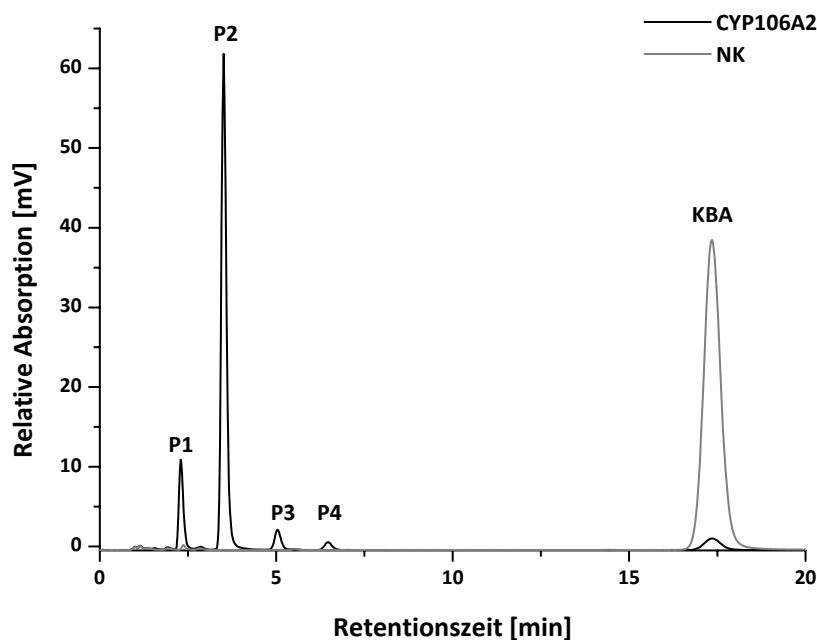


Abb. 3.6 HPLC-Chromatogramm von KBA nach *in vitro* Umsatz mit CYP106A2. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 500 μ l in 50 mM HEPES pH 7.4 in Gegenwart eines NADPH regenerierenden Systems für 10 min bei 30°C durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen waren 0.5 μ M CYP106A2; 1 μ M AdR und 10 μ M Adx₄.¹⁰⁸ Das Reaktionsgemisch wurde mit Chloroform extrahiert und die organische Phase anschließend bis zur Trockne eingedampft. Die isokratische HPLC-Analyse erfolgte mit MeOH/H₂O (75/25) (0.1 % TFA). Die Metaboliten wurden bei 254 nm detektiert. Die Negativkontrolle (NK) (ohne Zusatz von CYP106A2) ist in grau dargestellt.

Aufgrund der Tatsache, dass die neu entstandenen Produkte kleinere Retentionszeiten als das Substrat KBA besitzen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um mono- und/oder polyhydroxylierte Verbindungen von KBA handelt. Um dies eindeutig zu verifizieren, wurden NMR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.3.3). Hierbei konnte das Hauptprodukt P2 eindeutig als 15 α -Hydroxy-KBA identifiziert werden (siehe Abschnitt 3.3.3)(Bleif et al. 2011b). Die Struktur der Nebenprodukte (P1, P3 und P4) konnte mittels NMR-Spektroskopie leider nicht bestimmt werden (siehe Abschnitt

3.3.3). Die von CYP106A2 katalysierte Reaktion von KBA ist schematisch in Abb. 3.7 dargestellt.

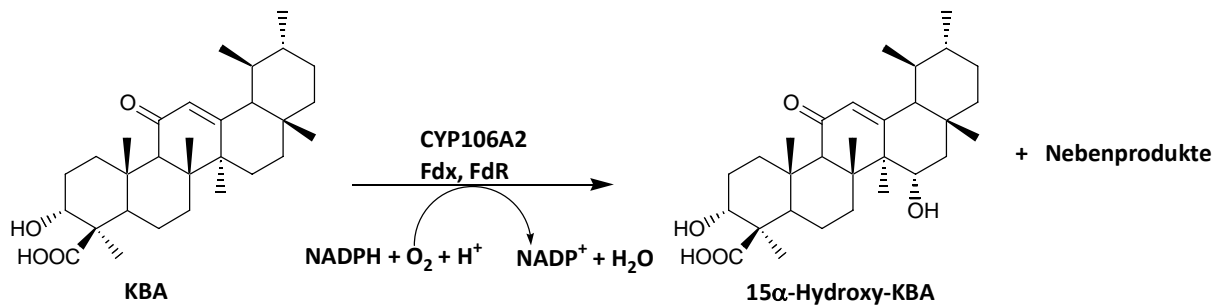


Abb. 3.7 CYP106A2 katalysierte Reaktion von KBA.

Der Reaktionsansatz von 17α -Methyltestosteron zeigte nach HPLC-Analyse neben dem Substratpeak bei $t_R = 2.73 \pm 0.05$ min einen weiteren prominenten Peak (P1) bei $t_R = 1.46 \pm 0.05$ min (Abb. 3.8). Das eingesetzte Substrat lag nach der Interaktion mit CYP106A2 zu 44.2 %, das neu gebildete Produkt P1 zu 55.8 % vor. Da das Cytochrom 106A2 bevorzugt 3-oxo- Δ^4 -Steroide in 15β -Position hydroxyliert, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem gebildeten Produkt P1 um 15β -Hydroxy- 17α -Methyltestosteron handelte. Diese Vermutung konnte durch NMR-Analysen bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.3.1).

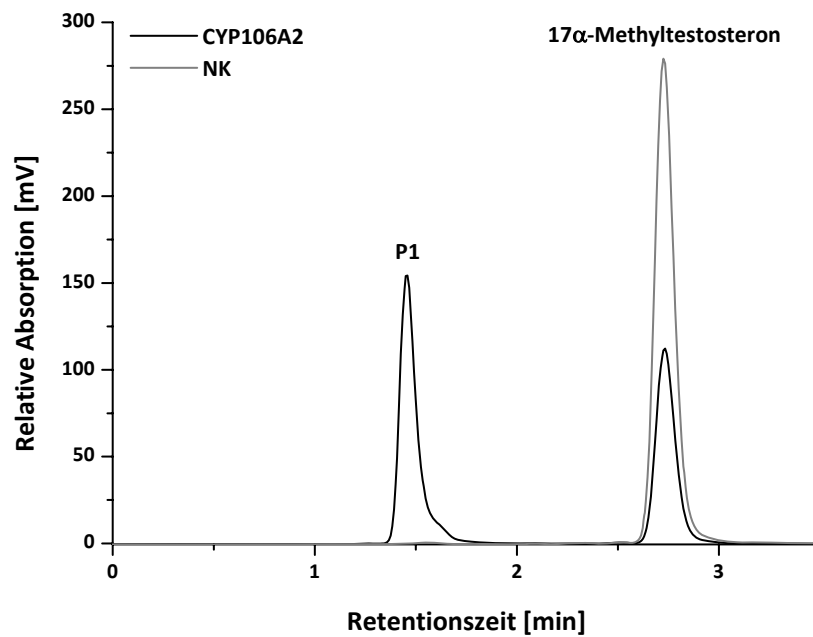


Abb. 3.8 HPLC-Chromatogramm von 17α -Methyltestosteron nach *in vitro* Umsatz mit CYP106A2. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 500 μ l in 50 mM HEPES pH 7.4 in Gegenwart eines NADPH regenerierenden Systems für 10 min bei 30°C durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen waren 0.5 μ M CYP106A2; 1 μ M AdR und 10 μ M Ad x_{4-108} . Das Reaktionsgemisch wurde mit Chloroform extrahiert und die organische Phase anschließend bis zur Trockne eingedampft. Die isokratische HPLC-Analyse erfolgte mit ACN/H₂O (60/40). Die Metaboliten wurden bei 240 nm detektiert. Die Negativkontrolle (NK) (ohne Zusatz von CYP106A2) ist in grau dargestellt.

Das Reaktionsschema der Hydroxylierung des 3-oxo- Δ^4 Steroids 17α -Methyltestosteron durch CYP106A2 ist in Abb. 3.9 dargestellt.

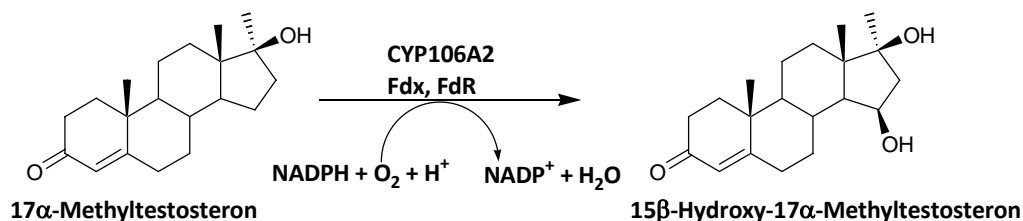


Abb. 3.9 CYP106A2 katalysierte Hydroxylierung von 17α -Methyltestosteron in Position 15.

Mit der pentacyclischen Triterpensäure 18β -Glycyrrhetinsäure (GA), die bereits einen high-spin Shift mit CYP106A2 gezeigt hatte, konnte ebenfalls ein Umsatz nachgewiesen werden. Nach der Interaktion mit CYP106A2 zeigte das HPLC-Chromatogramm von GA neben dem Substratpeak bei $t_R = 15.52 \pm 0.05$ min die Bildung eines Hauptproduktes P1, welches nach $t_R = 2.30 \pm 0.05$ min von der Säule retardierte, sowie eines Nebenproduktes P2 mit einer Retentionszeit t_R von 7.37 ± 0.05 min (Abb. 3.10). Betrachtet man die prozentuale Verteilung

der gebildeten Produkte, so lässt sich eindeutig erkennen, dass GA nach dem Umsatz mit CYP106A2 nur noch zu ca. 32 % vorlag. Das Hauptprodukt P1 ist hierbei zu ca. 65 %, das Nebenprodukt P2 zu ca. 3 % entstanden. In diesem Fall ist ebenfalls davon auszugehen, dass es sich bei den gebildeten Produkten um hydroxylierte Verbindungen der GA handelt. Tatsächlich konnte das Hauptprodukt P1 mit Hilfe von NMR-Spektroskopie zweifelsfrei als 7 β -Hydroxy-GA identifiziert werden (siehe Abschnitt 3.3.4). Das Nebenprodukt (P2) konnte mittels NMR-Spektroskopie leider nicht charakterisiert werden (siehe Abschnitt 3.3.4).

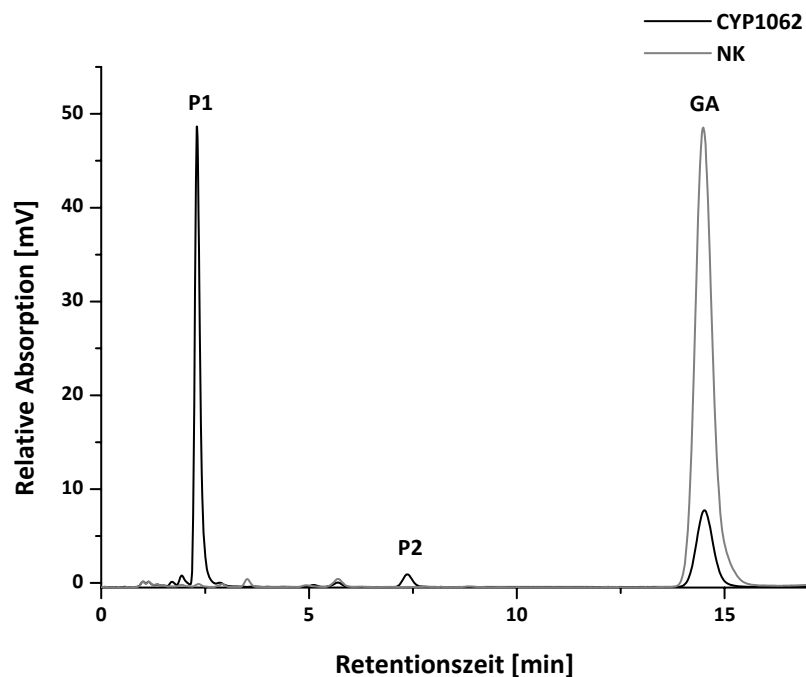


Abb. 3.10 HPLC-Chromatogramm von GA nach *in vitro* Umsatz mit CYP106A2. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 500 μ l in 50 mM HEPES pH 7.4 in Gegenwart eines NADPH regenerierenden Systems für 10 min bei 30°C durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen waren 0.5 μ M CYP106A2; 1 μ M AdR und 10 μ M Adx₄₋₁₀₈. Das Reaktionsgemisch wurde mit Chloroform extrahiert und die organische Phase anschließend bis zur Trockne eingedampft. Die isokratische HPLC-Analyse erfolgte mit MeOH/H₂O (75/25) (0.1 % TFA). Die Metaboliten wurden bei 254 nm detektiert. Die Negativkontrolle (NK) (ohne Zusatz von CYP106A2) ist in grau dargestellt.

Das Reaktionsschema zum Umsatz von GA durch CYP106A2 ist Abb. 3.11 zu entnehmen.

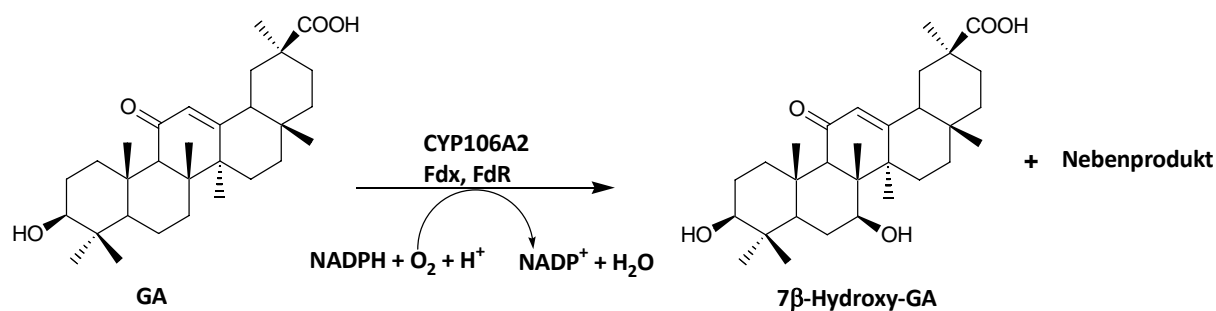


Abb. 3.11 Der durch CYP106A2 katalysierte Umsatz von GA.

Alle anderen pentacyclischen Triterpensäuren (vgl. 3.1.1) besitzen im Gegensatz zur KBA und GA leider kein Chromophor, welches ihre Detektion bei 254 nm erlaubt. Um trotzdem eine mögliche Produktbildung mit Hilfe von HPLC-Analysen nachzuweisen, wurde eine Detektion bei 210 nm mit einem Lösemittelgemisch, bestehend aus MeOH/H₂O (75/25) (0.1 % H₃PO₄), versucht. Allerdings war in diesem Fall die Eigenabsorption des verwendeten Lösemittels so stark, dass keine eindeutige Aussage über einen möglichen Umsatz gemacht werden konnte. Da eine eindeutige HPLC-Analyse für weiterführende *in vitro* Untersuchungen jedoch unabdingbar ist, wurde an dieser Stelle beschlossen, auf weitere Experimente mit diesen Verbindungen zu verzichten.

Abietinsäure, die das axial gebundene Wassermolekül am Häm-Eisen von CYP106A2 nicht verdrängen konnte und somit nicht in der Lage war, ein Typ-I Differenzspektrum mit dem Enzym auszubilden, konnte jedoch mit Hilfe des *in vitro*-Rekonstitutionsassays zu zwei Produkten konvertiert werden (Abb. 3.12). Das Substrat eluierte bei einem Laufmittelgemisch von MeOH/H₂O (85/15) (0.1 % TFA) nach $t_R = 10.10 \pm 0.05$ min von der Säule. Die Reaktionsprodukte besaßen Retentionszeiten von $t_R = 2.18 \pm 0.05$ min (P1) und 3.15 ± 0.05 min (P2). Anhand des HPLC-Chromatogramms ist ersichtlich, dass die Produkte zu 7.9 % (P1) bzw. 14.8 % (P2) gebildet wurden und somit in einem Verhältnis von ca. 2:1 (P2/P1) vorlagen. Die korrespondierenden Reaktionsprodukte konnten mittels NMR-Spektroskopie als 12 α (P2)- und 12 β (P1)-Hydroxyabietinsäure identifiziert werden (siehe Abschnitt 3.3.2) (Bleif et al. 2011a).

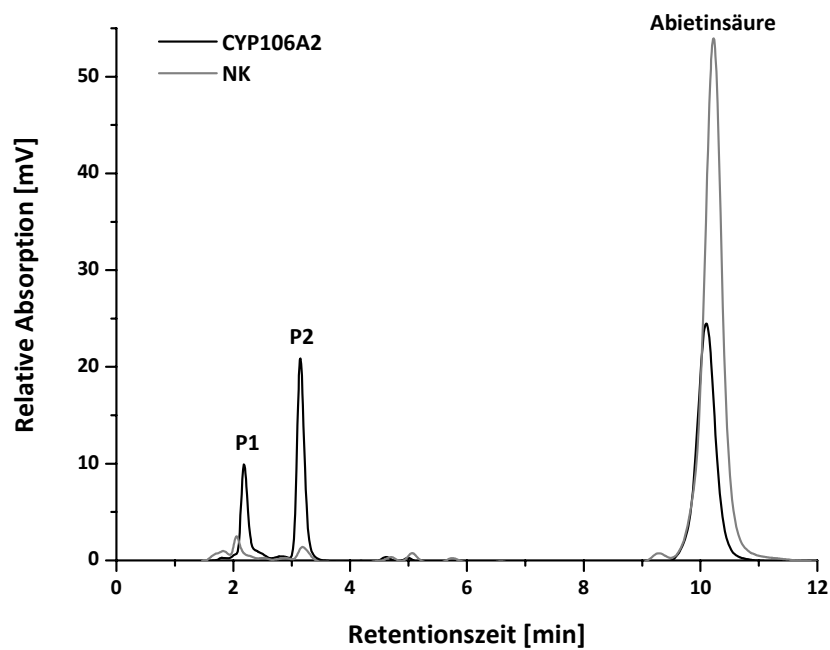


Abb. 3.12 HPLC-Chromatogramm von Abietinsäure nach *in vitro* Umsatz mit CYP106A2. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 500 μl in 50 mM HEPES pH 7.4 in Gegenwart eines NADPH regenerierenden Systems für 30 min bei 30°C durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen waren 0.5 μM CYP106A2; 1 μM AdR und 10 μM Adx₄₋₁₀₈. Das Reaktionsgemisch wurde mit Chloroform extrahiert und die organische Phase anschließend bis zur Trockne eingedampft. Die isokratische HPLC-Analyse erfolgte mit MeOH/H₂O (85/15) (0.1 % TFA). Die Metaboliten wurden bei 254 nm detektiert. Die Negativkontrolle (NK) (ohne Zusatz von CYP106A2) ist in grau dargestellt.

Während dieser Arbeit wurde somit erstmals gezeigt, dass CYP106A2 Diterpene des Abietan-Typs regioselektiv in Allylposition zu hydroxylieren vermag (Abb. 3.13) und konnte deshalb als erste bakterielle Cytochrom P450 Diterpenhydroxylase identifiziert werden (Bleif et al. 2011a).

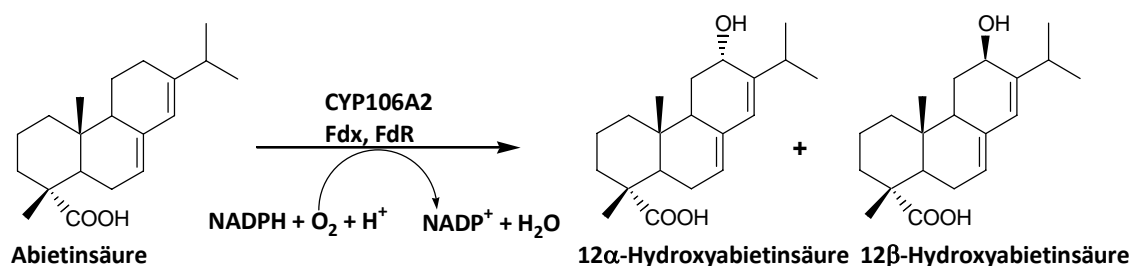


Abb. 3.13 Regioselektive Hydroxylierung von Abietinsäure in Position 12.

Die Vorhersage, Abietinsäure als potentielles Substrat aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zur Dihydroquinopimarsäure zu betrachten, konnte somit erfolgreich bestätigt werden.

3.1.4 Substratdocking

Alle molekularen Docking-Kalkulationen wurden von Matthias Dietzen am Max-Planck-Institut (MPI) für Informatik an der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Da Abietinsäure ebenso wie das 3-oxo- Δ^4 -Steroid 17 α -Methyltestosteron während der Bindung im aktiven Zentrum von CYP106A2 keinen high-spin Shift induziert, wurden mit beiden Substraten Docking-Experimente durchgeführt, um einen ersten Einblick in eine mögliche Bindung und Orientierung der Substrate im aktiven Zentrum von CYP106A2 zu erhalten.

Aufgrund der Tatsache, dass von CYP106A2 keine Kristallstruktur existiert, wurden alle Docking-Kalkulationen mit einem von Lisurek *et al.* entwickelten Homologie-Modell von CYP106A2 durchgeführt (Lisurek *et al.* 2008). Das Docking der Substrate Abietinsäure und 17 α -Methyltestosteron in das aktive Zentrum des Cytochroms P450 erfolgte mit Hilfe des Docking-Programms FlexX (Rarey *et al.* 1997; Rarey *et al.* 1996). Die besten Docking-Orientierungen für eine Hydroxylierung des Substrates Abietinsäure in α - bzw. β -Position am C-Atom C12 sind in Abb. 3.14 dargestellt. Hierbei lassen sich mögliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Säurefunktion des Substrates und den Seitenketten der Aminosäuren D295, E78 und R66 erkennen. Zusätzlich wird die Isopropylgruppe von Abietinsäure durch eine hydrophobe Zange, die aus den Leucinresten L291 und L239 zusammengesetzt ist, im aktiven Zentrum von CYP106A2 stabilisiert. Dieser Bindungsmodus des Substrates mit dichter Platzierung des C-Atoms C12 zur prosthetischen Häm-Gruppe des Proteins ist somit in sehr guter Übereinstimmung mit dem tatsächlich in *in vitro*-Umsätzen erhaltenen Hydroxylierungsmuster. Weiterhin konnten alle Aminosäuren (D295, L291, L239, E78 und R66), die eine mögliche Interaktion mit Abietinsäure eingehen, den sogenannten putativen Substraterkennungsstellen (substrate recognition sites, SRS) (Gotoh 1992) von CYP106A2 zugeordnet werden.

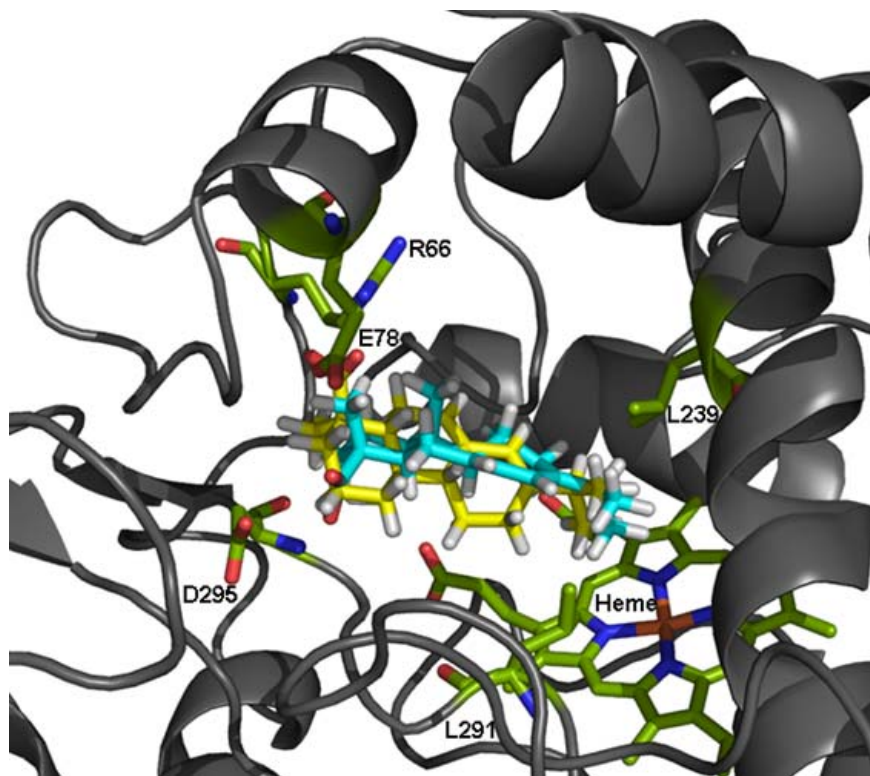


Abb. 3.14 Das aktive Zentrum von CYP106A2 mit den besten Docking-Orientierungen für eine Hydroxylierung des Substrates Abietinsäure in α - (gelb) bzw. β - (cyan) Position am C-Atom C12. Die prosthetische Häm-Gruppe, das Substrat und die Aminosäuren R66, E78, L239, L291 und D295 sind als Stabmodell dargestellt.

Allen P450 sind sechs dieser SRS gemein, die eine wesentliche Rolle in der Substratbindung und Katalyse spielen und wohl die variabelsten Regionen in der Proteinstruktur von Cytochromen P450 darstellen (Pylypenko und Schlichting 2004; Gotoh 1992; Denisov et al. 2005). Anhand des gedockten Komplexes von CYP106A2 mit dem Substrat Progesteron konnte Lisurek die Aminosäuren ableiten, die in CYP106A2 die SRSs bilden (Lisurek 2004). Mit Hilfe dieser Vorhersage, konnten die Aminosäuren, die möglicherweise mit Abietinsäure interagieren, den entsprechenden SRSs zugeordnet werden. Die Aminosäuren R66 und E78 sind in der SRS1 (B^{\prime} -Helix Region), L239 in der SRS4 (I-Helix) und L291 sowie D295 in der SRS5 (β 1-4) lokalisiert. Vergleicht man die beiden Orientierungen für eine Hydroxylierung des Substrates Abietinsäure in α - bzw. β -Position im aktiven Zentrum von CYP106A2, so fällt auf, dass der Ligand für eine Hydroxylierung in der β -Position um etwa 100° relativ zur Position des Liganden für die α -Hydroxylierung gedreht ist (Abb. 3.15, Abb. 3.14).

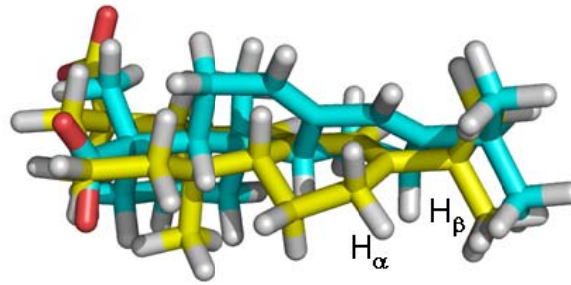


Abb. 3.15 Das Substrat Abietinsäure in den besten Docking-Posen für eine α - (gelb) bzw. β - (cyan) Hydroxylierung am C-Atom C12.

Diese Ligandenrotation führt im Vergleich zur Wechselwirkung des Liganden in α -Pose zu einem andersartigen Interaktionsmuster der Säurefunktion mit den Seitenketten des Proteinrückgrats. Für eine Hydroxylierung in der 12β -Position des Substratgerüsts ergeben sich bestmögliche Wechselwirkungen mit den Aminosäuren E78 und D295, während sich für eine 12α -Hydroxylierung bevorzugte Interaktionen mit den Aminosäuren R66 und E78 erkennen lassen. Weiterhin stellte sich die β -Pose als energetisch ungünstiger im Vergleich zur α -Pose heraus (Docking scores: -9.604 für α und -4.962 für β). Dieses Ergebnis ist somit in guter Übereinstimmung mit der in der *in vitro*-Reaktion erhaltenen geringeren Hydroxylierungsrate für 12β -Hydroxyabietinsäure (vgl. 3.1.3).

Im Fall von 17α -Methyltestosteron ergab sich nach Docking des Substrats in das aktive Zentrum von CYP106A2 für eine Hydroxylierung in 15β -Position des Steroidgerüsts die in Abb. 3.16 dargestellte Orientierung. Mögliche Wasserstoffbrücken werden durch eine Wechselwirkung der 17β -Hydroxylgruppe von Methyltestosteron mit der Seitenkette von T89 sowie der Ketogruppe in Position 3 des Steroidgerüsts mit der Aminosäure E78 ausgebildet. Somit scheint die Aminosäure E78 sowohl bei der Substratbindung von Abietinsäure als auch bei der Bindung von 17α -Methyltestosteron im aktiven Zentrum eine wichtige Rolle zu spielen. Die Platzierung von Methyltestosteron mit dem C-Atom C15 über dem Häm-Eisen ist ebenfalls konsistent mit der tatsächlich bestimmten Hydroxylierungsposition in 15β des Steroidgerüsts. Die Aminosäure T89 konnte der SRS1 (B'/C-Loop) von CYP106A2 zugeordnet werden.

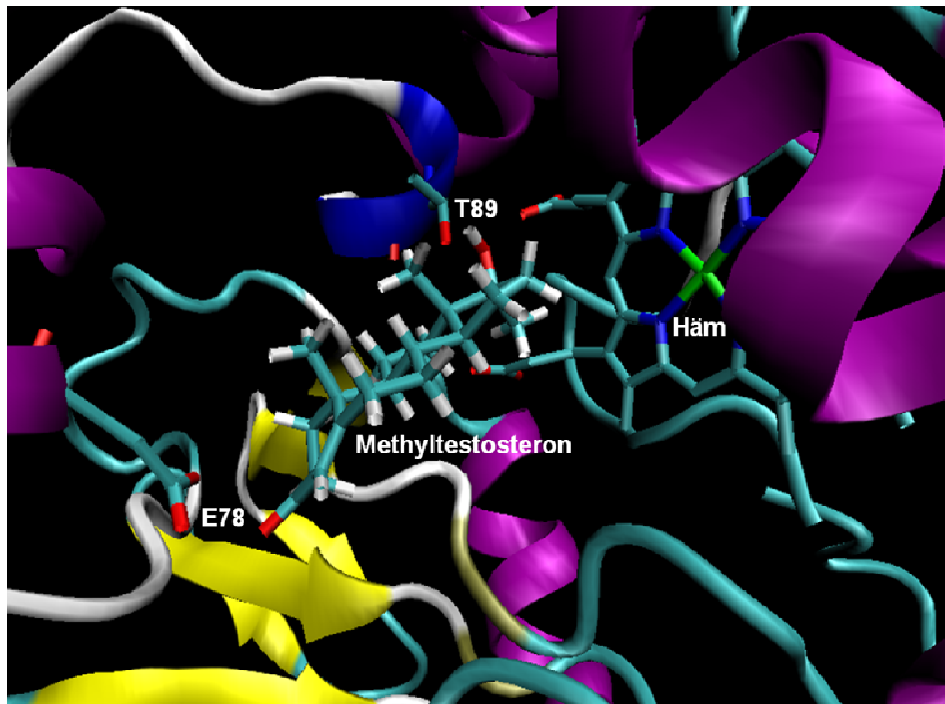


Abb. 3.16 Das aktive Zentrum von CYP106A2 mit der besten Docking-Orientierung für eine Hydroxylierung des Substrates 17 α -Methyltestosteron in β -Position am C-Atom C15. Die prosthetische Häm-Gruppe, das Substrat und die Aminosäuren E78 und T89 sind als Stabmodell dargestellt.

3.1.5 Katalytische Aktivität

Zur Ermittlung der Enzymaktivität von CYP106A2 gegenüber den Substraten 17 α -Methyltestosteron, Abietinsäure, 11-Keto- β -boswelliasäure (KBA) und 18 β -Glycyrrhetinsäure (GA) wurden kinetische Analysen durchgeführt. Die Bestimmung der Michaels-Konstanten (K_M) erfolgte mit gleichbleibenden Mengen von CYP106A2 und seiner heterologen Redoxpartner (AdR, Adx₄₋₁₀₈). Die einzelnen Substrate wurden in steigenden Konzentrationen zugesetzt, bis eine Substratsättigung des Enzyms erreicht wurde. Inkubationszeiten wurden so gewählt, dass auch bei geringen Substratkonzentrationen, das Substrat nicht gänzlich zu den Produkten abreagierte. Zur Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte wurden die Daten anschließend einer hyperbolischen Regression unterzogen.

17 α -Methyltestosteron wurde in Konzentrationen von 40-900 μ M zugegeben (Abb. 3.17 A). Die Inkubationszeit betrug 5 min bei 30°C. Hierbei ergab sich für die Hydroxylierung von Methyltestosteron in 15 β -Position ein K_M -Wert von $176 \pm 32 \mu$ M und ein V_{max} -Wert von 209 ± 12 nmol 15 β -Hydroxy-17 α -Methyltestosteron/nmol CYP106A2/min.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität von CYP106A2 gegenüber Abietinsäure erfolgte die Zugabe des Substrates in Konzentrationen von 40-600 μ M (Abb. 3.17 B). Die Inkubation

wurde bei 30°C für 10 min durchgeführt. Der V_{\max} -Wert konnte zu 22 ± 1 nmol Produkte/nmol CYP106A2/min und die Michaelis-Konstante K_M zu 113 ± 15 μM bestimmt werden (Abb. 3.17 B). Da Abietinsäure von CYP106A2 zu 12 α - und 12 β -Hydroxyabietinsäure konvertiert wird, wurde zum besseren Vergleich der Produktbildung für beide Hydroxylierungsprodukte die jeweilige Michaelis-Konstante sowie die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Das Enzym vollführte den Umsatz zu 12 α -Hydroxyabietinsäure mit einer Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) von 13.0 ± 0.5 nmol 12 α -Hydroxyabietinsäure/nmol CYP106A2/min und einer Michaelis-Konstanten (K_M) von 107 ± 13 μM . Die 12 β -Hydroxylierungsaktivität erreichte lediglich 57 % der 12 α -Hydroxylierungsaktivität. In diesem Fall betrug der V_{\max} -Wert 8.0 ± 0.4 12 β -Hydroxyabietinsäure/nmol CYP106A2/min und der K_M -Wert 123 ± 20 μM .

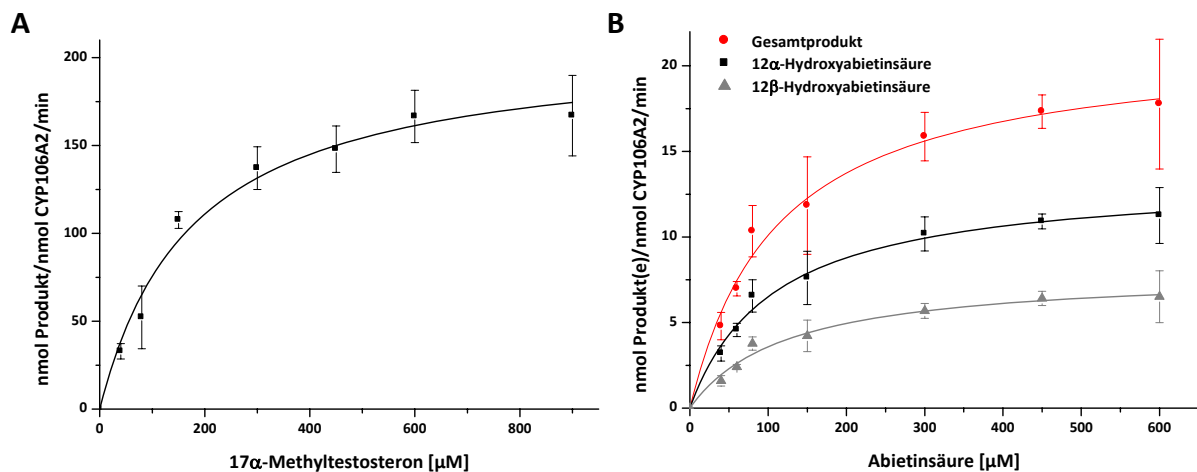


Abb. 3.17 Reaktionsgeschwindigkeit der Hydroxylierung von A) 17 α -Methyltestosteron und B) Abietinsäure durch CYP106A2. Die Reaktionen wurden in 250 μl HEPES (50 mM, pH 7.4) in Gegenwart eines NADPH regenerierenden Systems durchgeführt. Die verwendeten Enzymkonzentrationen waren 0.5 μM CYP106A2, 1 μM AdR und 10 μM Adx₄₋₁₀₈. Die Daten wurden mittels hyperbolischer Regression $f(x) = y_0 + ax/(b + x)$ ausgewertet. Jede Reaktion wurde dreimal durchgeführt und die entsprechenden Mittelwerte bestimmt. Gesamtprodukt = Summe aus 12 α - und 12 β -Hydroxyabietinsäure.

Zur kinetischen Analyse der Reaktion von CYP106A2 mit KBA wurde das pentacyclische Triterpen in Konzentrationen von 10-250 μM eingesetzt (Abb. 3.18 A). Die Inkubationszeit betrug hier 3 min bei 30°C. Das Enzym verrichtete den Umsatz zu den korrespondierenden Produkten mit einer Geschwindigkeit V_{\max} von 97 ± 5 nmol Produkte/nmol CYP106A2/min und einem K_M -Wert von 106 ± 12 μM (Bleif et al. 2011b).

Im Fall von GA wurden Konzentrationen des Substrates von 10-500 μM verwendet (Abb. 3.18 B) und die einzelnen Reaktionsansätze wurden für 5 min bei 30°C inkubiert. Der V_{\max} -

Wert konnte zu 35 ± 1 nmol Produkte/nmol CYP106A2/min und die Michaelis-Konstante K_M zu 78 ± 9 μM bestimmt werden.

In beiden Fällen wurde auf eine detaillierte Bestimmung der K_M - und V_{\max} -Werte der einzelnen Produkte verzichtet, da ihre genaue Identität teilweise nicht bestimmt werden konnte und es sich möglicherweise um Folgeprodukte (z.B. polyhydroxylierte Derivate) handeln könnte. In diesem Fall müsste eine zusätzliche kinetische Analyse der Folgereaktion durchgeführt werden.

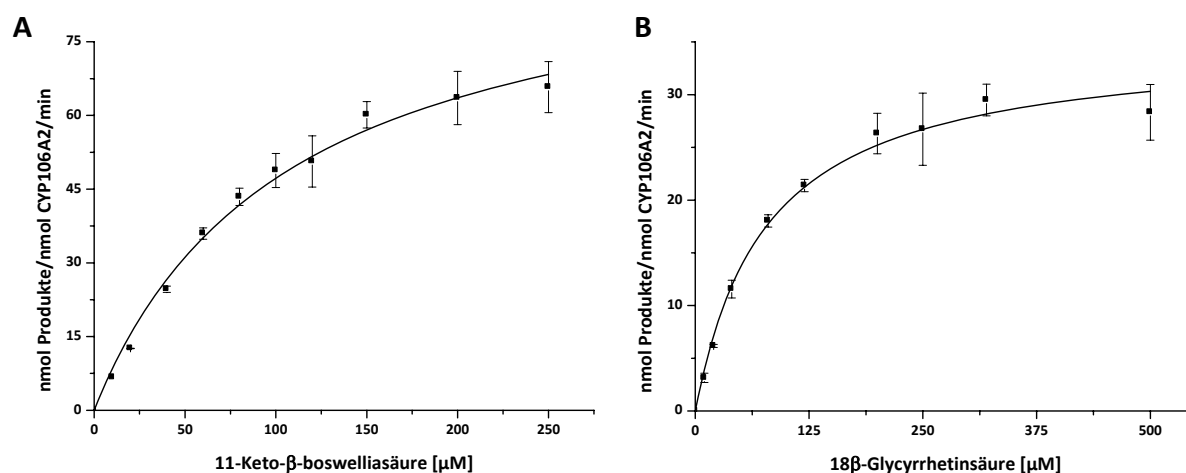


Abb. 3.18 Reaktionsgeschwindigkeit des Umsatzes von CYP106A2 mit A) 11-Keto-β-boswelliasäure und B) 18β-Glycyrrhetinsäure. Die Reaktionen wurden in 250 μl HEPES (50 mM, pH 7.4) in Gegenwart eines NADPH regenerierenden Systems durchgeführt. Die verwendeten Enzymkonzentrationen waren 0.5 μM CYP106A2, 1 μM AdR und 10 μM Adx₄₋₁₀₈. Die Daten wurden mittels hyperbolischer Regression $f(x) = y_0 + ax/(b + x)$ ausgewertet. Jede Reaktion wurde dreimal durchgeführt und die entsprechenden Mittelwerte bestimmt.

Zum besseren Vergleich der katalytischen Aktivitäten, wurden die erhaltenen Daten und Regressionskoeffizienten (R^2) in Tab. 3.2 zusammengefasst.

Tab. 3.2 Die aus den hyperbolischen Regressionen (Abb. 3.17 und Abb. 3.18) erhaltenen Regressionskoeffizienten (R^2) sowie die ermittelten K_M - und V_{\max} -Werte für die Reaktionen von CYP106A2 mit 17α-Methyltestosteron, Abietinsäure, KBA und GA.

	K_M (μM)	V_{\max} (nmol Produkt(e)/nmol CYP/min)	R^2
15β-Hydroxy-Methyltestosteron	176 ± 32	209 ± 12	0.985
Abietinsäure-Produkte	113 ± 15	22 ± 1	0.988
12α-Hydroxyabietinsäure	107 ± 13	13.0 ± 0.5	0.990
12β-Hydroxyabietinsäure	123 ± 20	8.0 ± 0.4	0.984
KBA-Produkte	106 ± 12	97 ± 5	0.993
GA-Produkte	78 ± 9	35 ± 1	0.992

Für die Hydroxylierung von 17 α -Methyltestosteron wurde mit einem V_{\max} von 209 ± 12 nmol 15 β -Hydroxy-17 α -Methyltestosteron/nmol CYP106A2/min die höchste Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Bei allen anderen Substraten war die Geschwindigkeit der Produktbildung stark reduziert. Beim Umsatz von KBA wurde nur noch eine Aktivität von 97 ± 5 nmol Produkte/nmol CYP106A2/min erhalten und im Fall von GA war der V_{\max} -Wert mit 35 ± 1 nmol Produkte/nmol CYP106A2/min sogar um das 6-fache im Vergleich zur Methyltestosteron-Hydroxylierung reduziert. Die schlechteste Reaktionsgeschwindigkeit wurde allerdings für die regioselektive Hydroxylierung von Abietinsäure bestimmt. Die Produktbildung von 12 α -Hydroxyabietinsäure war im Vergleich zur Hydroxylierung von 17 α -Methyltestosteron drastisch reduziert und lag bei 13.0 ± 0.5 nmol 12 α -Hydroxyabietinsäure/nmol CYP106A2/min und für die Hydroxylierung in 12 β -Position konnte lediglich ein V_{\max} -Wert von 8.0 ± 0.4 nmol 12 β -Hydroxyabietinsäure/nmol CYP/min bestimmt werden.

Für die Hydroxylierung von Abietinsäure und KBA konnten relativ ähnliche Michaelis-Konstanten ermittelt werden (vgl. Tab. 3.2). 17 α -Methyltestosteron zeigte mit 176 ± 32 μ M den schlechtesten K_M -Wert und für den GA Umsatz konnte mit 78 ± 9 μ M die niedrigste Michaelis-Konstante bestimmt werden.

3.2 Substratumsatz in *E.coli*

Nach der erfolgreichen Identifizierung neuer Substrate von CYP106A2 und deren Charakterisierung *in vitro* sollten ausreichende Mengen der Produkte für NMR-spektroskopische Untersuchungen hergestellt werden, um deren genaue Struktur bestimmen zu können. Die größte Herausforderung für die Verwendung von Cytochromen P450 in der organischen Synthese und industriellen Prozessen besteht allerdings in der Bereitstellung der benötigten Redoxpartner sowie der Regeneration des teuren Kofaktors NAD(P)H (Chafson und Auclair 2006). Da eine Benutzung gereinigter Proteine und der Zusatz des Kofaktors für einen *in vitro* Substratumsatz in größerem Umfang sehr zeitaufwendig und kostspielig ist, sollte ein Ganzzellbiokatalysator zum Einsatz kommen. Der Hauptvorteil eines Ganzzellsystems im Gegensatz zu *in vitro* Methoden besteht dabei in der Stabilisierung des P450 Systems an sich und der simultanen Regeneration des Kofaktors im zellulären Metabolismus (Maurer et al. 2005). Die Verwendung von bakteriellen Zellen wie z.B. *E.coli* birgt hierbei im Vergleich zu anderen heterologen Expressionssystemen (Hefe-,

Säugetierzellen) immense Vorteile, da *E.coli* keine endogenen P450 Systeme beinhaltet, und hohe Expressionsraten in relativ kurzen Inkubationsperioden erhalten werden (Yun et al. 2006).

Für den Umsatz der neuen Substrate sollte deshalb ein bereits in der Arbeitsgruppe etablierter *E.coli*-Biokatalysator verwendet werden, in dem CYP106A2 mit seinen heterologen Redoxpartnern Adx₄₋₁₀₈ und AdR koexprimiert werden kann und der bereits erfolgreich zum Umsatz von 11-Deoxycorticosteron (DOC) zu 15 β -Hydroxy-11-Deoxycorticosteron durch CYP106A2 eingesetzt wurde (Hannemann et al. 2006). Dieser Biokatalysator beinhaltet ein Zwei-Vektor-System, bestehend aus dem low-copy Plasmid pACYC_FHH2.8 auf dem die cDNA von CYP106A2 lokalisiert ist und dem high-copy Plasmid pBarTwin, welches die Sequenzen der Redoxkette (cDNAs von AdR und Adx₄₋₁₀₈) trägt (Hannemann et al. 2006; Virus und Bernhardt 2008).

Nach Kotransformation von *E.coli* JM109 Zellen mit den Plasmiden pBarTwin und pACYC_FHH2.8 und Induktion der Proteinexpression wurde zunächst das Substrat 17 α -Methyltestosteron nach einer 24 h Expressionsperiode in einer Konzentration von 500 μ M zugesetzt. Als Negativkontrollen wurden sowohl JM109-Zellen als auch Zellen verwendet, die jeweils nur ein Plasmid (pBarTwin oder pACYC_FHH2.8) trugen, um eine mögliche Kreuzreaktion durch den zellulären Metabolismus auszuschließen. Eine Analyse der Umsätze erfolgte nach 48 h mittels HPLC (Abb. 3.19).

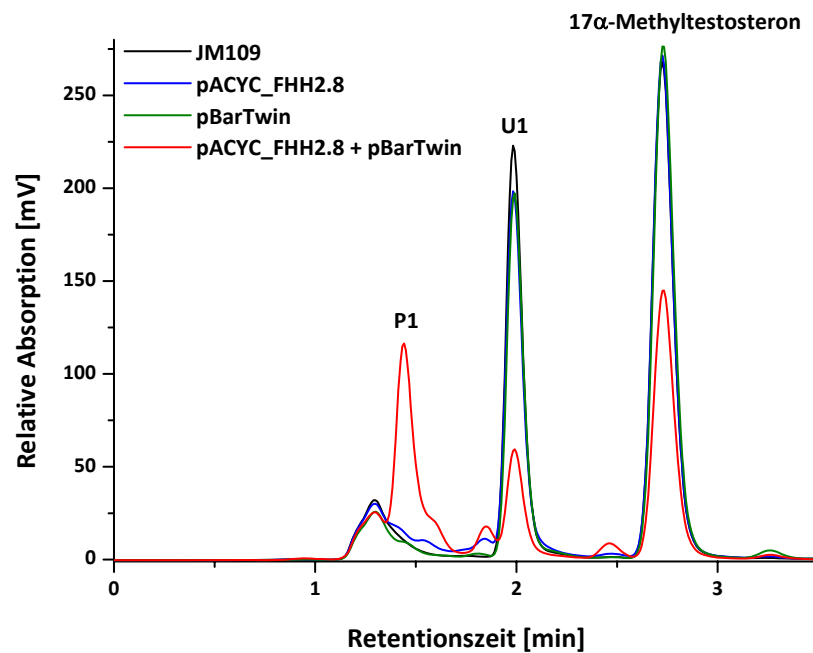


Abb. 3.19 HPLC-Chromatogramm von 17α -Methyltestosteron nach der Interaktion mit *E.coli* JM109 Zellen (schwarz); JM109 Zellen transformiert mit pACYC_FHH2.8 (blau); JM109 Zellen transformiert mit pBarTwin (grün) und JM109 Zellen transformiert mit pACYC_FHH2.8 und pBarTwin (rot). Die Reaktionen wurden in 200 ml SB-Medium bei 30°C für 48 h durchgeführt. Die Ganzzellumsätze wurden mit Chloroform extrahiert und die organische Phase anschließend bis zur Trockne eingedampft. Die isokratische HPLC-Analyse erfolgte mit ACN/ H_2O (60/40). Die Metaboliten wurden bei 240 nm detektiert.

Anhand der HPLC-Chromatogramme (Abb. 3.19) ist eindeutig ersichtlich, dass *E. coli* Zellen, die die beiden Plasmide nicht enthielten, keinen Substratumsatz zeigten, wohingegen Zellen, die die komplette Elektronentransferkette exprimierten, das Produkt P1 bildeten. Das Substrat 17α -Methyltestosteron besaß eine Retentionszeit t_R von 2.73 ± 0.05 min und das Produkt P1 eluierte mit einer Retentionszeit von $t_R = 1.44 \pm 0.05$ min von der Säule und konnte als 15β -Hydroxy- 17α -Methyltestosteron identifiziert werden (vgl. 3.1.3 und Abb. 3.8). Weiterhin zeigte das Chromatogramm einen weiteren prominenten Peak U1 bei $t_R = 1.99 \pm 0.05$ min. Da dieser Peak aber auch in den Chromatogrammen der Negativkontrollen enthalten war, kann er eindeutig einer Verbindung aus dem zellulären Metabolismus von *E.coli* zugeordnet werden, deren genaue Identität jedoch nicht bestimmt wurde. Betrachtet man die relative Produktbildung anhand der prozentualen Verteilung der Peakflächen, so stellt man fest, dass 17α -Methyltestosteron innerhalb von 48 h zu ca. 45 % von CYP106A2 umgesetzt werden konnte.

Interessanterweise zeigten die gramnegativen Bakterien keinerlei Umsatz von Abietinsäure und den pentacyclischen Triterpensäuren GA und KBA (Daten nicht gezeigt). Dies ist wahrscheinlich auf das Unvermögen der Säuren, die äußere Membran der *E. coli* Zellen zu passieren, zurückzuführen (Bleif et al. 2011a; Chen 2007). Auf Versuche, die Membran durch den Zusatz von Detergentien wie z.B Triton X oder Tween zu permeabilisieren, wurde an dieser Stelle verzichtet, da die erhaltenen Reaktionsprodukte für NMR-spektroskopische Untersuchungen verwendet werden sollten und die enthaltenen Detergentien in mühevollen Reinigungsschritten hätten entfernt werden müssen.

3.2.1 Entwicklung eines NADPH-Regenerationssystems für *E.coli*

Zeitgleich zu den in Abschnitt 3.2 aufgeführten Umsatzexperimenten wurde an der Entwicklung eines NADPH-Regenerationssystems für *E.coli* gearbeitet, da Cytochrome P450 auf eine Versorgung mit stöchiometrischen Mengen dieses Kofaktors angewiesen sind (Nebert und Gonzalez 1987). Bei der Verwendung von Ganzzellsystemen wird NADPH zwar im zellulären Metabolismus gebildet (Schmid et al. 2001), allerdings ist es möglich, dass bei der Überexpression einer P450 Monooxygenase der intrazelluläre NADPH-Regenerationsweg nicht mehr in der Lage ist, den erhöhten Bedarf an Reduktionsäquivalenten ausreichend zu decken (Schewe et al. 2008). Ein zusätzliches intrazelluläres Kofaktor-Regenerationssystem könnte daher einen zusätzlichen Vorteil für einen *in vivo* Substratumsatz darstellen (Mouri et al. 2006). Deshalb sollte zusätzlich zur Überexpression von CYP106A2, AdR und Adx₄₋₁₀₈ eine Alkoholdehydrogenase (*LbADH*) aus *Lactobacillus brevis* (Schroer et al. 2007; Schroer et al. 2009) in *E. coli* koexprimiert werden, um eine Regeneration des Kofaktors NADPH zu ermöglichen.

3.2.2 Klonierung

Das Plasmid pBTac*LbADH*, welches die cDNA der Alkoholdehydrogenase (*LbADH*) aus *Lactobacillus brevis* enthielt, wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Stephan Lütz (Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt.

Zur Koexpression der Alkoholdehydrogenase in *E.coli* wurde das *LbADH*-Gen mit Hilfe des Plasmids pBTac*LbADH* und entsprechenden Primern amplifiziert und in das high-copy Plasmid pBarTwin, welches bereits die cDNAs von AdR und Adx₄₋₁₀₈ enthielt, kloniert, wodurch das Plasmid pBarTripel (Abb. 6.2) erhalten wurde (Abb. 3.20 und Abb. 3.21).

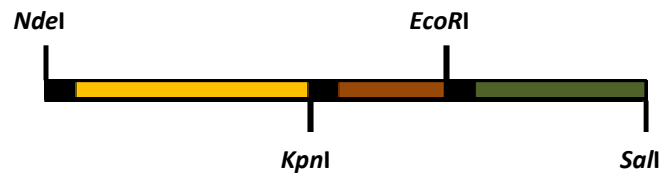


Abb. 3.20 Schematische Darstellung der Expressionskassette von pBarTripel zur Koexpression von AdR (gelb), Adx₄₋₁₀₈ (braun) und LbADH (grün) einschließlich der ribosomalen Bindestellen (schwarz) und Restriktionsschnittstellen.

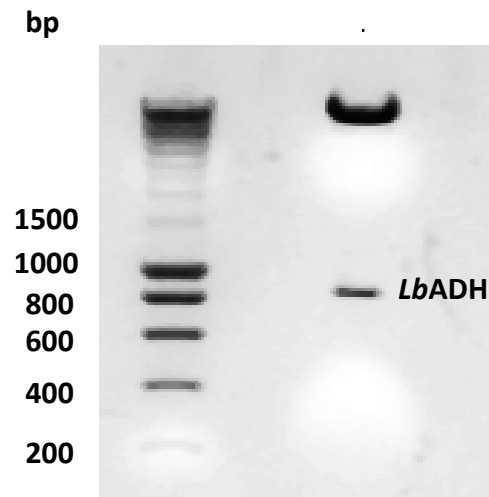


Abb. 3.21 Agarosegel nach Restriktionsverdau des Plasmids pBarTripel mit den Restriktasen *EcoRI* und *Sall*. M) Marker, 1) *LbADH*-Fragment (797 bp). Es wurden 5 µl des Restriktionsverdaus auf das 1 %ige Agarosegel aufgetragen.

Da sich während der Klonierungsarbeiten aber herausstellte, dass der verwendete *E.coli*-Biokatalysator nicht in der Lage ist Abietinsäure und die pentacyclischen Triterpene KBA und GA in die gewünschten Produkte zu konvertieren, wurde auf Expressionsexperimente mit dem Plasmid pBarTripel verzichtet. Allerdings konnte in Kooperation mit Frau Dr. Daniela Zehentgruber (Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich) gezeigt werden, dass durch eine Koexpression der Alkoholdehydrogenase *LbADH* zusätzlich zur Überexpression von CYP106A2 und der heterologen Redoxkette (AdR, Adx₄₋₁₀₈) ein deutlich höherer Substratumsatz der Steroide Progesteron und Testosteron in *E.coli* erreicht werden kann (Zehentgruber et al. 2010). Die Produktivität des CYP106A2-abhängigen Progesteronumsatzes konnte mit Hilfe dieses neuen Systems um das 12-fache im Vergleich zu dem von Hannemann *et al.* entwickelten System gesteigert werden (Hannemann et al. 2006; Zehentgruber et al. 2010).

3.3 Substratumsatz in *Bacillus megaterium* ATCC 13368

Da Abietinsäure, GA und KBA durch den verwendeten *E. coli* Biokatalysator nicht umgesetzt werden konnten, wurde das grampositive Bakterium *Bacillus megaterium* ATCC 13368 für weitere *in vivo* Umsatzversuche ausgewählt. Mit ihm wurde untersucht, ob ein erfolgreicher Umsatz der Säuren mit grampositiven Bakterien, denen die äußere Zellmembran gramnegativer Bakterien fehlt, möglich ist. Der *Bacillus megaterium* Stamm ATCC 13368 beinhaltet das endogene CYP106A2 sowie seine homologen Redoxpartner, die Megaredoxinreduktase und das Megaredoxin, und wurde bereits erfolgreich für den CYP106A2 abhängigen *in vivo* Umsatz von Steroiden verwendet (Berg et al. 1976; Rauschenbach et al. 1993). Bei den Umsatzversuchen diente ein knockout Stamm von *Bacillus megaterium* ATCC 13368, der nicht mehr in der Lage ist, CYP106A2 zu synthetisieren (Rauschenbach et al. 1993) als Negativkontrolle. Im Fall erfolgreicher Produktbildung sollte der Ganzzellkatalysator desweiteren zur Herstellung ausreichender Mengen der Reaktionsprodukte für NMR-spektroskopische Analysen verwendet werden.

3.3.1 Umsatz von 17 α -Methyltestosteron

Erste Umsatzversuche wurden mit dem Steroid 17 α -Methyltestosteron durchgeführt. Nach einer 24 h Inkubationsperiode der *Bacillus* Zellen in Gegenwart von 17 α -Methyltestosteron zeigte sich im HPLC Chromatogramm (Abb. 3.22), dass das Substrat vollständig zum Produkt P1 konvertiert worden war. Mit dem knock out Stamm konnte keinerlei Umsatz von 17 α -Methyltestosteron beobachtet werden (Abb. 3.22), somit wurde die Reaktion im Ganzzellsystem eindeutig durch CYP106A2 katalysiert. Das Produkt P1 eluierte mit einer Retentionszeit $t_R = 2.02 \pm 0.05$ min von der Säule und das Substrat besaß eine Retentionszeit von 10.43 ± 0.05 min. Somit konnte mit dem Ganzzellsystem das gleiche Produktprofil wie durch die *in vitro* Reaktion erhalten werden (vgl. Abb. 3.8).

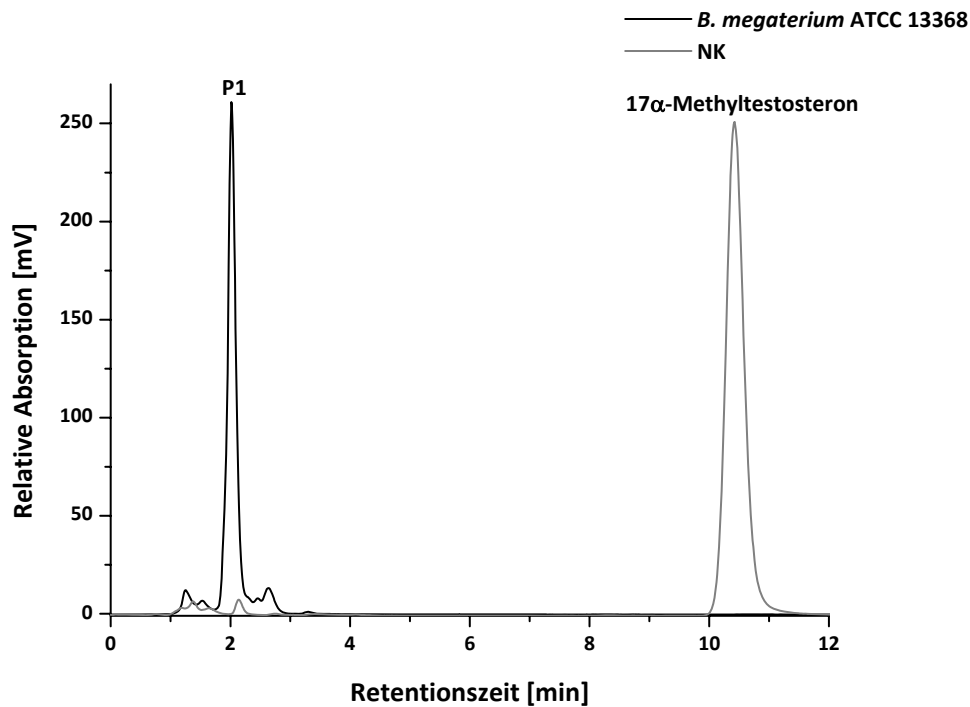


Abb. 3.22 HPLC-Chromatogramm von 17α -Methyltestosteron ($500\ \mu\text{M}$) nach der Interaktion mit *Bacillus megaterium* ATCC 13368 Zellen (schwarz) und dem knockout Stamm (grau). Die Reaktionen wurden in 50 ml Komplexmedium bei 30°C für 24 h durchgeführt. Die Ganzzellumsätze wurden mit Chloroform extrahiert und die organische Phase anschließend bis zur Trockne eingedampft. Die isokratische HPLC-Analyse erfolgte mit ACN/ H_2O (40/60). Die Metaboliten wurden bei 240 nm detektiert. Als Negativkontrolle (NK) (grau) diente ein knockout Stamm von *B. megaterium* ATCC 13368, der nicht mehr in der Lage ist, CYP106A2 zu synthetisieren.

Ein Ganzzellumsatz von $500\ \mu\text{M}$ 17α -Methyltestosteron im größeren Maßstab (1000 ml Kultur) lieferte nach Chloroform-Extraktion und anschließender Reinigung des Rückstands über Kieselgel (Hexan/Ethylacetat 1/5) das Produkt P1 ($R_f = 0.24$) in einer Ausbeute von 82 mg (51 %), welches mit Hilfe der NMR-Spektroskopie eindeutig als 15β -Hydroxy- 17α -Methyltestosteron identifiziert werden konnte (Abb. 3.23).

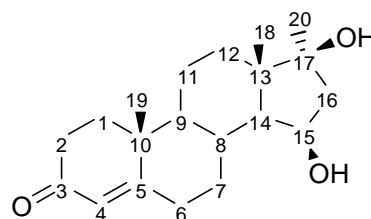


Abb. 3.23 Atomnummerierung von 15β -Hydroxy- 17α -Methyltestosteron.

15 β -Hydroxy-17 α -Methyltestosteron: ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ =5.75 (s, 1 H; H-4), 4.21 (ddd, J =8, 6, 2.5 Hz, 1 H; H-15 α), 2.49 (dddd, J =14.5, 14.5, 5.5, 2 Hz, 1 H; H-6 β), 2.46 (m, 1 H; H-2 α), 2.38 (dddd, J =17, 4.5, 3, 1, 1 H; H-2 β), 2.35 (dd, J =15, 7.5, 1 H; H-16 α), 2.31 (dd, J =14.5, 4, 2.5, 1 H; H-6 α), 2.12 (dddd, J =12.5, 5.5, 3.5, 2.5, 1 H; H-7 β), 2.06 (ddd, J =13.5, 5, 3, 1 H; H-1 α), 2.03 (m, 1 H; H-8), 1.95 (ddd, J =15, 2.5, 1, 1 H; H-16 β), 1.72 (ddd, J =13.5, 13.5, 5, 1 H; H-1 β), 1.64 (m, 1 H; H-11 α), 1.53 (ddd, J =13, 4, 3, 1 H; H-12 β), 1.49 (dddd, J =13, 13, 13, 4, 1 H; H-11 β), 1.29 (ddd, J =13, 13, 5, 1 H; H-12 α), 1.25 (s, 3 H; H-19), 1.19 (s, 3 H; Me-17 α), 1.16 (s, 3 H; H-18), 1.13 (dd, J =11, 6, 1 H; H-14), 1.11 (m, 1 H; H-7 α), 0.99 ppm (m, 1 H; H-9).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ =199.54 (C-3), 171.06 (C-5), 123.95 (C-4), 81.25 (C-17), 69.02 (C-15), 54.67 (C-14), 54.21 (C-9), 51.87 (C-16), 44.77 (C-13), 38.79 (C-10), 35.82 (C-1), 33.98 (C-2), 32.83 (C-12), 32.75 (C-6), 32.11 (C-8), 31.35 (C-7), 25.30 (Me-C17), 20.55 (C-11), 17.35 (C-19), 16.55 ppm (C-18).

3.3.2 Umsatz von Abietinsäure

Abietinsäure, die mit Hilfe des *E. coli* Ganzellsystems nicht umgesetzt werden konnte, zeigte nach Interaktion mit *Bacillus megaterium* ATCC 13368 die Bildung von zwei Produkten (P1, P2) (Abb. 3.24). Diese retardierten nach $t_R = 3.31 \pm 0.05$ min (P1) und $t_R = 5.89 \pm 0.05$ min (P2) von der Säule und das Substrat besaß eine Retentionszeit t_R von 26.91 ± 0.05 min. Somit wurde das gleiche Produktmuster wie in der *in vitro* Reaktion erhalten (vgl. Abb. 3.12). Allerdings wurde das Produkt P1 *in vivo* in einer größeren Menge als in der *in vitro* Reaktion (P1:P2 = 1:2) gebildet. Die *in vivo* Reaktion resultierte in einem 2:1 Gemisch von P1 und P2 (Bleif et al. 2011a). Das HPLC Elutionsprofil zeigte weitere Peaks mit kleineren Retentionszeiten $t_R = 0.89$ - 1.88 ± 0.05 min als die von P1 (Abb. 3.24). Diese Peaks waren ebenfalls nach Extraktion des Komplexmediums ohne Zugabe der Säure präsent (Daten nicht gezeigt) und konnten somit eindeutig Bestandteilen des Mediums zugeordnet werden.

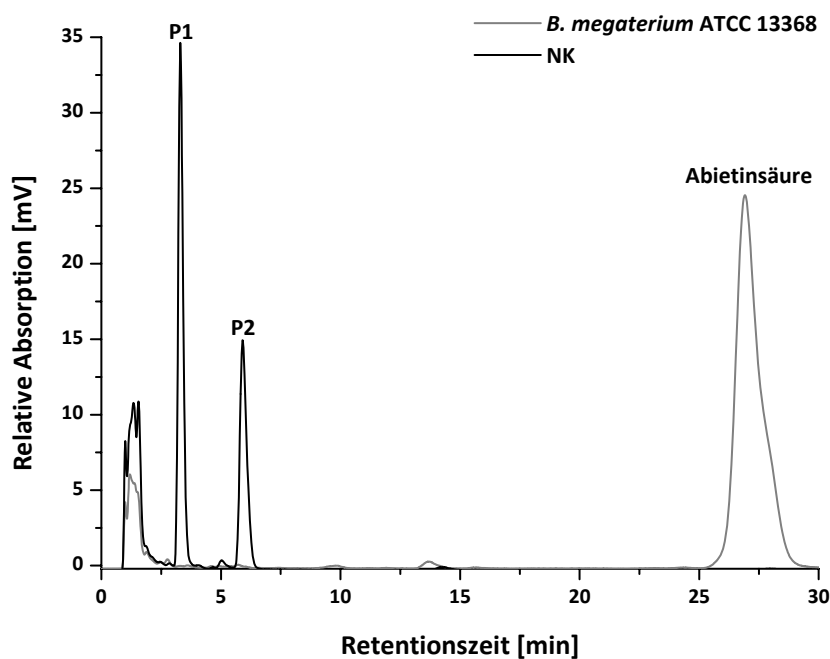


Abb. 3.24 HPLC-Chromatogramm des *in vivo* Umsatzes von Abietinsäure (200 μ M) mit *Bacillus megaterium* ATCC 13368 (schwarz) und dem knockout Stamm (grau). Die Reaktionen wurden in 50 ml Komplexmedium bei 30°C für 48 h durchgeführt. Die Ganzzellumsätze wurden mit Chloroform extrahiert und die organische Phase anschließend bis zur Trockne eingedampft. Die isokratische HPLC-Analyse erfolgte mit MeOH/H₂O (0.1 % TFA) (75/25). Die Metaboliten wurden bei 254 nm detektiert. Als Negativkontrolle (NK) (grau) diente ein knockout Stamm von *B. megaterium* ATCC 13368, der nicht mehr in der Lage ist, CYP106A2 zu synthetisieren.

Ein „large-scale“ Umsatz (1000 ml Kultur) von 200 μ M Abietinsäure lieferte nach Chloroform-Extraktion und Reinigung des Rückstands über Kieselgel (Hexan/Ethylacetat 7/3) die Produkte P1 ($R_f = 0.28$) und P2 ($R_f = 0.12$) in einer Ausbeute von 17.2 mg (45 %) bzw. 14.2 mg (56 %). Beide Produkte konnten mittels NMR-Spektroskopie zweifelsfrei als 12 α - (P2) und 12 β - (P1) Hydroxyabietinsäure identifiziert werden (Abb. 3.25 und Abb. 3.26).

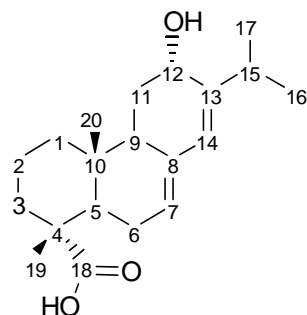


Abb. 3.25 Atomnummerierung von 12 α -Hydroxyabietinsäure.

12 α -Hydroxyabietinsäure: ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta=0.83$ (s, 3 H; H-20), 1.08 (d, $J=7$ Hz, 3 H; H-16), 1.11 (d, $J=7$ Hz, 3 H; H-17), 1.21 (m, 1 H; H-1 α), 1.27 (s, 3 H; H-19), 1.34 (dd, $J=13$, 3 Hz, 1 H; H-11 β), 1.62 (m, 2 H; H-2 α und H-2 β), 1.69 (m, 1 H; H-3 β), 1.83 (m, 1 H; H-3 α), 1.86 (m, 1 H; H-1 β), 1.89 (ddd, $J=13$, 3, 3 Hz; 1 H; H-11 α), 1.95 (m, 1 H; H-6 α), 2.12 (m, 1 H; H-6 β), 2.17 (dd, $J=12$, 3.5 Hz, 1 H, H-5 α), 2.33 (ddd, $J=13.5$, 3, 3 Hz, 1 H; H-9 α), 2.43 (sep, $J=7$ Hz, 1 H, H-15), 4.29 (dd, $J=3$, 3 Hz, 1 H; H-12 β), 5.54 (ddd; $J=5$, 2.5, 2.5 Hz, 1 H; H-7), 5.85 ppm (s, 1 H; H-14).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta=14.38$ (C-20), 16.67 (C-19), 17.98 (C-2), 21.72 (C-17), 22.33 (C-16), 25.83 (C-6), 30.55 (C-11), 32.57 (C-15), 34.00 (C-10), 37.20 (C-3), 37.97 (C-1), 43.53 (C-9), 44.91 (C-5), 46.21 (C-4), 66.43 (C-12), 124.31 (C-7), 125.72 (C-14), 134.36 (C-8), 143.94 (C-13), 183.60 ppm (C-18).

12 α -Hydroxyabietinsäure war bereits als Oxidationsprodukt der Levopimarsäure bekannt (Herz et al. 1965). Die oben aufgeführten NMR-Daten stimmten sehr gut mit den Literaturdaten überein (Herz et al. 1965; Krohn et al. 1992).

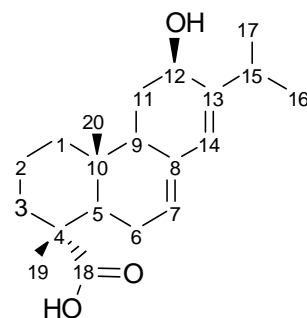


Abb. 3.26 Atomnummerierung von 12 β -Hydroxyabietinsäure.

12 β -Hydroxyabietinsäure: ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta=0.85$ (s, 3 H; H-20), 1.06 (d, $J=7$ Hz, 3 H; H-16), 1.08 (d, $J=7$ Hz, 3 H; H-17), 1.15 (m, 1 H; H-1 α), 1.27 (s, 3 H; H-19), 1.27 (m, 1 H; H-11 β), 1.60 (m, 2 H; H-2 α und H-2 β), 1.69 (m, 1 H; H-3 β), 1.79 (m, 1 H; H-3 α), 1.89 (m, 1 H; H-1 β), 1.90 (m, 1 H; H-6 α), 2.02 (m, 1 H; H-5 α), 2.05 (m, 1 H; H-9 α), 2.06 (m, 1 H; H-6 β), 2.13 (ddd, $J=12$, 4.5, 3.5 Hz, 1 H; H-11 α), 2.72 (sep, $J=7$ Hz, 1 H; H-15), 4.44 (dd, $J=10$, 4.5 Hz, 1 H, H-12 α), 5.50 (ddd; $J=5$, 2.5, 2.5 Hz, 1 H; H-7), 5.79 ppm (s, 1 H; H-4).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta=14.10$ (C-20), 16.71 (C-19), 17.98 (C-2), 20.66 (C-17), 22.71 (C-16), 25.62 (C-6), 28.03 (C-15), 33.20 (C-11), 34.41 (C-10), 37.17 (C-3), 38.15 (C-1), 44.22 (C-5),

46.16 (C-4), 48.45 (C-9), 69.52 (C-12), 122.29 (C-7), 123.52 (C-14), 134.79 (C-8), 147.23 (C-13), 184.19 ppm (C-18).

Die Synthese und NMR-Analyse von 12 β -Hydroxyabietinsäure wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben, so dass hier zum ersten Mal eine Synthese dieser Verbindung erfolgreich dargestellt werden konnte.

3.3.3 Umsatz von 11-Keto- β -boswelliasäure

Im nächsten Schritt wurden Umsatzversuche mit der pentacyclischen Triterpensäure KBA durchgeführt, um zu untersuchen, ob die grampositiven Bakterien fähig sind, dieses Substrat ebenfalls in die Produkte zu konvertieren, die in der CYP106A2 abhängigen *in vitro* Reaktion erhalten wurden. Die 11-Keto- β -boswelliasäure wurde von *Bacillus megaterium* ATCC 13368 zu vier Produkten umgesetzt (Abb. 3.27), was demnach identisch mit dem Produktmuster der *in vitro* Reaktion ist (vgl. Abb. 3.6) (Bleif et al. 2011b). Die erhaltenen Produkte zeigten Retentionszeiten von $t_R = 2.35 \pm 0.05$ min (P1), $t_R = 3.60 \pm 0.05$ min (P2), $t_R = 5.20 \pm 0.05$ min (P3) und $t_R = 6.83 \pm 0.05$ min (P4). Das Substrat KBA besaß eine Retentionszeit t_R von 17.29 ± 0.05 min.

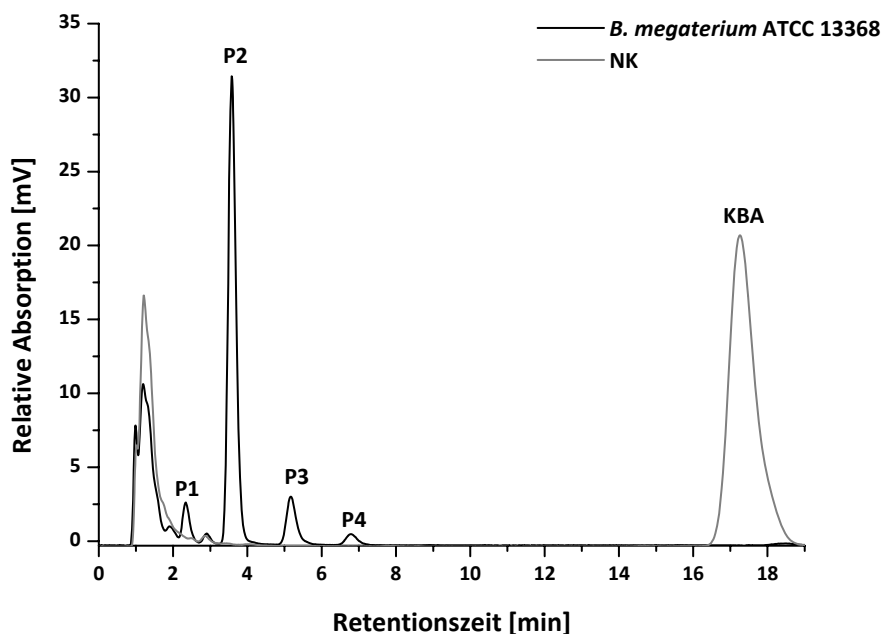


Abb. 3.27 HPLC-Chromatogramm des *in vivo* Umsatzes von KBA (100 μ M) mit *Bacillus megaterium* ATCC 13368 (schwarz) und dem knockout Stamm (grau). Die Reaktionen wurden in 50 ml Komplexmedium bei 30°C für 24 h durchgeführt. Die Ganzzellumsätze wurden mit Chloroform extrahiert und die organische Phase anschließend bis zur Trockne eingedampft. Die isokratische HPLC-Analyse erfolgte mit MeOH/H₂O (0.1 % TFA) (75/25). Die Metaboliten wurden bei 254 nm detektiert. Als Negativkontrolle (NK) (grau) diente ein knockout Stamm von *B. megaterium* ATCC 13368, der der nicht mehr in der Lage ist, CYP106A2 zu synthetisieren.

Betrachtet man die relative Produktbildung anhand der prozentualen Verteilung der Peakflächen, so fällt auf, dass das Hauptprodukt P2 zu 75.0 % gebildet wurde, wohingegen die Nebenprodukte P1, P3 und P4 zu 10.0 %, 11.0 % und 4.0 % vorlagen. Das HPLC Elutionsprofil zeigte weitere Peaks mit Retentionszeiten von $t_R = 0.87-1.94 \pm 0.05$ min (Abb. 3.27). Diese Peaks waren ebenfalls nach Extraktion des Komplexmediums ohne Zugabe von KBA vorhanden (Daten nicht gezeigt) und konnten somit Bestandteilen des Mediums zugeordnet werden.

Der Umsatz von 100 μM KBA in 1000 ml Komplexmedium mit anschließender Extraktion und Reinigung des Reaktionsrückstandes über Kieselgel (Hexan/Diethylether (1 % HAc) 1/3), führte zur Bildung von 21.8 mg (60 %) des Hauptproduktes P2 ($R_f = 0.25$), welches durch NMR Spektroskopie als 15 α -Hydroxy-KBA identifiziert wurde (Abb. 3.28) (Bleif et al. 2011b). Die Menge der Nebenprodukte (P1, P3 und P4) war leider zu gering, um ihre Struktur mittels NMR-Spektroskopie zu bestimmen.

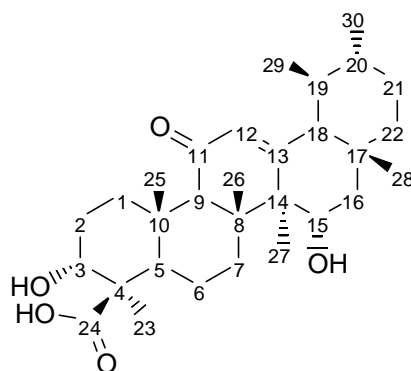


Abb. 3.28 Atomnummerierung von 15 α -Hydroxy-KBA.

15 α -Hydroxy-KBA: ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): $\delta=5.55$ (s, 1 H; H-12), 4.24 (dd, $J=11.5, 6$ Hz, 1 H; H-15 β), 3.96 (dd, $J=3, 3$ Hz, 1 H; H-3), 2.53 (s, 1 H; H-9), 2.37 (ddd, $J=13, 4.5, 3$ Hz, 1 H; H-1 β), 2.24 (dddd, $J=14.5, 14.5, 4.5, 3$ Hz, 1 H; H-2 β), 2.11 (dd, $J=13, 11.5$ Hz, 1 H; H-16 β), 1.89 (m, 2 H; H-6 β , H-7 α), 1.79 (dd, $J=10.5, 3.5$ Hz, 1 H; H-7 β), 1.72 (m, 1 H; H-6 α), 1.56 (dd, $J=11, 2$ Hz, 1 H; H-18), 1.51 (m, 1 H; H-22 α), 1.49 (m, 1 H; H-2 α), 1.48 (m, 1 H; H-5), 1.46 (m, 1 H; H-21 β), 1.36 (m, 4 H; H-1 α , H-27), 1.34 (m, 1 H; H-21 α), 1.33 (m, 1 H; H-22 β), 1.26 (m, 1 H; H-16 α), 1.25 (s, 3 H; H-23), 1.23 (s, 3 H; H-26), 1.13 (s, 3 H; H-25), 0.97 (m, 5 H; H-19, H-20, H-30), 0.87 (s, 3 H; H-28), 0.85 ppm (d, $J=6.5$ Hz, 3 H; H-29).

^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz): $\delta=201.97$ (C-11), 181.01 (C-24), 167.72 (C-13), 131.68 (C-12), 71.41 (C-3), 68.52 (C-15), 61.80 (C-9), 60.88 (C-18), 50.79 (C-14), 49.49 (C-5), 48.33 (C-4),

47.69 (C-8), 41.70 (C-22), 40.40 (C-20), 40.25 (C-19), 39.35 (C-16), 38.82 (C-10), 37.08 (C-7), 35.15 (C-1), 35.07 (C-17), 31.84 (C-21), 30.01 (C-28), 27.06 (C-2), 25.01 (C-23), 21.41 (C-30), 20.34 (C-6), 19.37 (C-26), 17.78 (C-29), 15.16 (C-27), 14.09 ppm (C-25).

Interessanterweise finden sich in der Literatur weder Vorschriften zur Synthese dieser Verbindung noch konnten publizierte NMR-Daten zu ihrer Struktur gefunden werden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass im Zuge dieser Arbeit erstmalig eine Synthese dieser Verbindung beschrieben wurde.

3.3.4 Umsatz von 18 β -Glycyrrhetinsäure

18 β -Glycyrrhetinsäure konnte durch den *Bacillus*-Ganzzellkatalysator ebenfalls zu den Produkten umgesetzt werden, die in der *in vitro* Reaktion mit CYP106A2 erhalten wurden (vgl. Abb. 3.10). Das HPLC Chromatogramm zeigte die Bildung von zwei Produkten (Abb. 3.29) mit Retentionszeiten von $t_R = 2.71 \pm 0.05$ min (P1) und $t_R = 7.25 \pm 0.05$ min (P2). Die Säure eluierte nach $t_R = 12.75 \pm 0.05$ min von der Säule. Das Produkt P1 entstand hierbei zu 59.0 % und das Produkt P2 zu 41.0 %. Die Peaks $t_R = 0.87-2.15 \pm 0.05$ min, die vor der Verbindung P1 eluierten, konnten wie im Fall von KBA und Abietinsäure Ingredienzien des Mediums zugeordnet werden.

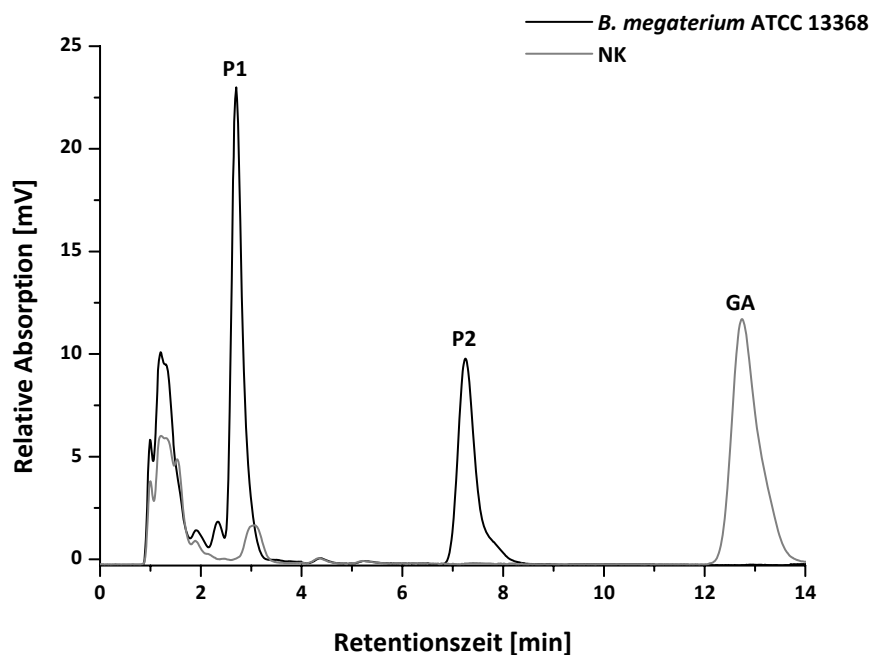


Abb. 3.29 HPLC-Chromatogramm des *in vivo* Umsatzes von GA (100 μ M) mit *Bacillus megaterium* ATCC 13368 (schwarz) und dem knockout Stamm (grau). Die Reaktionen wurden in 50 ml Komplexmedium bei 30°C für 24 h durchgeführt. Die Ganzzellumsätze wurden mit Chloroform extrahiert und die organische Phase anschließend bis zur Trockne eingedampft. Die isokratische HPLC-Analyse erfolgte mit MeOH/H₂O (0.1 % TFA) (75/25). Die Metaboliten wurden bei 254 nm detektiert. Als Negativkontrolle (NK) (grau) diente ein knockout Stamm von *B. megaterium* ATCC 13368, der nicht mehr in der Lage ist, CYP106A2 zu synthetisieren.

Ein Umsatz von 100 μ M Glycyrrhetinsäure in einem Kulturvolumen von 1000 ml mit anschließender Chloroform-Extraktion und Reinigung des Rückstands über Kieselgel (Hexan/Ethylacetat (1% HAc) 4/6) führte zu 17.1 mg (60 %) des Produktes P1 ($R_f = 0.53$). Die Ausbeute des Nebenproduktes P2 war leider für anschließende NMR-Analysen nicht ausreichend. Das Hauptprodukt P1 konnte durch NMR-Spektroskopie als 7 β -Hydroxy-GA identifiziert werden.

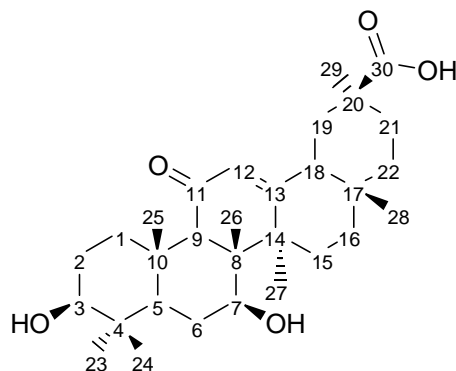


Abb. 3.30 Atomnummerierung von 7 β -Hydroxy-GA.

7 β -Hydroxy-GA: ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): $\delta=5.72$ (s, 1 H; H-12), 4.04 (dd, $J=11, 5$ Hz, 1 H; H-7 α), 3.21 (dd, $J=11, 5.5$ Hz, 1 H; H-3 α), 2.76 (dt, $J=13.5, 3.5, 3.5$ Hz; 1 H; H-1 β), 2.27 (s, 1 H; H-9), 2.17 (dd, $J=13.5, 4.5$ Hz, 1 H; H-18), 2.11 (ddd, $J=14, 14, 4$ Hz, 1 H; H-15 β), 2.00 (ddd, $J=14, 14, 4$ Hz, 1 H; H-16 α), 1.97 (m, 1 H; H-21), 1.90 (m, 1 H; H-19 β), 1.72 (dd, $J=12.5, 4.5$ Hz, 1 H; H-6), 1.63 (m, 1 H; H-2 α), 1.61 (dd, $J=13.5, 13.5$ Hz, 1 H; H-19 α), 1.60 (m, 1 H; H-2 β), 1.51 (m, 1 H; H-6 β), 1.48 (m, 1 H; H-15 α), 1.41 (s, 3 H; H-27), 1.39 (m, 1 H; H-22), 1.36 (m, 1 H; H-22), 1.34 (m, 1 H; H-21), 1.19 (s, 3 H; H-29), 1.12 (s, 6 H; H-25 und H-26), 1.02 (m, 1 H; H-16 β), 0.99 (s, 3 H; H-23), 0.89 (ddd, $J=13.5, 13.5, 5$ Hz, 1 H; H-1 α), 0.81 (s, 3 H; H-28), 0.78 (s, 3 H; H-24), 0.74 ppm (d, $J=12.5$ Hz, 1 H; H-5).

^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz): $\delta=199.43$ (C-11), 181.16 (C-30), 169.32 (C-13), 128.56 (C-12); 78.57 (C-3), 72.53 (C-7), 61.93 (C-9), 51.64 (C-5), 50.44 (C-8), 48.84 (C-18), 44.52 (C-14), 43.80 (C-20), 41.05 (C-19), 38.83 (C-4), 38.76 (C-1), 37.59 (C-22), 37.08 (C-10), 31.76 (C-17), 30.88 (C-21), 30.04 (C-15), 28.83 (C-6), 28.44 (C-28), 28.39 (C-29), 28.02 (C-2), 26.62 (C-16), 23.63 (C-27), 15.92 (C-25), 15.55 (C-24), 12.22 ppm (C-26).

Die Synthese von 7 β -Hydroxy-GA wurde bereits durch den Umsatz von 18 β -Glycyrrhetinsäure mit dem Pilz *Cunninghamella blakesleeana* beschrieben (Qin et al. 2010). Die oben aufgeführten NMR-Daten stimmten sehr gut mit den Literaturdaten überein (Qin et al. 2010).

3.4 Entwicklung eines rekombinanten P450 Expressionssystems für *B. megaterium*

Bacillus megaterium ATCC 13368 konnte zwar erfolgreich als Ganzzellkatalysator zur Hydroxylierung von Methyltestosteron und der Terpensäuren eingesetzt werden, allerdings erfolgt die Expression von CYP106A2 in diesem System erst in der stationären Wachstumsphase der Zellen und ist nicht induzierbar (Berg und Rafter 1981). Um die daraus resultierende, geringe P450-Expression zu steigern und um eine Verbesserung des existierenden Systems hinsichtlich höherer Umsatzraten zu erzielen, sollte CYP106A2 zusammen mit seinen heterologen Redoxpartnern Adx und AdR in *Bacillus megaterium* überexprimiert werden.

3.4.1 Klonierung

Für die heterologe Proteinexpression wurde ein Xylose induzierbarer *Bacillus megaterium* Shuttle-Vektor ausgewählt, der bereits erfolgreich zur Expression anderer Proteine in *Bacillus megaterium* eingesetzt worden war (Biedendieck et al. 2007b; Stammen et al. 2010). Die Expression des P450 Systems sollte hierbei tricistronisch erfolgen. Als Ausgangsplasmid für die Vektorkonstruktion diente der Shuttle-Vektor pKMBm4 (Stammen et al. 2010). Allerdings war die darin enthaltene Multiple cloning site (MCS) für die beabsichtigte Klonierungsstrategie nicht geeignet und musste ausgetauscht werden. Zu diesem Zweck, musste die *PacI* Schnittstelle im Startplasmid pKMBm4 zunächst deletiert werden, um sie als Restriktionsschnittstelle in der neuen MCS verwenden zu können. Dies erfolgte mittels QuickChange® Mutagenese und resultierte in dem Plasmid pSMF2. Die neue MCS, bestehend aus sieben Restriktionsschnittstellen, wurde durch Insertion eines 81 bp Oligonukleotidpaares in die Schnittstellen *NheI* und *SphI* des Plasmids pSMF2 erhalten, was zum Plasmid pSMF2.1 führte. Für die weitere Konstruktion des gewünschten Expressionsplasmids wurden die einzelnen Zielgene zunächst mit Hilfe des Programms JCat (Grote et al. 2005) auf ihren Codon Adaptation Index (CAI) hin untersucht. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes stehen für die Kodierung einer Aminosäure meistens mehrere verschiedene Kodons zur Verfügung. GC-reiche Organismen bevorzugen daher z.B. eher die Verwendung GC-haltiger Kodons anstelle von AT-haltigen. Aufgrund dieser nicht zufälligen Kodon-Wahl existieren für jeden Organismus somit optimale und nicht-optimale Kodons (Grote et al. 2005). Kodons, die im Zielgen enthalten sind, aber selten vom Expressionswirt verwendet werden, können daher zu schlecht translatierten mRNAs, einer Verminderung der Stabilität der mRNA und sogar zu einem frühzeitigen Abbruch der Translation führen (Grote et al. 2005). Der Parameter CAI beschreibt, wie gut die Kodons des Zielgens mit der Kodon-Präferenz des Expressionswirts übereinstimmen. Ein CAI von eins steht hierbei für eine optimale Kodonverwendung. Der durchschnittliche CAI aller 4.814 offenen Leserahmen von *Bacillus megaterium* beträgt 0.35 (Yang et al. 2007), somit sollten alle Gene, die einen kleineren CAI-Wert besitzen, optimiert werden, um eine optimale Expression zu gewährleisten. Die im AdR-Gen verwendeten Kodons unterscheiden sich mit einem CAI-Wert von 0.12 offenkundig stark von der Kodonvorliebe des Bakteriums und mussten deshalb verbessert werden. Die Sequenz wurde optimiert (CAI von 0.96) und durch

Geneart (Regensburg, Germany) synthetisiert. Die Gene von CYP106A2 und Adx erreichten CAI-Werte von 0.33 und 0.35 und benötigten dementsprechend keine weitere Optimierung. Das für CYP106A2 kodierende Gen wurde zunächst in das Plasmid pSMF2.1 ligiert, was zur Bildung des Plasmids pSMF2.1C führte. Die cDNAs von AdR und Adx wurden schließlich im Plasmid pSMF2.1C hinter das P450 kloniert, wobei die Reduktase vor das Ferredoxin ligiert wurde, was zur Bildung des Plasmids pSMF2.1CAA (Abb. 3.31) führte (Bleif et al. 2011b).

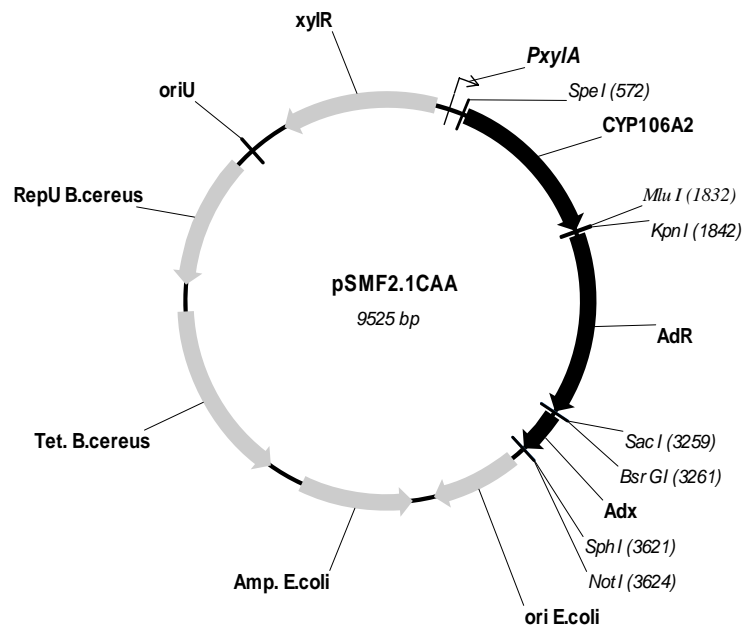


Abb. 3.31 Koexpressionsplasmid zur rekombinanten Proteinproduktion in *Bacillus megaterium*. Der 9.525 bp große Vektor pSMF2.1CAA beinhaltet die cDNAs von CYP106A2, AdR und Adx. Elemente für die rekombinante, induzierbare Genexpression in *B. megaterium* sind der durch Xylose induzierbare Promotor (*PxyIA*) und das für den Xyloserepressor kodierende Gen (*xyIR*). Elemente für die Plasmidreplikation in *Bacillus* sind der Replikationsursprung *oriU*, *RepU*, und das Tetracyclinresistenzgen. Elemente für die Plasmidreplikation in *E. coli* sind der Replikationsursprung (*ori E.coli*) und das Ampizillinresistenzgen.

3.4.2 Koexpression von CYP106A2, AdR und Adx in *Bacillus megaterium*

3.4.2.1 Expression in *Bacillus megaterium* ATCC 13368

Nach Protoplastentransformation des *Bacillus megaterium* Stammes ATCC 13368 mit dem in 3.4.1 beschriebenen Plasmid pSMF2.1CAA wurden die Zellen zunächst bei 30°C in Komplexmedium angezogen. Die Proteinexpression wurde bei einer $OD_{578\text{ nm}}$ von 0.4 durch die Zugabe von 0.5 % (x/v) Xylose gestartet. Nach einer 24 h Expressionsperiode wurde die Proteinbildung mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analyse überprüft. Leider konnte mit diesen Analysemethoden keinerlei Überexpression der gewünschten Proteine nachgewiesen

werden (Daten nicht gezeigt). Um dieses Ergebnis genauer zu verifizieren, wurde ein Aktivitätstest mit transformierten und anschließend induzierten Zellen durchgeführt. Als Kontrolle dienten hierbei Zellen, die das Plasmid pSMF2.1CAA trugen, jedoch nicht induziert wurden, sowie der knockout Stamm von *Bacillus megaterium* ATCC 13368. Zum Aktivitätsvergleich wurde der nicht transformierte *Bacillus megaterium* Stamm ATCC 13368 verwendet. Nach Induktion der Expression wurde den Zellen nach 24 h das Substrat KBA in einer Konzentration von 100 μM zugesetzt. Der Substratumsatz wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten mittels HPLC analysiert. Allerdings konnte selbst nach einer Inkubationszeit von 5 d kein Umsatz von KBA detektiert werden (Abb. 3.32). Interessanterweise zeigten die Zellen, die das Plasmid pSMF2.1CAA trugen, aber nicht induziert worden waren, ebenfalls keinen Umsatz des Substrates. Somit war der transformierte *Bacillus* Stamm nicht einmal mehr in der Lage, den natürlichen Umsatz (vgl. 3.3.3) zu vollführen (Abb. 3.32).

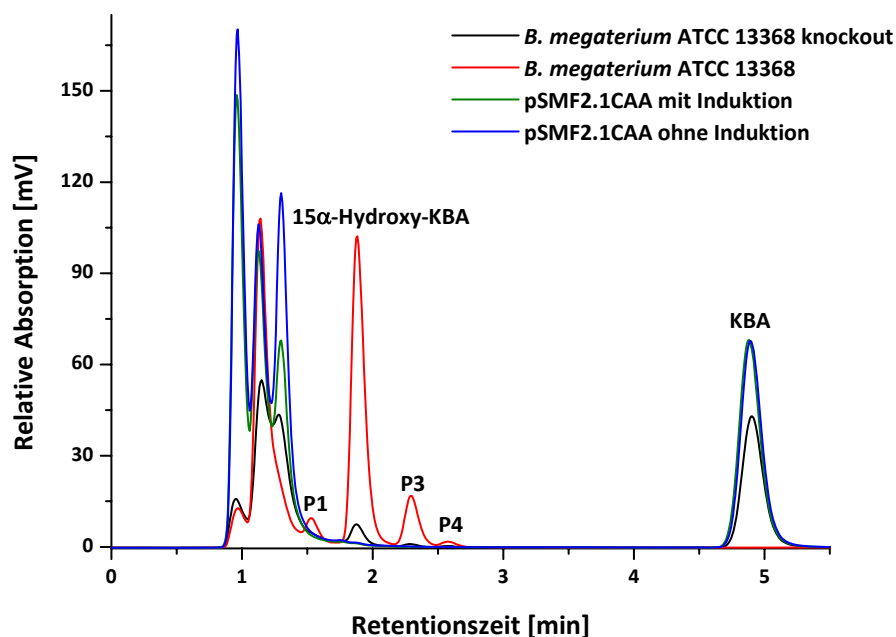


Abb. 3.32 HPLC-Chromatogramm von KBA nach der Interaktion mit dem knockout Stamm von *B. megaterium* ATCC 13368 (schwarz); *B. megaterium* ATCC 13368 (rot); *B. megaterium* ATCC 13368 Zellen transformiert mit pSMF2.1CAA mit Induktion (grün) und *B. megaterium* ATCC 13368 Zellen transformiert mit pSMF2.1CAA ohne Induktion (blau). Die Reaktionen wurden in 50 ml Komplexmedium bei 30°C für 5 d durchgeführt. Die Ganzzellumsätze wurden mit Chloroform extrahiert und die organische Phase anschließend bis zur Trockne eingedampft. Die isokratische HPLC-Analyse erfolgte mit MeOH/H₂O (0.1 % TFA) (85/15). Die Metaboliten wurden bei 254 nm detektiert.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte darin begründet liegen, dass die meisten *Bacillus megaterium* Stämme bereits mehr als vier Plasmide beinhalten (Vary et al. 2007). Der am besten studierte Stamm QM B1551 trägt z.B 11 % seiner zellulären DNA auf sieben Plasmiden, was die Möglichkeit des Bakteriums, zusätzliche extra-chromosomale DNA Elemente stabil zu halten, stark einschränkt (Gamer et al. 2009). Eine andere Begründung für die Unfähigkeit des *Bacillus* Stammes zur Produktbildung könnte auch darin liegen, dass das verwendete Plasmid mit den bereits vorhandenen zelleigenen Plasmiden nicht kompatibel ist.

3.4.2.2 Expression in *Bacillus megaterium* MS941

Da der *Bacillus megaterium* Stamm ATCC 13368 für eine Überexpression des P450 Systems nicht geeignet war, wurde der *Bacillus megaterium* Stamm MS941 für weitere Expressionsexperimente ausgewählt. Das Genom dieses plasmidfreien *Bacillus* Stammes ist vollständig sequenziert und er wurde bereits erfolgreich zur Expression heterologer Proteine eingesetzt (Stammen et al. 2010). Laut Genomanalyse enthält dieser Stamm drei Cytochrome P450 (CYP106A1 und zwei weitere Cytochrome, die bisher noch keiner Familie zugeordnet wurden). Allerdings ist in ihm kein endogenes CYP106A2 enthalten und eine Inkubation von MS941 Zellen mit den einzelnen Substraten zeigte nach HPLC Analyse keine Kreuzreaktion (Daten nicht gezeigt). Der *Bacillus* Stamm MS941 ist eine Mutante des Stammes DSM319, in dem die neutrale Protease nprM deletiert wurde (Wittchen und Meinhardt 1995), außerdem ist er im Gegensatz zu *Bacillus megaterium* ATCC 13368 nicht zur Sporulation fähig. Diese Eigenschaften machen ihn zu einem optimalen Wirt für die Expression heterologer Proteine.

Nach Transformation der *Bacillus* protoplasten mit den in 3.4.1 beschriebenen Plasmiden unter Verwendung einer Polyethylenglykol abhängigen Methode und anschließender Induktion der Expression bei einer $OD_{578\text{ nm}}$ von 0.4 mit 0.5 % (x/v) Xylose wurde die Proteinproduktion nach 24 h mittels SDS-PAGE überprüft. Dabei konnte sowohl eine erfolgreiche Überexpression von CYP106A2 als auch von AdR nachgewiesen werden (Abb. 3.33) (Bleif et al. 2011b).

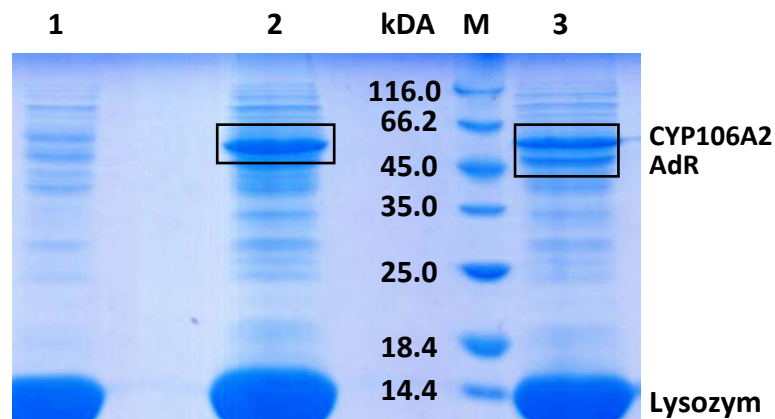


Abb. 3.33 SDS-Gel der rekombinanten Proteinproduktion in *B. megaterium* MS941. *B. megaterium* MS941 transformiert mit 1) pSMF2.1 (Negativkontrolle); 2) pSMF2.1C; 3) pSMF2.1CAA wurden bei 30°C in Komplexmedium kultiviert. Die Expression der Proteine wurde bei einer $OD_{578\text{ nm}}$ von 0.4 durch die Zugabe von 0.5 % Xylose (*w/v*) induziert. Die Probenahme erfolgte 24 h nach Induktion der Genexpression. Zellfreie Extrakte, hergestellt aus ca. 10^9 Zellen wurden mittels 15 %iger SDS-PAGE analysiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Färbung mit Coomassie Blau. M) Marker. Die schwarzen Boxen zeigen die überexprimierten Zielgene 2) CYP106A2 (~ 47.5 kDa) sowie 3) CYP106A2 und AdR (~ 51.5 kDa).

Rekombinantes Adx₄₋₁₀₈ ($M_r \sim 12$ kDa) konnte *via* SDS-PAGE leider nicht nachgewiesen werden, da es nahezu die gleiche Größe wie Lysozym ($M_r \sim 14.4$ kDa) besitzt (vgl. Abb. 3.33), welches zur Zellyse verwendet wurde.

Um trotzdem nachzuweisen, dass Adx zusammen mit CYP106A2 und AdR koexprimiert wird, wurden Western-Blot Analysen durchgeführt. Die Immunfärbung unter Verwendung primärer Antikörper gegen Adx, AdR und CYP106A2 zeigte, dass alle drei Proteine bei der gleichen Größe detektiert werden konnten wie die dazugehörigen gereinigten, rekombinanten Proteine aus *E. coli* (Abb. 3.34), welche als Positivkontrolle eingesetzt worden waren.

Somit konnte im Zuge dieser Arbeit erstmals ein rekombinantes Expressionssystem für Cytochrome P450 in *Bacillus megaterium* entwickelt werden (Bleif et al. 2011b).

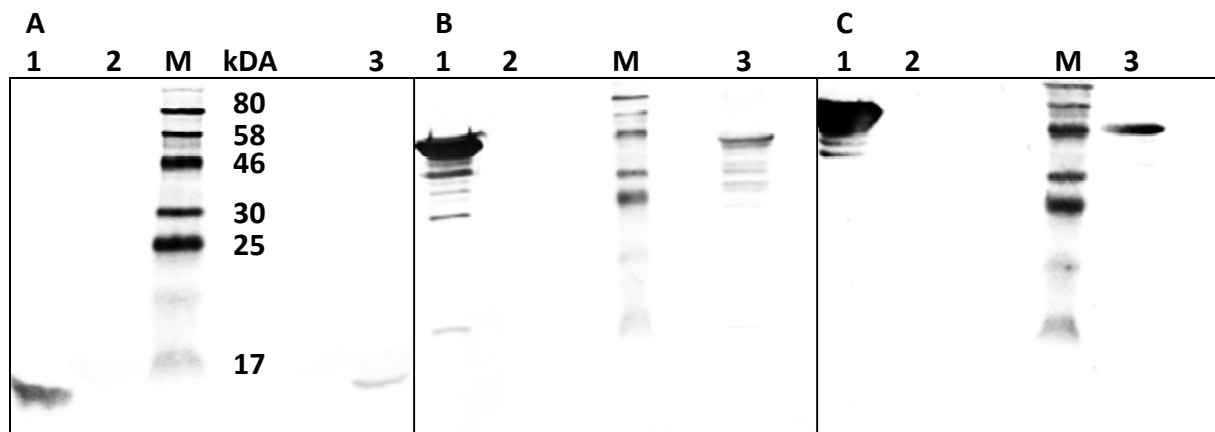


Abb. 3.34 Western-Blot Analyse, durchgeführt mit polyklonalen Antikörpern gegen A) Adx₄₋₁₀₈ (~ 12 kDa); B) AdR (~ 51.5 kDa) und C) CYP106A2 (~ 47.5 kDa). 1) Repräsentiert die Probe des jeweiligen gereinigten rekombinanten Proteins aus *E. coli* (Positivkontrolle) 2) Lysat von *B. megaterium*, transformiert mit pSMF2.1, 24 h nach Induktion (Negativkontrolle). 3) Lysat von *B. megaterium*, transformiert mit pSMF2.1CAA, 24 h nach Induktion, M) Marker.

3.4.3 CO-Differenzspektroskopie

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem in *Bacillus megaterium* MS941 überexprimierten CYP106A2 um ordnungsgemäß gefaltetes Cytochrom P450 mit integriertem Häm handelte, wurde mit den entsprechenden *B. megaterium* Lysaten (nach 24 h und 48 h Expression) ein CO-Differenzspektrum aufgenommen. Hierbei zeigten alle Proben ein Absorptionsmaximum bei 450 nm und somit einen erfolgreichen Einbau der prosthetischen Hämgruppe (Abb. 3.35). Die Ausbeute an CYP106A2 pro L Kulturmedium ist Tab. 3.3 zu entnehmen.

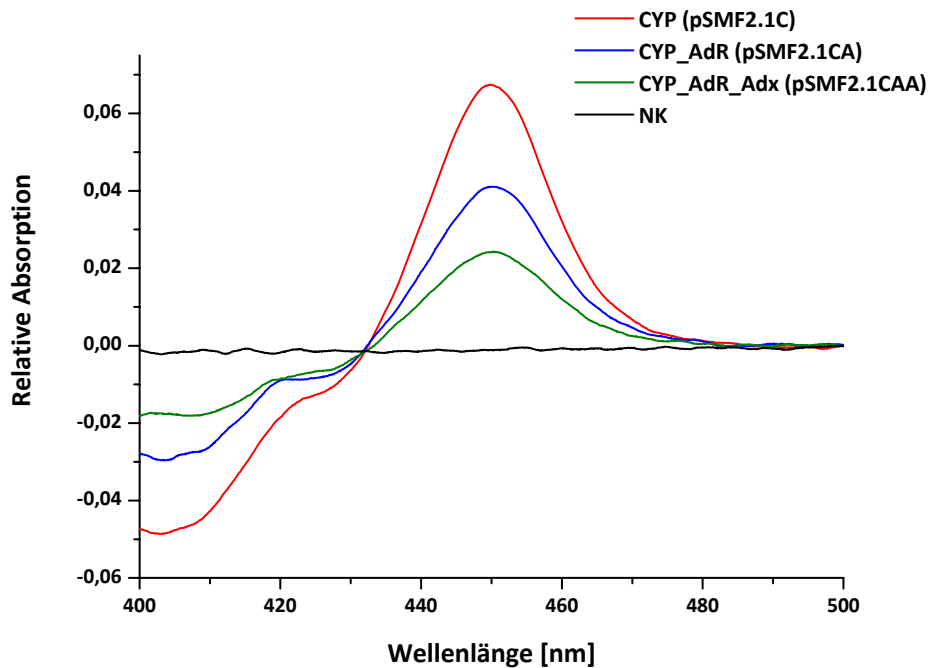


Abb. 3.35 CO-Differenzspektren von *B. megaterium* Lysaten (24 h Expression), die CYP106A2 (rot); CYP106A2 und AdR (blau) sowie CYP106A2, AdR und Adx (grün) enthielten. Die Negativkontrolle (NK) ist in schwarz dargestellt.

Tab. 3.3 Ausbeute an CYP106A2 pro L Kulturmedium nach 24 h und 48 h Expression.

Exprimierte Proteine	CYP106A2 (nmol/L Kultur)	CYP106A2 (nmol/L Kultur)
	Nach 24 h Expression	Nach 48 h Expression
CYP106A2 (pSMF2.1C)	741	1120
CYP106A2_AdR (pSMF2.1CA)	452	623
CYP106A2_AdR_Adx (pSMF2.1CAA)	267	335

Anhand der CO-Differenzspektren (Abb. 3.35) und der daraus errechneten Menge an CYP106A2 (Tab. 3.3) ist deutlich zu erkennen, dass sich der Cytochrom P450 Gehalt verringerte, je mehr Proteine koexprimiert wurden. Interessanterweise verringerte sich die P450 Ausbeute mit jedem zusätzlich exprimierten Enzym um etwa die Hälfte, so dass nach Koexpression von CYP106A2, AdR und Adx nur noch ca. 1/3 der P450 Menge im Vergleich zur alleinigen Expression von CYP106A2 erhalten wurde. Die gleichen Expressionsverhältnisse konnten auch nach einer 48 h Expressionsperiode nachgewiesen werden (Tab. 3.3).

3.4.4 Substratumsatz in *Bacillus megaterium* MS941

3.4.4.1 Umsatz von 11-Keto- β -boswelliasäure

Nachdem das P450 System erfolgreich in *Bacillus megaterium* MS941 exprimiert werden konnte, wurde untersucht, ob die Proteine auch katalytisch aktiv sind. Hierfür wurden Expressionskulturen von *B. megaterium* MS941, die entweder das Plasmid pSMF2.1CAA oder das Plasmid pSMF2.1 (Negativkontrolle) trugen, mit Xylose induziert und nach einer 24 h Expressionsperiode wurde zunächst das Substrat KBA (100 μ M) zugesetzt. Um weiterhin zu überprüfen, ob *B. megaterium* MS941 möglicherweise ein endogenes Elektronentransfersystem besitzt, das in der Lage ist, Elektronen auf CYP106A2 zu übertragen, wurden *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1C enthielten, verwendet. Nach einer 8 h Inkubationsperiode wurden die einzelnen Kulturen mit Chloroform extrahiert und mittels HPLC analysiert. Anhand der erhaltenen HPLC-Chromatogramme lässt sich erkennen, dass sowohl Zellen, die nur das P450 exprimierten (Abb. 3.36 A), als auch Zellen, die CYP106A2 und seine heterologen Redoxpartner bildeten (Abb. 3.36 B), in der Lage waren, das Substrat umzusetzen, wohingegen Zellen, die das Plasmid pSMF2.1 trugen, keinen Umsatz zeigten (Abb. 3.36 A und B).

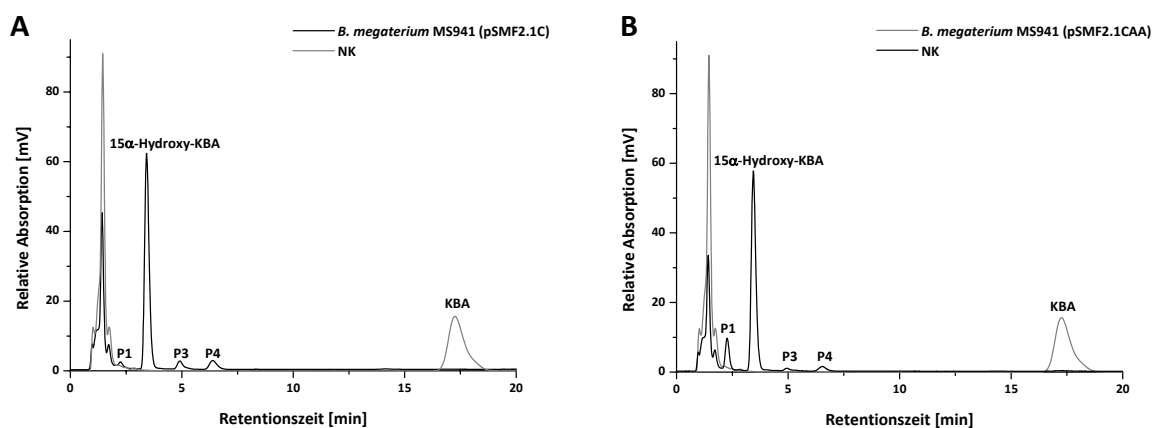


Abb. 3.36 HPLC-Chromatogramm des *in vivo*-Umsatzes von KBA (100 μ M) mit *B. megaterium* MS941. A) MS941 Zellen transformiert mit pSMF2.1C (schwarz) bzw. mit pSMF2.1 (Negativkontrolle (NK)) (grau). B) MS941 Zellen transformiert mit pSMF2.1CAA (schwarz) bzw. pSMF2.1 (Negativkontrolle (NK)) (grau). Die Reaktionen wurden in 50 ml Komplexmedium bei 30°C für 8 h durchgeführt. Die Ganzzellumsätze wurden mit Chloroform extrahiert und bis zur Trockne eingedampft. Die isokratische HPLC-Analyse erfolgte mit MeOH/H₂O (0.1 % TFA) (75/25). Die Verbindungen wurden bei 254 nm detektiert.

Somit scheint *B. megaterium* MS941 ein Elektronentransfersystem zu besitzen, welches erfolgreich mit CYP106A2 interagieren kann. Sowohl nach Expression des P450 allein als auch nach Koexpression von CYP106A2, Adx und AdR konnten die gleichen Produkte wie mit

dem *B. megaterium* Stamm ATCC 13368 bzw. wie mit dem rekonstituierten *in vitro* System erhalten werden (vgl. Abb. 3.6 und Abb. 3.27). Die Produkte eluierten mit Retentionszeiten von $t_R = 2.27 \pm 0.05$ min (P1), 3.44 ± 0.05 min (15 α -Hydroxy-KBA), 4.94 ± 0.05 min (P3) und 6.53 ± 0.05 min (P4). Die Säure besaß eine Retentionszeit von 17.26 ± 0.05 min. Weiterhin zeigte das Elutionsprofil Peaks mit kleineren Retentionszeiten $t_R = 0.76-2.07 \pm 0.05$ min als die von P1. Diese Peaks waren ebenfalls nach Extraktion des Komplexmediums ohne Zugabe der Säure vorhanden (Daten nicht gezeigt) und wurden somit Bestandteilen des Mediums zugeordnet. Überraschenderweise zeigten die beiden *B. megaterium* Stämme unterschiedliche Produktverteilungen. Die Zellen, die nur das Cytochrom exprimierten, bildeten die einzelnen Produkte zu 4.54 % (P1), 85.23 % (15 α -Hydroxy-KBA), 4.55 % (P3) und 5.68 % (P4), wohingegen Zellen, die CYP106A2, AdR und Adx koexprimierten, die Produkte zu 12.34 % (P1), 83.95 % (15 α -Hydroxy-KBA), 0.62 % (P3) und 3.09 % (P4) bildeten. Da beide Stämme das pentacyclische Triterpen innerhalb von 8 h vollständig zu den gewünschten Produkten konvertieren konnten, wurde im nächsten Schritt anhand eines zeitabhängigen Umsatzes von 100 μ M KBA (Abb. 3.37) untersucht, ob durch eine Koexpression der heterologen Redoxpartner Adx und AdR eine zusätzliche Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit erreicht werden kann oder ob das zelleigene Elektronentransfersystem ausreichend ist, um die gleichen Umsatzraten zu liefern.

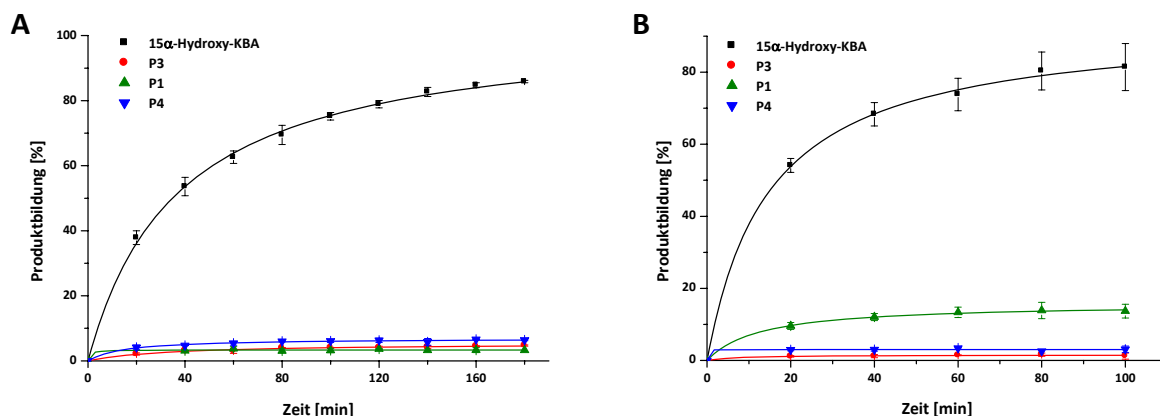


Abb. 3.37 Zeitabhängiger Umsatz von KBA (100 μ M) durch *B. megaterium* MS941. A) Umsatz von KBA durch MS941 Zellen, die CYP106A2 exprimierten. B) Umsatz von KBA durch MS941 Zellen, die CYP106A2, Adx und AdR exprimierten. Die Reaktionen wurden bei 30°C in 50 ml Komplexmedium durchgeführt. 500 μ l Umsatzproben wurden jeweils nach 20 min entnommen, mit Chloroform extrahiert und mittels HPLC analysiert. Die Standardabweichungen beziehen sich auf drei von einander unabhängig durchgeführte Reaktionen.

Die in Abb. 3.37 A dargestellte Graphik zeigt, dass MS941 Zellen, die nur CYP106A2 exprimierten, 100 μ M KBA innerhalb von 3 h vollständig umsetzen konnten. Allerdings

konnte durch eine zusätzliche Überexpression der heterologen Redoxpartner von CYP106A2 die Reaktionszeit für einen vollständigen Umsatz von 100 μM KBA auf 100 min reduziert werden (Abb. 3.37 B). Eine zusätzliche Koexpression von Adx und AdR führte also zu einer verminderten P450-Expression (vgl. 3.4.3), aber trotzdem zu schnelleren Umsatzraten. Dies deutet daraufhin, dass in diesem Ganzzellsystem die Konzentration der Redoxpartner den limitierenden Faktor darstellt.

Aufgrund der oben aufgeführten Ergebnisse wurde für alle weiteren *in vivo* Substratumsätze der *B. megaterium* MS941 Stamm verwendet, der CYP106A2, AdR und Adx koexprimiert.

3.4.4.2 Umsatz von 18 β -Glycyrrhetinsäure

Dieser Stamm war ebenfalls in der Lage, 18 β -Glycyrrhetinsäure zu den gleichen Produkten zu konvertieren, die bereits in der *in vitro* Reaktion und mit *B. megaterium* ATCC 13368 erhalten wurden (Abb. 3.38, vgl. Abb. 3.10 und Abb. 3.29).

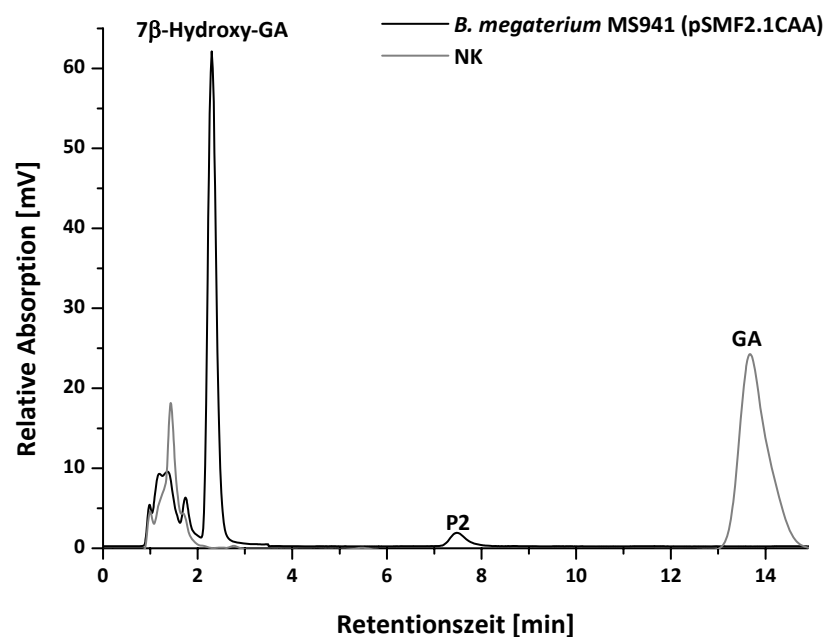


Abb. 3.38 HPLC-Chromatogramm des *in vivo* Umsatzes von GA (100 μM) mit *Bacillus megaterium* MS941 Zellen, transformiert mit pSMF2.1CAA (schwarz) bzw. mit pSMF2.1 (Negativkontrolle (NK)) (grau). Die Reaktionen wurden in 50 ml Komplexmedium bei 30°C für 8 h durchgeführt. Die Ganzzellumsätze wurden mit Chloroform extrahiert und bis zur Trockne eingedampft. Die isokratische HPLC-Analyse erfolgte mit MeOH/H₂O (0.1 % TFA) (75/25). Die Verbindungen wurden bei 254 nm detektiert.

Das Hauptprodukt 7 β -Hydroxy-GA eluierte nach $t_R = 2.30 \pm 0.05$ min und das Nebenprodukt P2 nach $t_R = 7.48 \pm 0.05$ min von der Säule. Das Substrat besaß eine Retentionszeit von 13.69

± 0.05 min. Das Hauptprodukt 7 β -Hydroxy-GA wurde zu 94.93 % und das Nebenprodukt zu 5.07 % gebildet.

3.4.4.3 Umsatz von Abietinsäure

Nach Interaktion von 100 μ M Abietinsäure mit dem Koexpressionsstamm von *B. megaterium* MS941 konnte nach 8 h ein vollständiger Umsatz des Diterpens mittels HPLC-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 3.39).

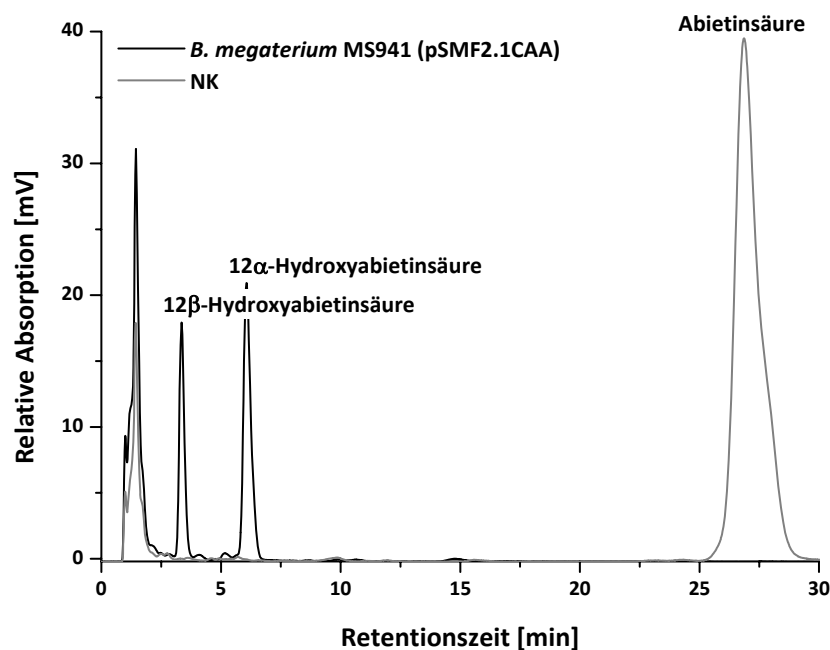


Abb. 3.39 HPLC-Chromatogramm des *in vivo* Umsatzes von Abietinsäure (100 μ M) mit *Bacillus megaterium* MS941 Zellen, transformiert mit pSMF2.1CAA (schwarz) bzw. mit pSMF2.1 (Negativkontrolle (NK)) (grau). Die Reaktionen wurden in 50 ml Komplexmedium bei 30°C für 8 h durchgeführt. Die Ganzzellumsätze wurden mit Chloroform extrahiert und bis zur Trockne eingedampft. Die isokratische HPLC-Analyse erfolgte mit MeOH/H₂O (0.1 % TFA) (75/25). Die Verbindungen wurden bei 254 nm detektiert.

Hierbei bildeten sich die gleichen Produkte, wie nach Reaktion mit den gereinigten Proteinen (vgl. Abb. 3.12) und dem natürlich hydroxylierenden *B. megaterium* Stamm ATCC 13368 (vgl. Abb. 3.24). Weiterhin konnte das gleiche Produktverhältnis von 12 α - und 12 β -Hydroxyabietinsäure wie in der *in vitro* Reaktion (vgl. Abb. 3.12) beobachtet werden. 12 β -Hydroxyabietinsäure retardierte nach $t_R = 3.35 \pm 0.05$ min von der Säule und das in Position 12 α hydroxylierte Abietinsäurederivat zeigte eine Retentionszeit von $t_R = 6.06 \pm 0.05$ min. Abietinsäure eluierte nach $t_R = 26.87 \pm 0.05$ min.

3.4.4.4 Umsatz von 17 α -Methyltestosteron

Im Fall von 17 α -Methyltestosteron konnte ebenfalls ein erfolgreicher Umsatz durch *B. megaterium* MS941 Zellen nachgewiesen werden. 500 μ M 17 α -Methyltestosteron konnten innerhalb von 8 h vollständig zu 15 β -Hydroxy-17 α -Methyltestosteron konvertiert werden. Das hydroxylierte Produkt besaß eine Retentionszeit t_R von 2.48 ± 0.05 min und das Substrat eine von 9.97 ± 0.05 min (Abb. 3.40).

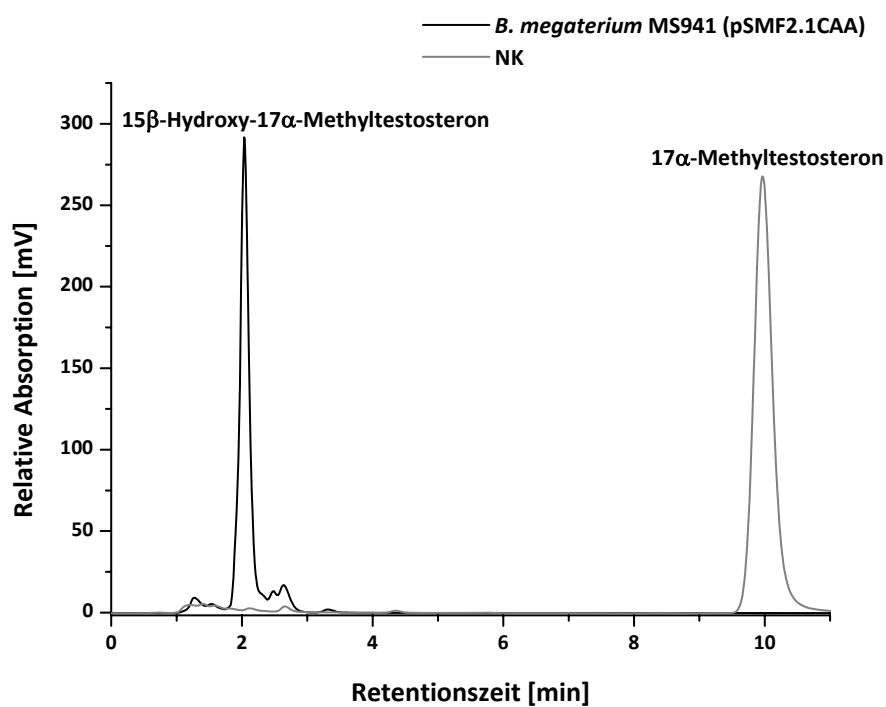


Abb. 3.40 HPLC-Chromatogramm des *in vivo* Umsatzes von Methyltestosteron (100 μ M) mit *Bacillus megaterium* MS941 Zellen, transformiert mit pSMF2.1CAA (schwarz) bzw. mit pSMF2.1 (Negativkontrolle (NK)) (grau). Die Reaktionen wurden in 50 ml Komplexmedium bei 30°C für 8 h durchgeführt. Die Ganzzellumsätze wurden mit Chloroform extrahiert und bis zur Trockne eingedampft. Die isokratische HPLC-Analyse erfolgte mit ACN/H₂O (40/60). Die Verbindungen wurden bei 240 nm detektiert.

3.5 Evaluierung des rekombinanten P450 Biokatalysators

Nachdem das neu entwickelte rekombinante P450 System in *Bacillus megaterium* MS941 erfolgreich zur Transformation der einzelnen Substrate angewendet werden konnte, wurde schließlich eine Evaluierung des neuen Biokatalysators durchgeführt, um zu untersuchen, ob durch eine Überexpression von CYP106A2 und seiner heterologen Redoxpartner eine Steigerung der Produktivität im Vergleich zum natürlich umsetzenden *B. megaterium* Stamm ATCC 13368 erreicht werden kann. Hierzu wurden mit beiden *B. megaterium* Stämmen zeitabhängige Substratumsätze durchgeführt und anschließend die erhaltenen relativen Produktbildungsrate und Selektivitäten miteinander verglichen.

3.5.1 11-Keto- β -boswelliasäure

Wie aus Abb. 3.41 A ersichtlich, wurde mit dem *B. megaterium* Stamm ATCC 13368 nach 24 h ein 100 %iger Umsatz von 100 μ M KBA und eine Selektivität von 80 % für das 15 α -hydroxylierte Produkt erreicht.

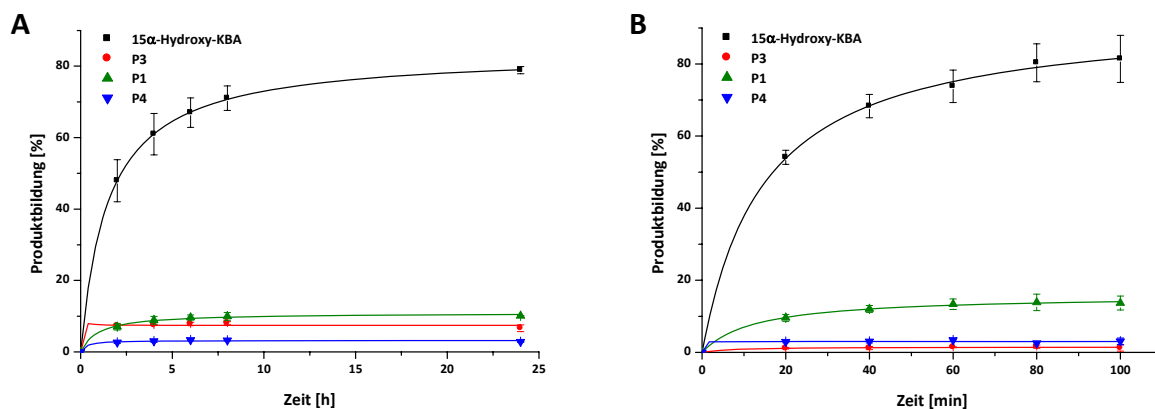


Abb. 3.41 A) Umsatz von 100 μ M KBA durch *B. megaterium* ATCC 13368. Die Reaktion wurde in 50 ml Komplexmedium bei 30°C durchgeführt. 500 μ l Proben wurden nach 2, 4, 6, 8, und 24 h entnommen, mit Chloroform extrahiert und mittels HPLC analysiert. B) Umsatz von 100 μ M KBA durch CYP106A2, AdR und Adx exprimierende *B. megaterium* MS941 Zellen. Der Umsatz wurde in 50 ml Komplexmedium bei 30°C durchgeführt. 500 μ l Proben wurden nach 20, 40, 60, 80, und 100 min entnommen, mit Chloroform extrahiert und mittels HPLC analysiert. Die Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Reaktionen ermittelt.

Der Umsatz von 100 μ M KBA durch den rekombinanten *B. megaterium* Stamm führte bereits nach 100 min zu einem vollständigen Umsatz des pentacyclischen Triterpens, wobei das Hauptprodukt 15 α -Hydroxy-KBA ebenfalls mit einer Selektivität von ca. 80 % gebildet wurde (Abb. 3.41 B). Beide Stämme bildeten die Nebenprodukte P1, P3 und P4 in der Summe zu etwa 20 %, allerdings wurden die einzelnen Nebenprodukte von beiden Stämmen mit unterschiedlichen Selektivitäten gebildet (Tab. 3.4). Die relative Produktivität konnte somit

durch Verwendung des Koexpressionssystems um den Faktor 15 gesteigert werden, was zu 560.7 mg 15 α -Hydroxy-KBA L⁻¹d⁻¹ führte, wobei der natürlich umsetzende Stamm ATCC 13368 nur eine relative Produktivität von 37.6 mg 15 α -Hydroxy-KBA L⁻¹d⁻¹ erreichte (Tab. 3.4) (Bleif et al. 2011b).

Tab. 3.4 Eckdaten zum zeitabhängigen Ganzzellumsatz von KBA in *B. megaterium*.

	<i>B. megaterium</i> ATCC 13368	<i>B. megaterium</i> MS941
Umsatz	100 % in 24 h	100 % in 100 min
Produktivität 15 α -Hydroxy-KBA	37.6 mg L ⁻¹ d ⁻¹	560.7 mg L ⁻¹ d ⁻¹
Selektivität 15 α -Hydroxy-KBA	80 %	83 %
Selektivität P1	7 %	13 %
Selektivität P3	10 %	1 %
Selektivität P4	3 %	3 %

3.5.2 18 β -Glycyrrhetinsäure

100 μ M 18 β -Glycyrrhetinsäure wurden von *B. megaterium* ATCC 13366 innerhalb von 24 h vollständig transformiert (Abb. 3.42 A). Das Hauptprodukt 7 β -Hydroxy-GA wurde hierbei zu 56 % gebildet und das Nebenprodukt P2 entstand zu 43 %.

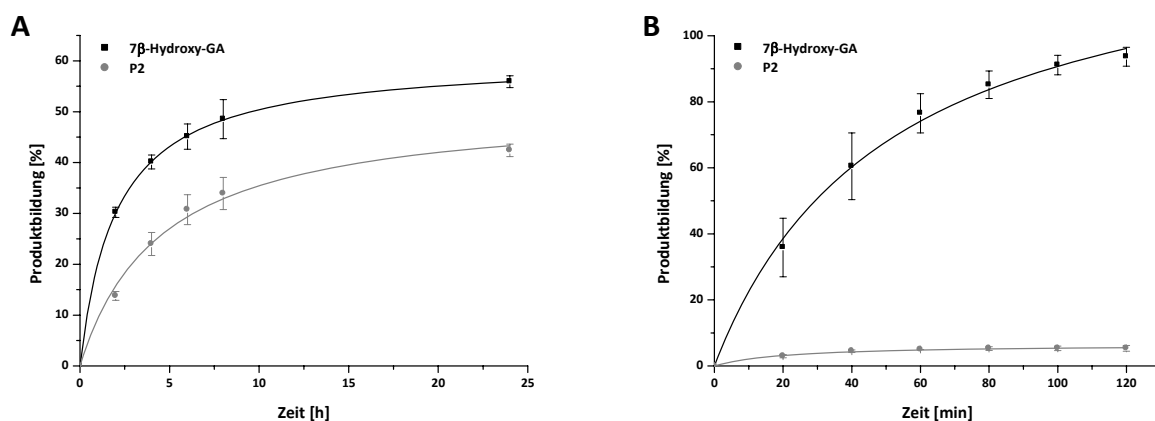


Abb. 3.42 A) Umsatz von 100 μ M GA durch *B. megaterium* ATCC 13368. Die Reaktion wurde in 50 ml Komplexmedium bei 30°C durchgeführt. 500 μ l Proben wurden nach 2, 4, 6, 8, und 24 h entnommen, mit Chloroform extrahiert und mittels HPLC analysiert. B) Umsatz von 100 μ M GA durch CYP106A2, AdR und Adx exprimierende *B. megaterium* MS941 Zellen. Der Umsatz wurde in 50 ml Komplexmedium bei 30°C durchgeführt. 500 μ l Proben wurden nach 20, 40, 60, 80, 100 und 120 min entnommen, mit Chloroform extrahiert und mittels HPLC analysiert. Die Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Reaktionen ermittelt.

Mit Hilfe des *B. megaterium* Stammes MS941, der CYP106A2, AdR und Adx koexprimiert, konnten dagegen 100 μM GA bereits innerhalb von 2 h vollständig in die gewünschten Produkte umgewandelt werden (Abb. 3.42 B). 7 β -Hydroxy-GA wurde in diesem System mit einer Selektivität von 94 % gebildet und das Produkt P2 mit einer Selektivität von 6 %. Mit *B. megaterium* ATCC 13368 wurde eine relative Produktivität von 27.2 mg 7 β -Hydroxy-GA L⁻¹d⁻¹ erreicht und der neu entwickelte Stamm zeigte eine relative Produktivität von 546 mg 7 β -Hydroxy-GA L⁻¹d⁻¹. Im Fall von GA konnte mit dem rekombinanten System also eine Steigerung der 7 β -Hydroxy-GA Bildung um das 20-fache erreicht werden.

Tab. 3.5 Eckdaten zum zeitabhängigen Ganzzellumsatz von GA in *B. megaterium*.

	<i>B. megaterium</i> ATCC 13368	<i>B. megaterium</i> MS941
Umsatz	100 % in 24 h	100 % in 120 min
Produktivität		
7 β -Hydroxy-GA	27.2 mg L ⁻¹ d ⁻¹	546.8 mg L ⁻¹ d ⁻¹
Selektivität		
7 β -Hydroxy-GA	56 %	94 %
Selektivität		
P2	43 %	6 %

3.5.3 Abietinsäure

100 μM des Diterpens Abietinsäure wurden vom natürlich umsetzenden *B. megaterium* Stamm ATCC 13368 nach 24 h vollständig zu 12 α - und 12 β -Hydroxyabietinsäure umgewandelt (Abb. 3.43 A). 12 α -Hydroxyabietinsäure wurde zu 40 % und 12 β -Hydroxyabietinsäure zu 60 % gebildet. Unter Einsatz des rekombinanten P450 Systems konnten 100 μM Abietinsäure nach 4 h gänzlich in Position 12 des Abietangerüsts regioselektiv hydroxyliert werden. Das Produkt 12 α -Hydroxyabietinsäure wurde in einer Selektivität von 62 % und 12 β -Hydroxyabietinsäure von 38 % erhalten (Abb. 3.43 B). *B. megaterium* ATCC 13368 bildete 12 β -Hydroxyabietinsäure mit einer relativen Produktivität von 19 mg L⁻¹d⁻¹ und 12 α -Hydroxyabietinsäure mit 12.8 mg L⁻¹d⁻¹.

Durch Verwendung des neuen Expressionssystems konnte die relative Produktivität für 12 α -Hydroxyabietinsäure mit 78.8 mg L⁻¹d⁻¹ um den Faktor sechs und für 12 β -Hydroxyabietinsäure mit 48.4 mg L⁻¹d⁻¹ um den Faktor 2.5 gesteigert werden.

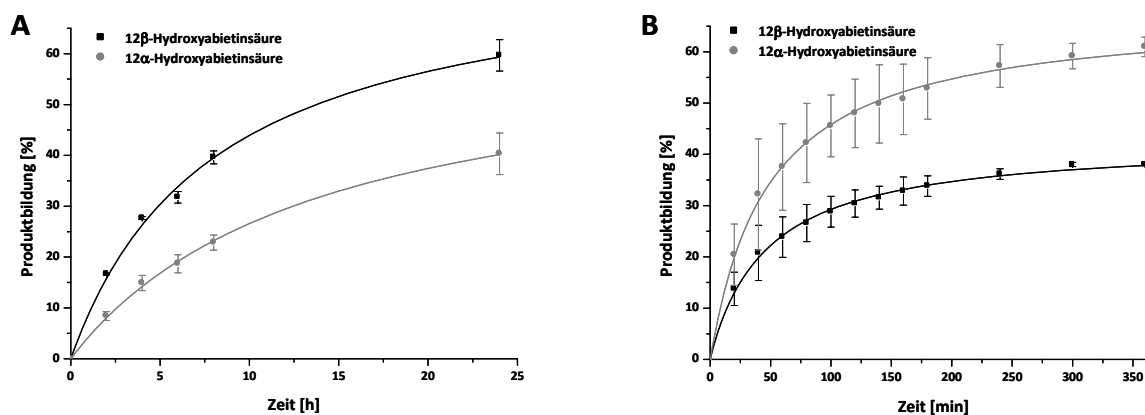


Abb. 3.43 A) Umsatz von 100 μM Abietinsäure durch *B. megaterium* ATCC 13368. Die Reaktion wurde in 50 ml Komplexmedium bei 30°C durchgeführt. 500 μl Proben wurden nach 2, 4, 6, 8, und 24 h entnommen, mit Chloroform extrahiert und mittels HPLC analysiert. B) Umsatz von 100 μM Abietinsäure durch CYP106A2, AdR und Adx exprimierende *B. megaterium* MS941 Zellen. Der Umsatz wurde in 50 ml Komplexmedium bei 30°C durchgeführt. 500 μl Proben wurden für 4 h alle 20 min entnommen, mit Chloroform extrahiert und mittels HPLC analysiert. Die Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Reaktionen ermittelt.

Tab. 3.6 Eckdaten zum zeitabhängigen Ganzzellumsatz von Abietinsäure in *B. megaterium*.

	<i>B. megaterium</i> ATCC 13368	<i>B. megaterium</i> MS941
Umsatz	100 % in 24 h	100 % in 4 h
Produktivität 12β-Hydroxyabietinsäure	19.0 mg L ⁻¹ d ⁻¹	48.4 mg L ⁻¹ d ⁻¹
Produktivität 12α-Hydroxyabietinsäure	12.8 mg L ⁻¹ d ⁻¹	78.8 mg L ⁻¹ d ⁻¹
Selektivität 12β-Hydroxyabietinsäure	60 %	38 %
Selektivität 12α-Hydroxyabietinsäure	40 %	62 %

3.5.4 17α-Methyltestosteron

Das 3-oxo-Δ⁴ Steroid 17α-Methyltestosteron (500 μM) konnte nach Inkubation mit *B. megaterium* ATCC 13368 innerhalb von 8 h vollständig zu 15β-Hydroxy-17α-Methyltestosteron umgesetzt werden (Abb. 3.44 A). Mit Hilfe des rekombinanten Systems konnte die Inkubationszeit für einen 100 %igen Umsatz des Steroids auf 3 h reduziert werden (Abb. 3.44 B). Der natürliche Stamm erreichte eine relative Produktivität von 477.7 mg 15β-Hydroxy-17α-Methyltestosteron L⁻¹d⁻¹ und der rekombinante Stamm von 1.27 g 15β-Hydroxy-17α-Methyltestosteron L⁻¹d⁻¹. Somit konnte eine Steigerung der Produktivität um das 2.7-fache erzielt werden.

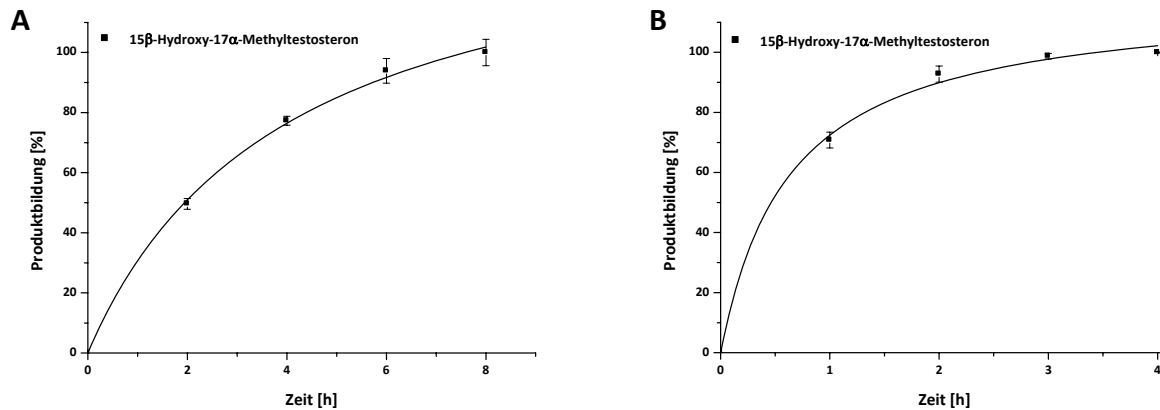


Abb. 3.44 A) Umsatz von 500 μM 17 α -Methyltestosteron durch *B. megaterium* ATCC 13368. Die Reaktion wurde in 50 ml Komplexmedium bei 30°C durchgeführt. 500 μl Proben wurden nach 2, 4, 6 und 8 h entnommen, mit Chloroform extrahiert und mittels HPLC analysiert. B) Umsatz von 500 μM 17 α -Methyltestosteron durch CYP106A2, AdR und Adx exprimierende *B. megaterium* MS941 Zellen. Der Umsatz wurde in 50 ml Komplexmedium bei 30°C durchgeführt. 500 μl Proben wurden nach 1, 2, 3 und 4 h entnommen, mit Chloroform extrahiert und mittels HPLC analysiert. Die Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Reaktionen ermittelt.

Tab. 3.7 Eckdaten zum zeitabhängigen Ganzzellumsatz von 17 α -Methyltestosteron in *B. megaterium*.

	<i>B. megaterium</i> ATCC 13368	<i>B. megaterium</i> MS941
Umsatz	100 % in 8 h	100 % in 3 h
Produktivität 15 β -Hydroxy-17 α - Methyltestosteron	477.7 mg L ⁻¹ d ⁻¹	1.27 g L ⁻¹ d ⁻¹
Selektivität 15 β -Hydroxy-17 α - Methyltestosteron	100 %	100 %

Somit konnte durch Verwendung des rekombinanten Systems für alle eingesetzten Substrate eine deutliche Verbesserung der relativen Produktivitäten erzielt werden.

4 Diskussion und Ausblick

Das Hauptanliegen dieser Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung neuer potentieller Substrate der 15 β -Hydroxylase (CYP106A2) aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368, um zum einen einen besseren Einblick in die Substratspezifität und Substratbindung dieses Enzyms zu erhalten und zum anderen das auf 3-oxo- Δ^4 -Steroiden basierte Substratspektrum um neue Substanzklassen zu erweitern. Weiterhin sollte ein CYP106A2 abhängiger Ganzzellbiokatalysator entwickelt werden, um mg-Mengen der entsprechenden Produkte für NMR-spektroskopische Studien zu gewinnen und um erste Charakterisierungen dieses P450 basierten Ganzzellumsatzes durchzuführen. Diese Arbeiten sollten eine erste Grundlage für eine mögliche biotechnologische Anwendung von CYP106A2 schaffen. Die vorliegende Fragestellung wurde durch den Einsatz einer Vielzahl verschiedener Methoden verfolgt. Dies beinhaltete zum ersten die Identifizierung möglicher Substrate anhand von Strukturvergleichen mit Verbindungen, die bereits von CYP106A2 konvertiert wurden und der anschließenden Verifizierung dieser Auswahl durch differenzspektroskopische Studien und den Einsatz eines *in vitro* Rekonstitutionsassays zur eindeutigen Identifikation von Substratumsatz und Produktbildung. Neu entdeckte Substrate wurden *in vitro* durch die Bestimmung von Bindungskonstanten zum Enzym und durch die Ermittlung kinetischer Parameter charakterisiert. Zusätzlich zu diesen Experimenten wurden mit Substraten, die keinen high-spin Shift in CYP106A2 induzieren konnten, molekulare Docking-Kalkulationen durchgeführt, um erste Einblicke in eine mögliche Bindung und Orientierung dieser Verbindungen im aktiven Zentrum des Enzyms zu erhalten. Durch den Einsatz des *B. megaterium* Stammes ATCC 13368, der sowohl CYP106A2 als auch seine homologen Redoxpartner endogen beinhaltet, wurden ausreichende Mengen einzelner Produkte synthetisiert, um die exakte Hydroxylierungsposition im Molekül durch NMR-Spektroskopie zu bestimmen. Zur Steigerung der Produktivität dieses natürlichen Ganzzellsystems wurde zusätzlich ein CYP106A2 abhängiges rekombinantes Expressionssystem für *Bacillus megaterium* entwickelt, welches ebenfalls erfolgreich zum Umsatz der Substrate eingesetzt werden konnte.

Im Folgenden sollen die im Zuge dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse ausführlich diskutiert werden.

4.1 Substratspezifität und Substratbindung

Das breitgefächerte Substratspektrum der Cytochrome P450 macht sie für zahlreiche Anwendungen äußerst interessant. Um dieses Anwendungspotential voll ausschöpfen zu können, sind fundierte Kenntnisse über die Substratspezifität unabdingbar. Diese Kenntnisse können dazu verwendet werden, bereits frühzeitig Struktur-Funktionsbeziehungen aufzuklären oder um potentielle Substrate leichter vorauszusagen. Speziell die Anwendung bakterieller P450 ist in diesem Zusammenhang hervorzuheben, da sie sich oft durch höhere Substratspezifitäten auszeichnen als beispielsweise ihre menschlichen Gegenspieler.

Bereits vor mehr als 30 Jahren wurden erste Untersuchungen zur Substratspezifität von CYP106A2 durchgeführt, anhand derer postuliert wurde, dass CYP106A2 lediglich 3-oxo- Δ^4 -Steroide umzusetzen vermag (Berg et al. 1976). Diese These konnte bereits im Zuge meiner Diplomarbeit durch die Identifizierung der Dihydroquinopimarsäure und des pentacyclischen Triterpens 11-Keto- β -boswelliasäure als Substrate von CYP106A2 eindeutig widerlegt werden. Anhand von Strukturvergleichen unterschiedlicher Verbindungen mit diesen carbonsäurehaltigen Substraten von CYP106A2 wurden fünf weitere potentielle Substrate ausgewählt, mit denen eingehende Untersuchungen zur Substratspezifität und Substratbindung von CYP106A2 durchgeführt wurden. Durch Auswahl der vier pentacyclischen Triterpensäuren 18 β -Glycyrrhetinsäure, Ursolsäure, Oleanolsäure und Betulinsäure, die eine deutliche Strukturverwandschaft zu KBA aufweisen (vgl. Abb. 3.1 und Abb. 3.3), wurde untersucht, welche Rolle die Carbonsäurefunktion im Triterpengerüst bei der Substratbindung spielt. Alle ausgewählten Triterpensäuren induzierten in CYP106A2 einen high-spin shift, der durch Verdrängung eines Wassermoleküls im aktiven Zentrum des Enzyms hervorgerufen wird (Podust et al. 2007).

Das Gleichgewicht zwischen low- und high-spin Zustand kann zur Bestimmung von Bindungskonstanten herangezogen werden. Die K_D -Werte der pentacyclischen Triterpensäuren variierten untereinander stark (vgl. Tab. 3.1). Die stärkste Bindung zu CYP106A2 zeigte Oleanolsäure mit einem K_D -Wert von $5.89 \pm 0.25 \mu\text{M}$ und die schwächste Bindung wurde für 18 β -Glycyrrhetinsäure mit einer Dissoziationskonstanten von $65.19 \pm 1.01 \mu\text{M}$ bestimmt. Anhand der ermittelten K_D -Werte kann eine Einordnung der Säuren hinsichtlich ihrer Affinität zu CYP106A2 wie folgt angegeben werden:



Vergleicht man die Stärke der Bindung mit den einzelnen Strukturformeln, so fällt auf, dass die Position der Carbonsäurefunktion im Triterpengerüst einen entscheidenden Einfluss auf die Stärke der Substratbindung im aktiven Zentrum von CYP106A2 ausübt. Weiterhin ergibt sich aus den erhaltenen Ergebnissen, dass die Keto-Gruppe an Position 11 (vgl. Abb. 4.1) im Triterpengerüst kein essentielles Strukturmotiv für die Bindung von Triterpensäuren im aktiven Zentrum von CYP106A2 darstellt.

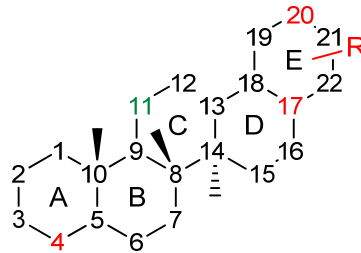


Abb. 4.1 Pentacyclische Triterpenstruktur. Positionen, an denen funktionelle Gruppen einen entscheidenden Einfluss auf die Stärke der Substratbindung im aktiven Zentrum von CYP106A2 ausüben sind rot dargestellt. Positionen, an denen funktionelle Gruppen nicht essentiell für eine Bindung im aktiven Zentrum sind, sind grün dargestellt.

So besitzen Oleanolsäure, Betulinsäure und Ursolsäure, in denen die Carbonsäurefunktion zwischen dem D- und E-Ring des Triterpengerüsts (Position 17) angesiedelt ist, die höchsten Affinitäten zur 15 β -Hydroxylase. KBA und GA, bei denen die Carbonsäurefunktion am A-Ring (Position 4) bzw. E-Ring (Position 20) positioniert ist, zeigen dagegen die schwächsten Bindungen zum Enzym, wobei die Lokalisierung am E-Ring eindeutig zur niedrigsten Affinität führt (vgl. Abb. 4.1). Die Substituenten am E-Ring scheinen generell einen erheblichen Einfluss auf die Stärke der Substratbindung auszuüben (vgl. Abb. 4.1). Ursolsäure und Oleanolsäure, die sich lediglich durch die Position der β -ständigen Methylgruppe am E-Ring voneinander unterscheiden, zeigten deutlich unterschiedliche Affinitäten zu CYP106A2. Befindet sich die Methylgruppe an Position 19 (Ursolsäure), so ist der K_D -Wert im Vergleich zu einer Lokalisierung an Position 20 (Oleanolsäure) um den Faktor 4 erhöht. Dagegen scheint ein α -ständiger sterisch anspruchsvoller Substituent, wie im Fall der Betulinsäure, der unter die Ringebene ragt, einen deutlich geringeren Einfluss auf die Bindungsstärke auszuüben. Die erhaltenen Bindungskonstanten sind im Vergleich zu anderen P450-Systemen sehr groß, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die pentacyclischen Triterpensäuren nicht die physiologischen Substrate von CYP106A2 darstellen. Für P450_{cam} wurde beispielsweise mit seinem natürlichen Substrat Campher ein K_D -Wert von 1.8 μ M

erhalten (Kim et al. 2008) und P450_{cin} zeigte nach Interaktion mit Cineol eine Dissoziationskonstante von 0.7 μM (Hawkes et al. 2002).

Mit der Auswahl der zur Dihydroquinopimarsäure strukturell ähnlichen Diterpenresinsäure Abietinsäure, die im Gegensatz zur Dihydrochinopimarsäure kein Keto-en Motiv besitzt, wurde untersucht, ob das alleinige Vorhandensein einer Carbonsäurefunktion im Diterpengerüst ausreichend für eine Bindung und einen Umsatz mit CYP106A2 ist. Abietinsäure zeigte mit CYP106A2 keinen high-spin Shift, konnte allerdings erfolgreich durch das Enzym umgesetzt werden (vgl. Abb. 3.12). Dieses Phänomen war bereits von den steroidal Substraten von CYP106A2 bekannt und konnte zwischenzeitlich auch bei anderen P450, wie beispielsweise P450_{mor} und seinem Substrat Morpholin beobachtet werden (Sielaff und Andreesen 2005). Eine Bindung von DOC in der Nähe der prosthetischen Häm-Gruppe von CYP106A2 konnte lediglich durch Infrarotspektroskopie nachgewiesen werden (Simgen et al. 2000). Daraus lässt sich folgern, dass Abietinsäure ebenso wie die bisher als Substrate von CYP106A2 bekannten 3-oxo- Δ^4 -Steroide zu klein ist, um das Wassermolekül an der sechsten Position des Häm-Eisens zu verdrängen. Cholestenon mit seiner langen, hydrophoben Seitenkette am C-Atom C17 des Steroidgerüsts, Dihydroquinopimarsäure mit der zusätzlich am C-Ring verknüpften Ringstruktur, sowie alle pentacyclischen Triterpensäuren sind dagegen groß genug, um das Lösemittelmolekül zu verdrängen und einen high-spin Shift in CYP106A2 zu induzieren. Somit wäre es sicherlich interessant, weitere Di- und Triterpene mit sterisch anspruchsvollen Substituenten hinsichtlich eines möglichen high-spin Shifts mit CYP106A2 zu untersuchen.

Um trotzdem einen Einblick in die Substratbindung und Orientierung von Abietinsäure im aktiven Zentrum von CYP106A2 zu erhalten, wurden molekulare Docking-Studien basierend auf einem von Lisurek *et al.* entwickelten Homologiemodell von CYP106A2 durchgeführt (Lisurek et al. 2008). Das Substrat 17 α -Methyltestosteron, welches ein 3-oxo- Δ^4 -Motiv beinhaltet, wurde ebenfalls in das aktive Zentrum von CYP106A2 gedockt, um mögliche Unterschiede in den Bindungsmodi der beiden Substrate zu identifizieren.

Beide Substrate konnten mit FlexX (Rarey et al. 1997; Rarey et al. 1996) in die Substratbindetasche des Homologiemodells gedockt werden. Die Dockingsoftware FlexX wurde verwendet, weil sie sich schon im Docken des Substrates Progesteron in das aktive Zentrum von CYP106A2 als probat erwiesen hat (Lisurek et al. 2008). Die Lage des Substrates im gedockten Komplex wurde von Lisurek nicht nur durch computergestützte

Evaluierungsprogramme sondern auch experimentell durch ortsgerichtete Mutagenese an der Substratbindung beteiligter Aminosäuren verifiziert (Lisurek et al. 2008).

Die erhaltenen Bindungsmodi für Abietinsäure bzw. Methyltestosteron (vgl. Abb. 3.14 und Abb. 3.16) stimmten sehr gut mit dem tatsächlichen in *in vitro* Reaktionen erhaltenen Hydroxylierungsmuster der Substrate überein (vgl. Abb. 3.9 und Abb. 3.13), da im Fall von Abietinsäure das C-Atom C12 und im Fall von Methyltestosteron das C-Atom C15 direkt über dem Häm-Eisen platziert war. Die Abstände der Hydroxylierungspositionen zum Häm-Eisen betragen jeweils etwa 7 Å und sind somit relativ groß, allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass das Programm FlexX das Substrat zwar erst in der Bindetasche aufbaut, die Proteinstruktur allerdings starr beibehalten wird. Cytochrome P450 führen während der Katalyse jedoch Konformationsänderungen durch (Pylypenko und Schlichting 2004). So wurde beispielsweise bei der Hydroxylierung der Fettsäure Laurat durch CYP102A1 eine Wanderung des Substrats während der Reduktion des Eisenatoms um 6 Å näher zum Häm hin beobachtet (Modi et al. 1996; Maves et al. 1997). Während des Durchlaufens des katalytischen Zyklus könnten somit auch die Substrate im aktiven Zentrum von CYP106A2 näher zum Häm-Eisen rücken, um einen optimalen Abstand für die Hydroxylierung zu erreichen. Zur näheren Verifizierung dieser Annahme müssten allerdings substratfreie und substratgebundene Kristallstrukturen des Enzyms miteinander verglichen werden. Mit Hilfe der gedockten Substratkomplexe konnten die Aminosäuren abgeleitet werden, die möglicherweise mit den Substraten Abietinsäure und 17 α -Methyltestosteron interagieren und in die von Lisurek *et al.* identifizierten Substraterkennungsstellen (SRSs) von CYP106A2 eingeordnet werden (Tab. 4.1). Diese Aminosäuren konnten demnach dem B`/C-Loop (SRS 1), der B`-Helix (SRS 1), dem β -Faltblatt β 1-4 (SRS 5) sowie der I-Helix (SRS 4) von CYP106A2 zugeordnet werden. Die B`-Helix-Region stellt neben der F- und G-Helix in den Strukturen der Cytochrome P450 eine der variabelsten Regionen dar. Deshalb spielen diese Bereiche eine wichtige Rolle bei der Positionierung des Substrates im aktiven Zentrum dieser Enzyme (Hasemann et al. 1995).

Tab. 4.1 Anhand des Dockings abgeleitete Aminosäuren, die möglicherweise mit den Substraten 17 α -Methyltestosteron bzw. Abietinsäure interagieren unter Angabe ihrer Wechselwirkung mit dem Substrat und der Einordnung in die jeweilige SRS.

Substrat Funktionelle Gruppe	Aminosäure	Interaktion	SRS (Strukturmotiv)
17α-Methyltestosteron			
17 β -Hydroxygruppe	T89	H-Brückenbindung	1 (B`/C-Loop)
3-Keto-Gruppe	E78	H-Brückenbindung	1 (B`-Helix)
Abietinsäure			
Carbonsäure (12 α -Hydroxylierung)	R66 bzw. E78	H-Brückenbindung	1 (B`-Helix)
Carbonsäure (12 β -Hydroxylierung)	D295 bzw. E78	H-Brückenbindung	5 (β 1-4)/ 1 (B`-Helix)
Isopropylgruppe	L239 und L291	Stabilisierung des Substrats über dem Häm-Eisen	4 (I-Helix)/ 5 (β 1-4)

Diese Tatsache konnte bereits von Virus *et al.* mit der Generation von Mutanten in der SRS 1 von CYP106A2 experimentell bestätigt werden. So konnte sie zeigen, dass die Mutation T89N in der Dreiermutante T89N/A106T/R409L für die Änderung der Regioselektivität bei der Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol und Progesteron verantwortlich ist (Virus 2006). Durch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse konnte somit untermauert werden, dass die Aminosäure T89 einen erheblichen Einfluss auf die Bindung von Steroiden im aktiven Zentrum von CYP106A2 hat. Zukünftig wäre es daher sicherlich interessant zu überprüfen, ob die beschriebene Dreiermutante ebenfalls einen Einfluss auf die Regioselektivität der Hydroxylierung von 17 α -Methyltestosteron ausübt. Für die Aminosäure E78, die sich ebenfalls in der SRS 1 befindet, konnte Lisurek *et al.* bereits eine Interaktion mit Progesteron nachweisen und Virus *et al.* postulierte für die Mutante E78V eine mögliche Beeinflussung der Regiospezifität bei der Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol (Lisurek 2004; Virus 2006). Für diese Aminosäure wurde ebenfalls eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung mit der Carbonsäurefunktion von Abietinsäure identifiziert, deshalb wäre eine Sättigungsmutagenese dieser Position sicherlich hilfreich, um die genaue Wirkung dieser Aminosäure auf die Bindung unterschiedlicher Substrate in CYP106A2 zu verifizieren. Die der I-Helix zugeordnete Aminosäure L239 führt zu einer Stabilisierung von Abietinsäure über dem Häm-Eisen durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Isopropylgruppe des Substrats. Aminosäuren, die dieser Helix zugeordnet werden, wird eine Beteiligung an der

Substratspezifität und/oder an der Reaktionskinetik zugeschrieben (Hasemann et al. 1995). Rauschenbach *et al.* konnte in CYP106A2 durch die Mutante L239A eine Erhöhung der 15 β -Hydroxylaseaktivität gegenüber Progesteron um das 1.5-fache im Vergleich zum Wildtyp nachweisen. Desweiteren wird Aminosäuren, die sich im β -Faltblatt β 1-4 befinden, ebenfalls ein Einfluss auf die Substratspezifität beigemessen. Aminosäuren in dieser Region (L291 und D295) wurden im Zuge dieser Arbeit als mögliche Interaktionspartner der Abietinsäure identifiziert. In zukünftigen Arbeiten könnte der Einfluss dieser Aminosäuren auf die Substratspezifität von CYP106A2 mittels Mutagenesemethoden näher verifiziert werden. Als ebenfalls erstrebenswert anzusehen wäre eine weitere Evaluierung des vorliegenden Homologiemodells durch zusätzliche bioinformatische Studien. Molekulare Dockingexperimente liefern zuverlässige Ergebnisse für die Platzierung des Liganden im aktiven Zentrum und erlauben weiterhin eine strukturelle Interpretation experimenteller Ergebnisse. Eine detaillierte, quantitative Studie von energetischen Unterschieden in der Substratbindung und im Substratumsatz ist allerdings nur durch computergestützte Simulationen basierend auf biophysikalischer Molekulardynamik oder durch quantenmechanische Untersuchungen möglich.

4.2 *In vitro* Substratumsatz und katalytische Aktivität

Die Induktion eines Typ-I Spektrums ist zwar eine gute, aber nicht zwingende Voraussetzung für einen P450-abhängigen Substratumsatz und organische Verbindungen können von Cytochromen P450 konvertiert werden, obwohl sie keine Verschiebung der Soret-Bande von ~ 420 nm nach ~ 390 nm induzieren. Deshalb wurde mit Hilfe eines *in vitro*-Rekonstitutionsassays verifiziert, ob die bisher auf Substratbindung im aktiven Zentrum untersuchten Verbindungen auch tatsächlich von CYP106A2 umgesetzt werden. Aufgrund der Tatsache, dass die natürlichen Elektronentransferpartner von CYP106A2, Megaredoxinreduktase und Megaredoxin, bisher nicht kloniert wurden, erfolgte die Durchführung des Rekonstitutionsassays mit den heterologen, bovinen Redoxpartnern Adx₄₋₁₀₈ und AdR, die bereits erfolgreich zum Umsatz bisher bekannter Substrate von CYP106A2 eingesetzt wurden (Lisurek et al. 2004; Virus und Bernhardt 2008). Die verkürzte Mutante von Adx wurde verwendet, weil mit ihr ein effizienterer Elektronentransfer zu CYP106A2 erreicht wird als mit WT-Adx. Die einzelnen Reaktionsansätze wurden anschließend mit Hilfe von HPLC-Messungen auf eine erfolgreiche Produktbildung untersucht.

Im HPLC-Chromatogramm zeigte sich nach Umsatz von 17α -Methyltestosteron neben dem Substratpeak ein weiterer prominenter Peak (vgl. Abb. 3.8). Die dazugehörige Verbindung wurde mit Hilfe von NMR-Spektroskopie eindeutig als 15β -Hydroxy- 17α -Methyltestosteron identifiziert (vgl. 3.3.1). Eine Hydroxylierung von 17α -Methyltestosteron in 15β -Position ist bisher noch nicht publiziert, so dass im Zuge dieser Arbeit erstmalig eine Synthese dieses Steroidderivats erfolgreich durchgeführt wurde. Steroide und ihre Derivate sind für die pharmazeutische Industrie sehr interessant, da sie zur Produktion von diuretischen, anabolischen, kontrazeptiven, antiandrogenen, entzündungshemmenden und antikanzerogenen Medikamenten verwendet werden (Hannemann et al. 2006). 17α -Methyltestosteron ist eine anabolisch-androgene Verbindung, die in Kombination mit Östrogenen in den Vereinigten Staaten von Amerika in der Hormonersatztherapie bei Frauen in der Menopause verwendet wird (Watts et al. 1995). Weiterhin konnte durch 17α -Methyltestosteron eine inhibierende Wirkung der Aromatase (CYP19) festgestellt werden, weshalb diese Verbindung und ihre Derivate für eine mögliche Vorbeugung oder Behandlung von hormonsensitiven Krebsarten wie z.B. Brustkrebs in Frage kommen könnten (Mor et al. 2001). Die Fähigkeit zur Hydroxylierung von Steroiden wurde auch für einige andere *Bacillus* stämmige Cytochrome P450 beschrieben. Eine Hydroxylierung von Methyltestosteron wurde bisher durch CYP109B1 und CYP134A1 aus *Bacillus subtilis* (Furuya et al. 2008) sowie durch ein zur CYP106 Familie zugehöriges P450 aus *Bacillus cereus* ATCC 10987 gezeigt (Furuya et al. 2009). Allerdings wurden hier keine Angaben zur genauen Hydroxylierungsposition gemacht. Weiterhin akzeptierte das aus *Bacillus cereus* stammende P450, ebenso wie CYP106A2, Progesteron als Substrat. Somit scheint die Fähigkeit zur Hydroxylierung von Steroiden unter *Bacillus* Arten weit verbreitet. Dies macht sie für biotechnologische Prozesse umso reizvoller, da eine stereoselektive Steroidhydroxylierung durch traditionelle chemische Synthesen sehr schwierig, zeitaufwendig und kostenintensiv ist. Aus diesem Grund erfolgen industriell durchgeführte 11α -, 11β -, 15α -, und 16α -Hydroxylierungen von Steroiden heute ausschließlich durch mikrobielle Transformationen (Furuya et al. 2009). Ein zukünftiger Einsatz von CYP106A2 wäre hier sicherlich ebenfalls denkbar.

Die Diterpenresinsäure Abietinsäure, die wie 17α -Methyltestosteron nicht in der Lage war, einen high-spin Shift in CYP106A2 zu induzieren, wurde ebenfalls erfolgreich durch das Enzym umgesetzt. Die Annahme, Abietinsäure aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zur

Dihydroquinopimarsäure als potentiell Substrat von CYP106A2 zu betrachten, konnte damit experimentell bestätigt werden. CYP106A2 konvertierte die Säure zu zwei Produkten (vgl. Abb. 3.12), die nach NMR-Messungen als 12 α - und 12 β -Hydroxyabietinsäure identifiziert wurden (vgl. 3.3.2). Diese Art von Reaktion war bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht für bakterielle P450 beschrieben, so dass CYP106A2 im Rahmen dieser Arbeit als erste bakterielle Diterpenhydroxylase identifiziert wurde, die eine regioselektive allylische Hydroxylierung in einem Schritt katalysiert (Bleif et al. 2011a). Diese von CYP106A2 katalysierte Reaktion ist auf chemischem Wege nur durch starke Oxidationsmittel zu erreichen (Bicas et al. 2009). So konnte 12 α -Hydroxyabietinsäure bisher nur durch chemische Oxidation von Levopimarsäure dargestellt werden (Herz et al. 1965; Krohn et al. 1992). Eine Synthese von 12 β -Hydroxyabietinsäure wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben, so dass diese Verbindung erstmals in dieser Arbeit erfolgreich hergestellt wurde.

Das Substratspektrum von CYP106A2 konnte infolgedessen um die Substanzgruppe der Diterpene erweitert werden. Die zu dieser Substanzklasse gehörigen Pflanzenterpenoide zeichnen sich durch vielseitige biologische Aktivitäten aus, so finden sie eine breitgefächerte Anwendung als Medikamente, Pestizide, Geschmacks- und Duftstoffe und als Nahrungsergänzungsmittel in Form von Vitaminen und Süßstoffen (Bohlmann und Keeling 2008). Diterpenresinsäuren sind wichtige Verteidigungsverbindungen von Nadelhölzern gegen Pflanzenfresser und Krankheitserreger, weshalb sie für die Entwicklung neuartiger Pestizide verwendet werden könnten. Zusätzlich zeigte Abietinsäure antiallergische, entzündungshemmende, phytoalexin-ähnliche sowie krampflösende Eigenschaften (González et al. 2009). Diese Eigenschaften macht sie zu einer optimalen Zielverbindung für weitere strukturelle Modifikationen, um ihre bereits existierende biologische Aktivität weiter zu steigern. Durch die von CYP106A2 katalysierte Hydroxylierung konnten erste Strukturmodifikationen erreicht werden und es wäre durchaus interessant, die korrespondierenden Reaktionsprodukte in weiterführenden Arbeiten auf ihre mögliche biologische Aktivität hin zu untersuchen. Um tiefere Einblicke in die Substratspezifität von CYP106A2 gegenüber der Substanzklasse der Diterpene zu erhalten, könnten weitere zur Abietinsäure strukturverwandte Verbindungen wie z.B. Levopimarsäurederivate ausgewählt und auf einen möglichen Substratumsatz getestet werden.

Die *in vitro* Reaktionsansätze der Triterpensäuren Betulinsäure, Oleanolsäure und Ursolsäure

konnten mittels HPLC nicht analysiert werden, da sie im Gegensatz zu den 3-oxo- Δ^4 -Steroiden und Abietinsäure kein Chromophor besitzen, welches ihre Detektion und die ihrer Derivate bei 240 bzw. 254 nm erlaubt. Eine Detektion der Verbindungen bei 210 nm scheiterte aufgrund der hohen Eigenabsorption des verwendeten Laufmittels und selbst der Wechsel zu „gradient-grade“ Methanol brachte nicht den gewünschten Erfolg. Eine fundierte Aussage über eine mögliche Produktbildung könnte aber mit Hilfe von GC-MS Analysen getroffen werden. Es ist allerdings davon auszugehen, dass diese Verbindungen ebenfalls als Substrate von CYP106A2 fungieren, da von Chatterjee *et al.* bereits ein Umsatz von Betulinsäure durch den *Bacillus megaterium* Stamm ATCC 13368 beschrieben wurde, der CYP106A2 endogen beinhaltet. Nach Interaktion von Betulinsäure mit *B. megaterium* ATCC 13368 wurde die Bildung von vier Produkten beobachtet, die nach NMR-Analysen als 7 β -, 15 α -Dihydroxybetulinsäure, 3-oxo-Betulinsäure, 3-oxo-11 α -Hydroxybetulinsäure und 1 β -Hydroxy-3-oxo-Betulinsäure identifiziert wurden. Durch GC-MS-Analysen könnte überprüft werden, ob die gleichen Produkte auch nach Umsatz der Säure mit gereinigtem Protein erhalten werden.

Nach Umsatz der pentacyclischen Triterpensäure KBA waren im HPLC-Chromatogramm ein Hauptprodukt sowie drei Nebenprodukte zu erkennen (vgl. Abb. 3.6). Das Hauptprodukt konnte durch NMR-Spektroskopie als 15 α -Hydroxy-KBA identifiziert werden (vgl. 3.3.3) und wurde im Zuge dieser Arbeit erstmals erfolgreich synthetisiert. Die Menge der Nebenprodukte war für eine fundierte Strukturbestimmung nicht ausreichend. Allerdings könnte es sich bei P1 um eine polyhydroxylierte Verbindung handeln, da sie im HPLC-Chromatogramm eine geringere Retentionszeit besaß als das monohydroxylierte Hauptprodukt (vgl. Abb. 3.6). Für P3 und P4 wäre eine Monohydroxylierung bzw. wie im Fall der Betulinsäure eine Oxidation der Hydroxygruppe an Position 3 von KBA denkbar. Pentacyclische Triterpensäuren gewinnen in der Medikamentenentwicklung immer mehr an Bedeutung, da ihre chemische Struktur eine starke Ähnlichkeit zur Struktur der Steroide aufweist.

Boswelliasäuren (BAs) stellen die biologisch aktivsten Verbindungen des Harzextraktes der Weihrauchkiefer *Boswellia serrata* (Salei guggal) dar und werden in Indien in der ayurvedischen Medizin zur Behandlung von entzündlichen und arthritischen Krankheiten eingesetzt (Gupta *et al.* 2001; Krüger *et al.* 2008). BAs verfügen über eine entzündungshemmende Wirkung, indem sie die 5-Lipoxygenase, die menschliche

Leukozytenelastase sowie den „nuclear factor- κ B pathway“ inhibieren, ohne die für Steroide bekannten Nebenwirkungen hervorzurufen (Poedel und Werz 2006; Krüger et al. 2008). Für β -Boswelliasäuren konnte desweiteren eine äußerst effiziente inhibitorische Wirkung der Topoisomerase I und II α identifiziert werden (Syrovets et al. 2000). Nach Inkubation von KBA in Gegenwart von Rattenlebermikrosomen wurde ein starker Phase I Metabolismus des Triterpens beobachtet, der zur Bildung von drei monohydroxylierten, sechs dihydroxylierten sowie zwei monohydroxylierten und dehydrogenierten KBA-Derivaten führte (Krüger et al. 2008). In einer anderen Studie wurde eine inhibierende Wirkung der Ketoboswelliasäure auf die mikrosomalen P450 CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 festgestellt (Frank und Unger 2006). In weiterführenden Arbeiten könnte untersucht werden, ob CYP106A2 die Hydroxylgruppe an den gleichen Positionen im Triterpengerüst einführt wie die mikrosomalen Cytochrome P450. Mit Hilfe des bakteriellen P450 wäre eine schnelle und effiziente Herstellung dieser Phase I Metaboliten möglich, die für zukünftige pharmakologische Untersuchungen als Vergleichssubstanzen dienen könnten.

Die Inkubation von GA mit CYP106A2 führte zur Bildung eines Hauptproduktes und eines Nebenproduktes (vgl. Abb. 3.10). Die Menge des Nebenproduktes P2 war für eine detaillierte Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie nicht ausreichend. Es könnte sich dabei allerdings um eine weitere monohydroxylierte Verbindung oder um das 3-oxo-Derivat der Glycyrrhetinsäure handeln. Dies könnte in weiteren Untersuchungen durch MS-Analyse verifiziert werden. Nach NMR-Analyse des Hauptproduktes konnte dieses als 7 β -Hydroxy-GA identifiziert werden (vgl. 3.3.4).

Die Synthese von 7 β -Hydroxy-GA, ausgehend von GA, wurde bereits durch mikrobielle Transformationen mit *Mucor polymorphosporus* (Xin et al. 2006), *Cunninghamella echinulata* ATCC 8688a, *Absidia pseudocylindrospora* ATCC 24169 und *Gliocladium viride* ATCC 10097 (Maatooq et al. 2010) beschrieben. Das Substrat 18 β -Glycyrrhetinsäure entsteht im Darm durch Hydrolyse von Glycyrrhizin, einem Hauptbestandteil von Süßholz (*Glycyrrhiza glabra*). Die pentacyclische Triterpensäure besitzt ein breites pharmakologisches Wirkspektrum, welches entzündungshemmende und antitumorale Aktivitäten umfasst. Sie stellt folglich eine vielversprechende Ausgangsverbindung für die Entwicklung von wirksameren und weniger toxischen chemosensitiven Verbindungen dar, die zur Verbesserung der chemotherapeutischen Behandlung von Krebs dienen könnten (Nabekura et al. 2008). Glycyrrhetinsäurederivate zeigten im Vergleich zur Ausgangsverbindung verbesserte

entzündungshemmende und antioxidative Aktivitäten (Maitraie et al. 2009) und führten zu einer Steigerung des antiproliferativen oder apoptotischen Effekts in Leukämiezellen (Liu et al. 2007). Das GA-Derivat Carbenoxolon, ein lizenziertes Medikament, wird beispielsweise erfolgreich zur Behandlung von Magengeschwüren und Entzündungen eingesetzt (Davis und Morris 1991).

Da strukturelle Modifikationen von Naturstoffen oftmals zu Verbindungen mit verbesserter biologischer Aktivität und/oder geringerer Toxizität führen, sind die in dieser Arbeit durch CYP106A2 katalysierten Reaktionen und die dadurch erhaltenen, erstmals synthetisierten Produkte für eine zukünftige Anwendung als vielversprechend zu betrachten. Um diese Reaktionen näher zu untersuchen wurden die K_M - und V_{max} -Werte aller identifizierten Produkte, die in dieser Arbeit hergestellt wurden, bestimmt (vgl. Tab. 3.2). Für den Umsatz von GA und KBA wurde auf eine detaillierte Angabe der kinetischen Parameter für einzelne Produkte verzichtet, da in beiden Fällen nur die Struktur des Hauptprodukts mittels NMR-Spektroskopie bestimmt werden konnte. Sollte es sich bei den Nebenprodukten um polyhydroxylierte Verbindungen handeln, müsste für die nach der Monohydroxylierung erfolgten Reaktionsschritte eine zusätzliche kinetische Analyse der Folgereaktionen durchgeführt werden. Aus diesem Grund erfolgte die Angabe der kinetischen Parameter als Summe der gebildeten Produkte pro nmol P450 pro min.

Für die Hydroxylierung von 17α -Methyltestosteron wurde ein V_{max} -Wert von 209 nmol 15β -Hydroxy- 17α -Methyltestosteron/nmol CYP106A2/min und ein K_M -Wert von 176 μ M bestimmt. Der erhaltene V_{max} -Wert ist den von Lisurek *et al.* und Virus *et al.* bestimmten Werten für die 15β -Hydroxylierung von DOC mit 255 nmol 15β -Hydroxy-DOC/nmol CYP106A2/min (Lisurek 2004) bzw. RSS mit 172 nmol 15β -Hydroxy-RSS/nmol CYP106A2/min (Virus 2006) sehr ähnlich. Der K_M -Wert war mit 175 μ M aber etwa doppelt so groß wie die Michaelis-Konstanten für die Hydroxylierung von DOC (77 μ M) und RSS (93 μ M). Bei Substraten, die eine Carbonsäurefunktion beinhalten, war die Geschwindigkeit der Produktbildung dagegen drastisch reduziert. Daraus lässt sich folgern, dass die durch die Carbonsäurefunktion hervorgerufene andersartige Bindung im aktiven Zentrum von CYP106A2 zu einer deutlichen Verschlechterung der Umsatzgeschwindigkeiten führt. Beim Umsatz von KBA wurde mit 97 nmol Produkte/nmol CYP106A2/min nur noch die Hälfte der Umsatzgeschwindigkeit von Methyltestosteron erreicht und die Aktivität des GA-Umsatzes war mit 35 nmol Produkte/nmol CYP106A2/min im Vergleich zur Steroidhydroxylierung

sogar um den Faktor 6 verringert. Die schlechtesten Reaktionsgeschwindigkeiten wurden allerdings für die Hydroxylierung von Abietinsäure bestimmt. Sie betrug für die Hydroxylierung in 12 α -Position nur 13 nmol/nmol CYP106A2/ min und die Geschwindigkeit der 12 β -Hydroxylierung erreichte sogar nur 60 % der Geschwindigkeit der 12 α -Hydroxylierung (Bleif et al. 2011a). Durch Docking-Kalkulationen konnten die zur Abietinsäurehydroxylierung erhaltenen Ergebnisse weiter untermauert werden. So wurde für die 12 α -Hydroxylierung ein Dockingscore von -9.604 erreicht und für die Hydroxylierung in Position 12 β wurde mit -4.962 ein um 50 % schlechter Score erhalten. Eine Verbesserung der katalytischen Aktivität von CYP106A2 gegenüber Di- und Triterpensäuren könnte durch Proteinengineering erfolgen und die dadurch erhaltenen Mutanten könnten in einem anschließenden Screeningverfahren auf erhöhte Umsatzraten getestet werden.

Die mit CYP106A2 erhaltenen Umsatzraten sind im Vergleich zu anderen bakteriellen P450 Systemen allerdings generell als sehr niedrig zu betrachten. P450 BM3, das Cytochrom P450 mit den höchsten bekannten Umsatzraten, zeigte bei der Hydroxylierung seiner natürlichen Substrate Laurat und Myristat beispielsweise V_{\max} -Werte von 893 nmol/nmol CYP102A1/min bzw. 2461 nmol/nmol CYP102A1/min (Maves et al. 1997). Für den Umsatz von Chlorzoxazon und Propanolol, die keine natürlichen Substrate von CYP102A1 darstellen, konnten dagegen nur Umsatzgeschwindigkeiten von 46 nmol/nmol CYP102A1/min bzw. 7.6 nmol/nmol CYP102A1/min erhalten werden (Di Nardo et al. 2007). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den katalytischen Aktivitäten von CYP106A2, so kann geschlussfolgert werden, dass die in dieser Arbeit identifizierten Substrate nicht die physiologischen Substrate von CYP106A2 darstellen. Trotzdem sind die in dieser Arbeit erhaltenen Umsatzraten deutlich höher als die der in den Fremdstoffmetabolismus einbezogenen mikrosomalen P450, die eine Vielzahl verschiedener Verbindungen als Substrate akzeptieren und dadurch deutlich geringere Substratspezifitäten aufweisen als bakterielle P450. Bei der Hydroxylierung von N-Desmethylclobazam durch CYP2C19 wurde lediglich ein V_{\max} -Wert von 0.219 nmol/nmol CYP2C19/min erhalten (Giraud et al. 2004) und für die 6 β -Hydroxylierung von Progesteron wurde nach Interaktion mit CYP2D6 nur ein V_{\max} -Wert von 0.54 nmol/nmol CYP2D6/min bestimmt (Niwa et al. 2009).

4.3 Ganzzellkatalyse

4.3.1 Ganzzellumsatz in *E. coli*

HPLC-Analysen liefern einen Nachweis über neu gebildete Produkte, eine Strukturbestimmung dieser Verbindungen ist mit dieser Methode allerdings nicht möglich. Eine fundierte Strukturanalyse kann lediglich mit Hilfe von 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie erfolgen. Ein Nachteil dieser Methode besteht aber in der benötigten Substanzmenge (mg-Bereich). Die mit CYP106A2 durchgeführten *in vitro*-Reaktionen sind zur Produktion dieser Mengen aber ungeeignet, da die Verwendung gereinigter Proteine und der Zusatz des Kofaktors NADPH in größerem Umfang sehr kostspielig und zeitaufwendig ist. Aus diesem Grund sollte ein CYP106A2 abhängiger Ganzzellbiokatalysator entwickelt werden, um mg-Mengen der entsprechenden Produkte für NMR-spektroskopische Studien zu gewinnen.

Für den Umsatz der neuen Substrate wurde zunächst ein auf *E. coli* basierender Biokatalysator eingesetzt, der CYP106A2 mit seinen heterologen Redoxpartnern Adx₄₋₁₀₈ und AdR koexprimiert und bereits erfolgreich zum Umsatz von 11-Deoxycorticosteron (DOC) zu 15 β -Hydroxy-11-Deoxycorticosteron durch CYP106A2 verwendet wurde (Hannemann et al. 2006). Eine 48 h Inkubationsperiode von 500 μ M 17 α -Methyltestosteron in Gegenwart des Ganzzellsystems lieferte das gleiche Produktmuster wie nach der *in vitro*-Reaktion mit CYP106A2 (vgl. Abb. 3.8 und Abb. 3.19). Das 3-oxo- Δ^4 -Steroid wurde dabei zu 45 % in 15 β -Position hydroxyliert, was einer Produktausbeute von ca. 72 mg entspricht.

Die carbonsäurehaltigen Substrate wurden durch das *E. coli*-Ganzzellsystem allerdings nicht umgesetzt. Geht man davon aus, dass sie wie Steroide einem passiven Transport ins Innere der Zelle unterliegen (Mendel 1989), so bedeutet dies, dass sie nicht in der Lage sind, durch die äußere Zellmembran der gram-negativen Bakterien zu diffundieren. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Carbonsäurefunktion, die einen pK_s-Wert von ~ 5 besitzt, unter den vorliegenden Kultivierungsbedingungen (pH-Wert ~ 7.4) deprotoniert vorliegt und die daraus resultierende negative Gesamtladung dafür verantwortlich ist, dass keine Diffusion durch die äußere Membran erfolgen kann. Auf Permeabilisierungsversuche der Bakterienmembran mit Detergentien wie z.B. Tween 80 wurde in dieser Arbeit aber verzichtet, da die erhaltenen Reaktionsprodukte für NMR-spektroskopische Untersuchungen verwendet werden sollten und enthaltene Detergentien in aufwendigen Reinigungsschritten

hätten entfernt werden müssen. Weiterhin kann durch die Permeabilisierung ein Austreten des niedermolekularen Kofaktors NADPH aus der Zelle erfolgen.

Cytochrome P450 sind auf eine Versorgung mit stöchiometrischen Mengen dieses Kofaktors angewiesen. Durch die Überexpression eines P450 ist es möglich, dass der intrazelluläre NADPH-Regenerationsweg nicht ausreicht um den erhöhten Bedarf an Reduktionsäquivalenten zu decken (Schewe et al. 2008), was schließlich in einer Limitierung der Katalysereaktion münden könnte. Um solch eine Limitierung auszuschließen und eine Steigerung der Produktivität des von Hannemann *et al.* entwickelten Ganzzellsystems zu erreichen sollte zusätzlich eine Überexpression der Alkoholdehydrogenase (*LbADH*) aus *Lactobacillus brevis* (Schroer et al. 2007) erfolgen. *LbADH* katalysiert die Oxidation von Isopropanol zu Aceton, bei der unter Verbrauch von NADP^+ NADPH gebildet wird, welches dann als Kofaktor für die P450-katalysierte Bioreaktion zur Verfügung steht. Schewe *et al.* konnte durch Verwendung eines ähnlichen Systems eine deutliche Steigerung der Epoxidierung von α -Pinen durch CYP102A1 erreichen. In diesem System wurde ein Glucose-Facilitator aus *Zymomonas mobilis* (dient zur Aufnahme unphosphorylierter Glucose) zusammen mit einer Glucose-Dehydrogenase aus *B. megaterium*, die die Oxidation von Glucose zu Gluconolacton katalysiert, mit CYP102A1 in *E. coli* koexprimiert. Dies führte zu einer 7-fachen Erhöhung der α -Pinenepoxidbildung im Vergleich zum glucosefreien System. Das *LbADH*-Gen wurde im Zuge dieser Arbeit erfolgreich in das bestehende Expressionsplasmid pBarTwin (Hannemann et al. 2006) kloniert, wodurch das tricistronische Plasmid pBarTripel erhalten wurde (vgl. Abb. 3.21). Da sich der auf *E.coli* basierte Biokatalysator als ungeeignet für einen Umsatz der carbonsäurehaltigen Substrate von CYP106A2 herausstellte, wurde auf weitere Expressionsexperimente und Substratumsatzversuche verzichtet.

Das neu entwickelte Plasmid pBarTripel wurde allerdings zusammen mit dem Expressionsvektor pACYC_FHH2.8, der die cDNA von CYP106A2 beinhaltet, erfolgreich von Frau Dr. Daniela Zehentgruber zur Koexpression der vier Proteine verwendet (Zehentgruber et al. 2010). Dieses System führte zu einer 18-fachen Steigerung der Umsatzraten von Progesteron und Testosteron im Vergleich zum CYP106A2 abhängigen DOC-Umsatz bei dem das NADPH-Regenerationssystem nicht eingesetzt wurde (Zehentgruber et al. 2010). In weiterführenden Arbeiten könnte untersucht werden, ob der weiterentwickelte

Ganzzellkatalysator im Fall von 17 α -Methyltestosteron ebenfalls eine größere Menge an 15 β -Hydroxy-17 α -Methyltestosteron liefert.

4.3.2 Ganzzellumsatz in *B. megaterium* ATCC 13368

Da der *E. coli*-Biokatalysator für den Umsatz der carbonsäurehaltigen Substrate von CYP106A2 nicht geeignet war, wurde für weitere Umsatzstudien der grampositive Mikroorganismus *Bacillus megaterium* verwendet, der im Gegensatz zu *E. coli* keine äußere Zellmembran besitzt. Der im Zuge dieser Arbeit eingesetzte *Bacillus megaterium* Stamm ATCC 13368 beinhaltet CYP106A2 sowie seine homologen Redoxpartner, Megaredoxin und Megaredoxinreduktase, und wurde in früheren Studien bereits für einen Ganzzellumsatz von 6 α -Fluor-16 α -Methyldeoxycorticosteron (FMDOC) durch CYP106A2 verwendet (Rauschenbach et al. 1993). Um mögliche Kreuzreaktionen auszuschließen, wurde eine Mutante von *Bacillus megaterium* ATCC 13368 (ATCC 13368 K.O.), in der das Gen von CYP106A2 ausgeknockt ist und die zur Selektion eine Tetracyclinresistenz besitzt (Rauschenbach et al. 1993), in allen Umsatzversuchen als Negativkontrolle eingesetzt.

Im Gegensatz zu dem zuvor verwendeten *E. coli*-Biokatalysator konvertierte *B. megaterium* ATCC 13368 neben dem 3-oxo- Δ^4 -Steroid 17 α -Methyltestosteron auch die Diterpenresinsäure Abietinsäure und die pentacyclischen Triterpensäuren GA und KBA. Es wäre somit sicherlich interessant, in weiteren Studien zu überprüfen, ob die Säuren durch einen passiven oder aktiven Transport ins Innere der *B. megaterium* Zelle gelangen. Die korrespondierenden HPLC-Chromatogramme wiesen dabei das gleiche Produktmuster auf, das bereits in den CYP106A2-abhängigen *in vitro*-Reaktionen mit den einzelnen Substraten erhalten wurde (vgl. 3.3.1-3.3.4). Der knock-out Stamm von *B. megaterium* zeigte dagegen keinen Umsatz. Die durch den Ganzzellumsatz erhaltenen Produkte sind somit eindeutig durch CYP106A2-Katalyse entstanden. Durch diese Ergebnisse wird die bereits zuvor getätigte Annahme bestätigt, dass ein Umsatz der carbonsäurehaltigen Substrate aufgrund der Unfähigkeit der Verbindungen, die äußere Membran der gramnegativen *E. coli*-Zellen zu passieren, scheiterte.

Durch einen „Upscaling-Prozess“ der Ganzzellreaktionen auf 1000 ml mit anschließender Chloroform-Extraktion und Reinigung der erhaltenen Rückstände über Kieselgel wurden ausreichende Mengen einzelner Produkte für NMR-spektroskopische Studien erhalten (Tab. 4.2). Die nach der Ganzzellreaktion von KBA erhaltenen Ausbeuten der Nebenprodukte P1,

P3 und P4 wurden durch HPLC-Analyse zu 10 %, 11 % und 4 % bestimmt und im Fall des GA-Umsatzes wurde das Nebenprodukt P2 zu 40 % gebildet. Nach Chloroform-Extraktion und Kieselgelchromatographie waren die erhaltenen Mengen dieser Produkte allerdings so gering, dass eine Strukturbestimmung durch NMR-Analysen nicht durchgeführt werden konnte.

Tab. 4.2 Absolute Produktausbeuten nach Umsatz in 1 Liter *B. megaterium* ATCC 13368 Kultur.

Substrat	Mittels NMR-Spektroskopie identifizierte Produkte	Absolute Ausbeute
17 α -Methyltestosteron (500 μ M)	15 β -Hydroxy-17 α -Methyltestosteron	82 mg (51 %)
Abietinsäure (200 μ M)	12 α -Hydroxyabietinsäure	14 mg (56 %)
	12 β -Hydroxyabietinsäure	17 mg (45 %)
KBA (100 μ M)	15 α -Hydroxy-KBA	22 mg (60 %)
GA (100 μ M)	7 β -Hydroxy-GA	17 mg (60 %)

Mit Hilfe von HPLC-Analysen konnte zwar gezeigt werden, dass alle eingesetzten Substrate zu 100 % in ihre korrespondierenden Produkte konvertiert wurden, allerdings betrug die absolute Ausbeute nach Extraktions- und Reinigungsschritten nur noch ca. 50 % (Tab. 4.2). Ein Einsatz von Adsorberharzen wäre für zukünftige Umsatzstudien sicherlich hilfreich, um die Extraktionseffizienz zu erhöhen und dadurch eine Verbesserung der absoluten Produktausbeuten zu erreichen.

Im Zuge dieser Arbeit konnten 150 mg 17 α -Methyltestosteron durch *B. megaterium* ATCC 13368 in 15 β -Position hydroxyliert werden. Dies entspricht in etwa einer Verdopplung der Umsatzrate, die durch den verwendeten *E. coli* Biokatalysator erhalten wurde (vgl. 3.2). Weiterhin ist dieser Umsatz sehr gut mit der von Rauschenbach *et al.* beschriebenen Hydroxylierung von 100 mg FMDOC zu ca. 75 mg 15 β -Hydroxy-FMDOC durch *B. megaterium* ATCC 13368 vergleichbar (Rauschenbach *et al.* 1993).

Die carbonsäurehaltigen Substrate konnten dagegen im Vergleich zu 17 α -Methyltestosteron (vollständiger Umsatz von 500 μ M) nur in geringen Mengen (200 μ M für Abietinsäure und 100 μ M für GA bzw. KBA) vollständig umgesetzt werden (vgl. Tab. 4.2). Dieses Ergebnis ist somit konsistent mit den deutlich schlechteren Umsatzgeschwindigkeiten, die im Vergleich zur Steroidhydroxylierung in den *in vitro*-Reaktionen erhaltenen wurden (vgl. Tab. 3.2). Vergleicht man den Ganzzellumsatz von KBA und GA mit dem von Chatterjee *et al.* publizierten Umsatz der Strukturverwandten Betulinsäure, so wird deutlich, dass ein Umsatz

mit wachsenden *B. megaterium* Zellen einem Umsatz mit ruhenden Zellen vorzuziehen ist. Innerhalb von fünf Tagen konnte in 13 Litern Phosphatpuffer, die eine Feuchtmasse von 130 g *B. megaterium* Zellen beinhalteten, lediglich 12 % des Substrats Betulinsäure zu den korrespondierenden Produkten umgesetzt werden (Chatterjee et al. 2000), wodurch aus 2.6 g Betulinsäure lediglich eine Gesamtmenge von 312 mg der vier Produkte erhalten wurde. Das Ziel ausreichende Produktmengen durch einen CYP106A2 basierten Ganzzellumsatz für NMR-spektroskopische Studien zu gewinnen, konnte somit durch Verwendung des grampositiven Bakteriums erreicht werden.

4.4 Entwicklung eines rekombinanten CYP106A2 abhängigen Biokatalysators in *Bacillus megaterium*

Der natürlich umsetzende *B. megaterium* Stamm ATCC 13368 besitzt im Vergleich zu rekombinanten Expressionssystemen einen entscheidenden Nachteil. Die Bildung von CYP106A2 erfolgt erst in der stationären Wachstumsphase der Zellen (Berg und Rafter 1981) und der Mechanismus der Genregulation ist bisher unbekannt. Offensichtlich unterscheidet er sich deutlich von dem des Cytochrom P450 BM1, welches eine 61 %ige Sequenzidentität zu CYP106A2 besitzt und dessen Expression durch Barbiturate induziert werden kann (Rauschenbach et al. 1993). Bisher konnten keine Substanzen gefunden werden, die die CYP106A2 Expression in *B. megaterium* induzieren (Berg und Rafter 1981). Weiterhin wurde keine dem CYP106A2-Gen vorgelagerte Sequenz identifiziert, die eine Ähnlichkeit zu einem 17 bp großen Sequenzmotiv von P450 BM1 aufweist, für das eine Beteiligung an der barbituratinduzierten Expression vermutet wird (He und Fulco 1991).

Eine Optimierung der in 4.3 beschriebenen Ganzzellumsätze kann somit lediglich durch eine plasmidbasierte Überexpression von CYP106A2 und seiner Redoxpartner erreicht werden. Deshalb wurde ein rekombinantes Expressionssystem für den grampositiven Organismus entwickelt, um eine Steigerung der existierenden Umsatzraten zu erreichen.

Um das Ziel der heterologen Proteinexpression zu verwirklichen, wurde ein Xylose induzierbarer *Bacillus megaterium* Shuttle-Vektor eingesetzt, der eine Klonierung der gewünschten Gene in *E. coli* erlaubt und zur Expression in *B. megaterium* verwendet werden kann. Dieses Vektorsystem wurde ausgewählt, weil es bereits erfolgreich zur Expression prokaryotischer und eukaryotischer Proteine in *B. megaterium* eingesetzt wurde. So wurden beispielsweise die *E. coli* β -Galactosidase, die *B. megaterium* Glucosedehydrogenase, die

Acinetobacter calcoaceticus Mutarostase und das *Clostridium difficile* Toxin A erfolgreich in *B. megaterium* überexprimiert (Rygu und Hillen 1991; Burger et al. 2003). Toxin A wurde in *B. megaterium* sogar in einer größeren Ausbeute erhalten als durch Expression in *E. coli*.

Als Ausgangsplasmid für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungsarbeiten diente der Shuttle-Vektor pKMBm4, in dem eine Optimierung der Promotorregion und der ribosomalen Bindestelle bereits zu einer Erhöhung der rekombinanten Proteinexpression in *B. megaterium* geführt hat (Stammen et al. 2010).

Die MCS dieses Plasmids wurde ausgetauscht, da die darin enthaltenen Restriktionsstellen für eine Klonierung der Gene von CYP106A2, AdR und Adx nicht kompatibel waren. Vor Ligation der Zielgene wurde zunächst eine Analyse der cDNAs von CYP106A2, AdR und Adx hinsichtlich ihres Codon Adaptation Index (CAI) zum Expressionswirt *B. megaterium* mit Hilfe des Programms JCat (Grote et al. 2005) durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass der durchschnittliche CAI aller 4.814 offenen Leserahmen von *Bacillus megaterium* 0.35 beträgt (Yang et al. 2007), sollten Gene, die einen CAI < 0.3 besitzen mittels künstlicher Gensynthese auf die Kodonpräferenz des Expressionswirts angepasst werden, um eine optimale Proteinexpression zu gewährleisten (vgl. 3.4.1). Die cDNAs von CYP106A2 und Adx erreichten CAI-Werte von 0.33 bzw. 0.35 und benötigten somit keine Optimierung. Das AdR-Gen zeigte dagegen nur einen CAI von 0.12, weshalb es auf die Kodonvorliebe von *B. megaterium* angepasst (CAI = 0.96) und von Geneart synthetisiert wurde. Auf Versuche die nicht-optimierte cDNA von AdR in *B. megaterium* zu exprimieren wurde verzichtet, da bereits zahlreiche Studien durchgeführt wurden, in denen gezeigt wurde, dass Gene, die einen CAI < 0.3 besaßen erst dann erfolgreich in *B. megaterium* überexprimiert werden konnten, nachdem die cDNA auf die Kodonpräferenz des Expressionswirts angepasst wurde. So konnte die Hydrolase TfH aus *Thermobifidia fusca*, für die ein CAI von 0.16 bestimmt wurde, erst nach Genoptimierung (CAI = 0.98) erfolgreich in *B. megaterium* exprimiert werden (Yang et al. 2007). Ein ähnliches Phänomen wurde auch schon für Expressionen in *E. coli* beobachtet (Hussain und Ward 2003; Jia und Li 2005).

Nach erfolgreicher Ligation der Zielgene in den *B. megaterium* Shuttle-Vektor pSMF2.1, wurde das resultierende Plasmid pSMF2.1CAA (vgl. Abb. 3.31) mit Hilfe einer Polyethylenglykol (PEG) basierten Methode in protoplastierte *B. megaterium* ATCC 13368 Zellen eingeschleust. Nach Induktion der Proteinexpression und anschließender Zelllyse konnte jedoch weder mit SDS-PAGE noch mit Western-Blot Analysen eine Überexpression

von CYP106A2 und seiner Redoxpartner nachgewiesen werden. Das Genom von *B. megaterium* ATCC 13368 wurde bisher nicht entschlüsselt und weiterhin existiert keine Information darüber, ob in diesem Stamm bereits natürliche Plasmide enthalten sind. Da die meisten *B. megaterium* Stämme mehr als vier Plasmide beinhalten (Vary et al. 2007), kann davon ausgegangen werden, dass *B. megaterium* ATCC 13368 ebenfalls Plasmide in sich trägt. Der wohl am besten untersuchte *B. megaterium* Stamm QM B1551 beinhaltet sieben Plasmide mit unterschiedlichen Kopienzahlen, die ca. 11 % der zellulären DNA dieses Bakteriums tragen (Gamer et al. 2009). Die auf diesen Plasmiden enthaltenen Gene kodieren beispielsweise für Proteine, die an der Zellteilung, der Zellwandhydrolyse, der Resistenz gegenüber Schwermetallen und dem Antibiotikum Rifampicin beteiligt sind (Scholle et al. 2003; Kunnimalaiyaan und Vary 2005). Eine mögliche Erklärung für die nicht erfolgte Expression von CYP106A2, AdR und Adx könnte darin liegen, dass das Plasmid pSMF2.1CAA mit den natürlichen Plasmiden von *B. megaterium* ATCC 13368 nicht kompatibel ist. Interessanterweise zeigte der transformierte Stamm in einem Aktivitätsassay keinen Umsatz von KBA (vgl. Abb. 3.32). Somit scheint die Einführung des Expressionsplasmids den Metabolismus dieses grampositiven Bakteriums dahingehend zu beeinflussen, dass das in der stationären Wachstumsphase gebildete CYP106A2 nicht mehr produziert werden kann. Um das mögliche Inkompatibilitätsproblem zwischen dem Expressionsplasmid und den evtl. vorhandenen Plasmiden von *B. megaterium* ATCC 13368 zu umgehen, wurde für weitere Expressions- und Umsatzstudien der plasmidfreie *B. megaterium* Stamm MS941 ausgewählt, der bereits erfolgreich zur Expression einer Vielzahl verschiedener Proteine eingesetzt wurde (Stammen et al. 2010). Dieser Stamm ist eine Mutante des *B. megaterium* Stammes DSM319, die durch einen Knockout der neutralen Protease nprM entstanden ist (Wittchen und Meinhardt 1995). Das Genom von DSM319 wurde 2011 vollständig entschlüsselt (Eppinger et al. 2011) und beinhaltet neben dem Cytochrom P450 BM1 zwei weitere P450, die bisher jedoch noch nicht benannt wurden. Allerdings ist in diesem Stamm kein Gen enthalten, das für CYP106A2 kodiert. Nach Protoplastentransformation dieses *B. megaterium* Stammes mit pSMF2.1CAA und anschließender Induktion der Proteinexpression mit Xylose konnte mit Hilfe von SDS-PAGE sowohl eine Überexpression von CYP106A2 als auch von AdR nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.33). Eine Expression von Adx konnte mit dieser Methode allerdings nicht aufgezeigt werden, da es in etwa die gleiche Größe wie Lysozym (~ 14.4 kDa) besitzt, welches zur Zelllyse verwendet worden war und im SDS-Gel die Proteinbande von

Adx überlagerte (vgl. Abb. 3.33). Ein erfolgreicher Nachweis für die Koexpression der drei Proteine in *B. megaterium* konnte aber durch Western-Blot-Analysen erbracht werden (vgl. Abb. 3.34). Somit konnte im Zuge dieser Arbeit erstmals ein rekombinantes Expressionssystem für Cytochrome P450 in *Bacillus megaterium* entwickelt werden. Ebenso konnte in den CO-Differenzspektren der entsprechenden *B. megaterium* Lysate jeweils ein Absorptionsmaximum von 450 nm erhalten werden, was die korrekte Inkorporation von Häm in CYP106A2 beweist (vgl. Abb. 3.35). Nach alleiniger Expression von CYP106A2 wurde nach 24 h 741 nmol aktives P450/L Medium erhalten (vgl. Tab. 3.3). Die Ausbeute an aktivem CYP106A2 konnte somit im Vergleich zu der von Berg *et al.* publizierten Menge (40 nmol CYP106A2/L Medium) (Berg und Rafter 1981), die durch den natürlichen *B. megaterium* Stamm ATCC 13368 in der stationären Wachstumsphase der Zellen produziert wurde, um das 18-fache gesteigert werden. Eine Erhöhung der Expressionsperiode auf 48 h führte zu einer weiteren Steigerung der Ausbeute (1120 nmol P450/L Medium) an aktivem CYP106A2 um das 1.5-fache. Allerdings sind die in dieser Arbeit erhaltenen Ausbeuten an CYP106A2 deutlich geringer als die durch Expression in *E. coli* erhaltenen Mengen. So konnte Lisurek *et al.* nach Expression von CYP106A2 im *E. coli*-Lysat ca. 13000 nmol CYP106A2/L Kultur erhalten (Lisurek 2004). Interessanterweise verringerte sich die P450 Ausbeute durch die zusätzliche AdR-Expression in *B. megaterium* um etwa die Hälfte und nach Koexpression von CYP106A2, AdR und Adx wurde nur noch ca. 1/3 der P450 Menge erhalten (vgl. Tab. 3.3). Dies lässt darauf schließen, dass *B. megaterium* einen Regulationsmechanismus besitzt, der nur die heterologe Expression einer festgesetzten Gesamtproteinmenge erlaubt. Es wäre sicherlich interessant, diesen Regulationsmechanismus näher zu untersuchen, um herauszufinden, auf welcher Stufe der Proteinproduktion diese Regulation stattfindet.

Nach erfolgreicher Expression der Zielgene in *B. megaterium* MS941 wurde durch einen Ganzzellumsatz mit KBA überprüft, ob die Proteine auch katalytisch aktiv sind. Als Negativkontrolle diente hierbei der Stamm *B. megaterium* MS941, der das Plasmid pSMF2.1 enthielt. Umsatzversuche mit KBA wurden sowohl mit dem Stamm durchgeführt, der nur CYP106A2 produzierte als auch mit dem Stamm, der neben CYP106A2 die hetreologen Redoxpartner AdR und Adx koexprimiert. Beide Stämme zeigten nach HPLC-Analyse das gleiche Produktmuster, das bereits mit dem *B. megaterium* Stamm ATCC 13368 bzw. mit dem rekonstituierten *in vitro* System erhalten wurde (vgl. Abb. 3.6, Abb. 3.27 und Abb. 3.36). Dies bedeutet, dass in *B. megaterium* MS941 ein Elektronentransfersystem existieren muss,

das mit CYP106A2 interagieren kann. Da neben dem Cytochrom P450 BM1 zwei weitere P450-Gene in diesem Stamm enthalten sind, kann angenommen werden, dass deren Redoxpartner in der Lage sind, Elektronen auf CYP106A2 zu übertragen. Es wurde bereits gezeigt, dass CYP106A2 mit einer Vielzahl verschiedener Redoxpartner interagieren kann (Goni et al. 2009). In weiteren Arbeiten könnten die für diese Proteine kodierenden Gene mit Hilfe von computerbasierten Analysen des Genoms identifiziert, in *E. coli* exprimiert und anschließend in einer *in vitro*-Reaktion mit CYP106A2 auf ihre Fähigkeit, Elektronen auf dieses P450 zu übertragen, überprüft werden. Aufgrund der Tatsache, dass mit beiden Stämmen nach einer Inkubationsperiode von 8 h ein vollständiger Umsatz von KBA erfolgt war, wurde mit beiden Stämmen ein zeitabhängiger Ganzzellumsatz durchgeführt. Damit wurde überprüft, ob durch Koexpression der Redoxpartner eine zusätzliche Steigerung der Produktivität erreicht wird oder ob das natürliche Elektronentransfersystem von *B. megaterium* MS941 ausreicht, um den Bedarf an Elektronen zu decken. Durch Verwendung des Koexpressionsstamms konnte dabei eine Verkürzung der Reaktionszeit für einen vollständigen Umsatz von KBA von 180 min auf 100 min erzielt werden (vgl. Abb. 3.37). Dies beweist, dass das in MS941 enthaltene Redoxsystem nicht in der Lage ist, den durch die Überexpression von CYP106A2 entstandenen zusätzlichen Bedarf an Elektronen vollständig zu decken. Somit führt eine zusätzliche Koexpression von Adx und AdR zwar zu einer verminderten P450-Expression (vgl. 3.4.3), aber trotzdem zu deutlich höheren Umsatzraten. Dies bedeutet, dass in diesem Ganzzellsystem die Konzentration der Redoxpartner den limitierenden Faktor darstellt. So wurde in Experimenten mit Cytochrom P450 Systemen aus *Streptomyces* bereits vermutet, dass die Menge an verfügbarer Ferredoxin Reduktase den Faktor darstellt, der die P450 Aktivität limitiert (Hussain und Ward 2003). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind somit konsistent mit denen von Rauschenbach *et al.* und Ruijssenaars *et al.* publizierten CYP106A2 basierten Ganzzellumsätzen nach Überexpression des P450 in *Bacillus subtilis* bzw. *Pseudomonas putida* (Rauschenbach et al. 1993; Ruijssenaars et al. 2007). Rauschenbach konnte durch Überexpression von CYP106A2 in *Bacillus subtilis*, welcher ein Redoxsystem beinhaltet, das mit CYP106A2 interagiert innerhalb von 24 h ca. 5 mg mehr 15 β -Hydroxy-FMDOC produzieren, als mit dem natürlichen Produzenten *B. megaterium* ATCC 13368 (Rauschenbach et al. 1993). Durch Expression von CYP106A2 in *Pseudomonas putida*, dessen aus Putidaredoxin Reduktase und Putidaredoxin bestehendes Redoxsystem ebenfalls Elektronen auf CYP106A2 transferieren kann, konnten

100 μM Testosteron innerhalb von 72 h zu 0.7 % in 15 β -Position hydroxyliert werden und durch eine zusätzliche Überexpression eines 4Fe-4S-Ferredoxins (*fer*) aus *Bacillus subtilis* konnten 6.9 % von Testosteron zu 15 β -Hydroxytestosteron umgesetzt werden (Ruijsenaars et al. 2007). Das in dieser Arbeit hergestellte rekombinante System führt somit zu deutlich höheren Umsatzraten als die bereits publizierten, auf *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas putida* basierenden Ganzellsysteme. Weiterhin ist *B. megaterium* als Expressionswirt eindeutig *Bacillus subtilis* vorzuziehen, da *B. megaterium* eine deutlich höhere Plasmidstabilität aufweist (Kim 2003). Aufgrund der oben aufgeführten Ergebnisse wurde für alle weiteren *in vivo* Substratumsätze, der *B. megaterium* MS941 Stamm verwendet, der CYP106A2, AdR und Adx koexprimiert. Mit diesem Stamm konnten die Substrate 17 α -Methyltestosteron, GA und Abietinsäure ebenfalls zu den gleichen Produkten konvertiert werden, die bereits mit Hilfe des CYP106A2 abhängigen *in vitro*-Rekonstitutionsassays und dem *B. megaterium* Stamm ATCC 13368 erhalten wurden (vgl. Abb. 3.38, Abb. 3.39 und Abb. 3.40). Eine Evaluierung des neu entwickelten Biokatalysators erfolgte durch zeitabhängige Substratumsätze, die mit den Umsätzen des natürlichen Produzenten *B. megaterium* ATCC 13368 verglichen wurden (vgl. Abb. 3.41, Abb. 3.42, Abb. 3.43 und Abb. 3.44). Die erhaltenen relativen Produktivitäten beider Stämme sind in Abb. 4.2 zusammengestellt.

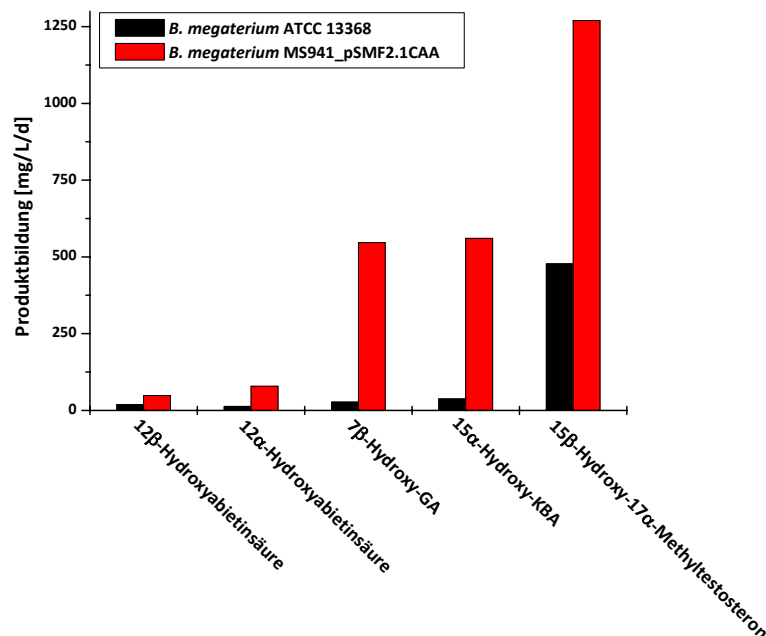


Abb. 4.2 Relative Produktbildung in mg Produkt/L/d nach Umsatz von 100 μM Abietinsäure, 100 μM GA, 100 μM KBA und 500 μM 17 α -Methyltestosteron mit *B. megaterium* ATCC 13368 (schwarze Balken) bzw. *B. megaterium* MS941, der CYP106A2, AdR und Adx koexprimiert (rote Balken).

Anhand des in Abb. 4.2 dargestellten Balkendiagramms wird eindeutig ersichtlich, dass mit Hilfe des rekombinanten Systems für den Umsatz aller in dieser Arbeit verwendeten Substrate eine deutliche Steigerung der Produktbildung im Vergleich zum natürlichen Produzenten *B. megaterium* ATCC 13368 erreicht wurde. Dies wird insbesondere bei den Umsätzen der pentacyclischen Triterpensäuren GA und KBA deutlich. Hier konnte die Bildung der jeweiligen Hauptprodukte 7 β -Hydroxy-GA bzw. 15 α -Hydroxy-KBA durch Einsatz des rekombinanten Biokatalysators um das 20- bzw. 15-fache gesteigert werden. Beim Umsatz von Abietensäure wurde eine Steigerung der relativen Produktbildung von 12 α -Hydroxyabietinsäure um den Faktor 6 und von 12 β -Hydroxyabietinsäure um den Faktor 2.5 erreicht. Die Bildung von 15 β -Hydroxy-17 α -Methyltestosteron konnte im Vergleich zum Umsatz mit *B. megaterium* ATCC 13368 um das 2.7-fache gesteigert werden. Die produzierten mg-Mengen der Hauptprodukte sind in Tab. 4.3 dargestellt.

Tab. 4.3 Die von *B. megaterium* ATCC 13368 und *B. megaterium* MS941 (pSMF2.1CAA) produzierte Produktmengen in mg/L/d.

Produkt	<i>B. megaterium</i> ATCC 13368 (mg/L/d)	<i>B. megaterium</i> MS941 (pSMF2.1CAA) (mg/L/d)	Steigerungsfaktor
15 β -Hydroxy-Methyltestosteron	477.7	1270.0	2.7
12 α -Hydroxyabietinsäure	12.8	78.8	6.0
12 β -Hydroxyabietinsäure	19.0	48.4	2.5
15 α -Hydroxy-KBA	37.6	560.7	15.0
7 β -Hydroxy-GA	27.2	546.8	20.0

Diese Ergebnisse verdeutlichen wiederum, dass Steroide von CYP106A2 schneller umgesetzt werden als die carbonsäurehaltigen Substrate. Die mit dem rekombinanten System erhaltenen relativen Produktivitäten sind desweiteren vollständig konsistent mit den in den *in vitro*-Reaktionen bestimmten Umsatzgeschwindigkeiten (vgl. Tab. 3.2). Hier konnte für den Umsatz von 17 α -Methyltestosteron der höchste V_{\max} -Wert bestimmt werden, gefolgt von KBA, GA und Abietinsäure.

Es ist anzumerken, dass die in dieser Arbeit erfolgten Umsatzexperimente in Schikanenkolben durchgeführt wurden. Ein Ganzzellumsatz in einem Fermenter würde sicherlich zu einer weiteren Steigerung der Umsatzraten führen, da hier Reaktionsparameter wie der pH-Wert, Sauerstoffzufuhr und Rührgeschwindigkeit konstant gehalten werden

können. Außerdem könnten mit diesem System zusätzlich Fütterungsexperimente durchgeführt werden.

4.5 Einfluss der Redoxpartner auf die Regioselektivität der Hydroxylierung

Interessanterweise wurden mit den in dieser Arbeit verwendeten P450 Systemen unterschiedliche Regioselektivitäten bei der Produktbildung festgestellt. *B. megaterium* MS941, der neben CYP106A2 die heterologen Redoxpartner AdR und Adx koexprimierte, zeigte die gleiche Regioselektivität bei der Hydroxylierung der einzelnen Produkte, die bereits in der *in vitro* Reaktion mit dieser Redoxkette beobachtet wurden. Ein Umsatz der einzelnen Substrate mit *B. megaterium* ATCC 13368, bei dem CYP106A2 mit seinen natürlichen Elektronentransferpartnern Megaredoxin und Megaredoxinreduktase interagiert, führte zwar zu identischen Produkten, diese wurden jedoch in unterschiedlichen prozentualen Anteilen im Vergleich zur *in vitro* Reaktion bzw. zum rekombinanten System gebildet (Abb. 4.3). Lediglich bei der Umsetzung von KBA waren die prozentualen Anteile der Produkte P3 und P4 im *in vitro*-System nicht mit denen des rekombinanten Systems identisch (Abb. 4.3). Die Redoxpartner haben somit einen entscheidenden Einfluss auf die Regioselektivität der Hydroxylierung. Möglicherweise induzieren die beiden Redoxketten während der Elektronenübertragung Konformationsänderungen im P450, die dann zu einer Bevorzugung unterschiedlicher Hydroxylierungspositionen führen.

Dieses Phänomen wurde ebenfalls bei der Hydroxylierung von Testosteron durch CYP106A2 von Ruijsenaars et al. beobachtet. Bei Einsatz von *B. megaterium* ATCC 13368 wurden die Produkte 15 β -Hydroxytestosteron und 6 β -Hydroxytestosteron in einem Verhältnis von 5.1 zu 1 gebildet. Eine Koexpression von CYP106A2 mit dem Ferredoxins *fer* aus *Bacillus subtilis* in *Pseudomonas putida* lieferte die beiden Produkte dagegen in einem Verhältnis von 4.2 zu 1 (Ruijsenaars et al. 2007).

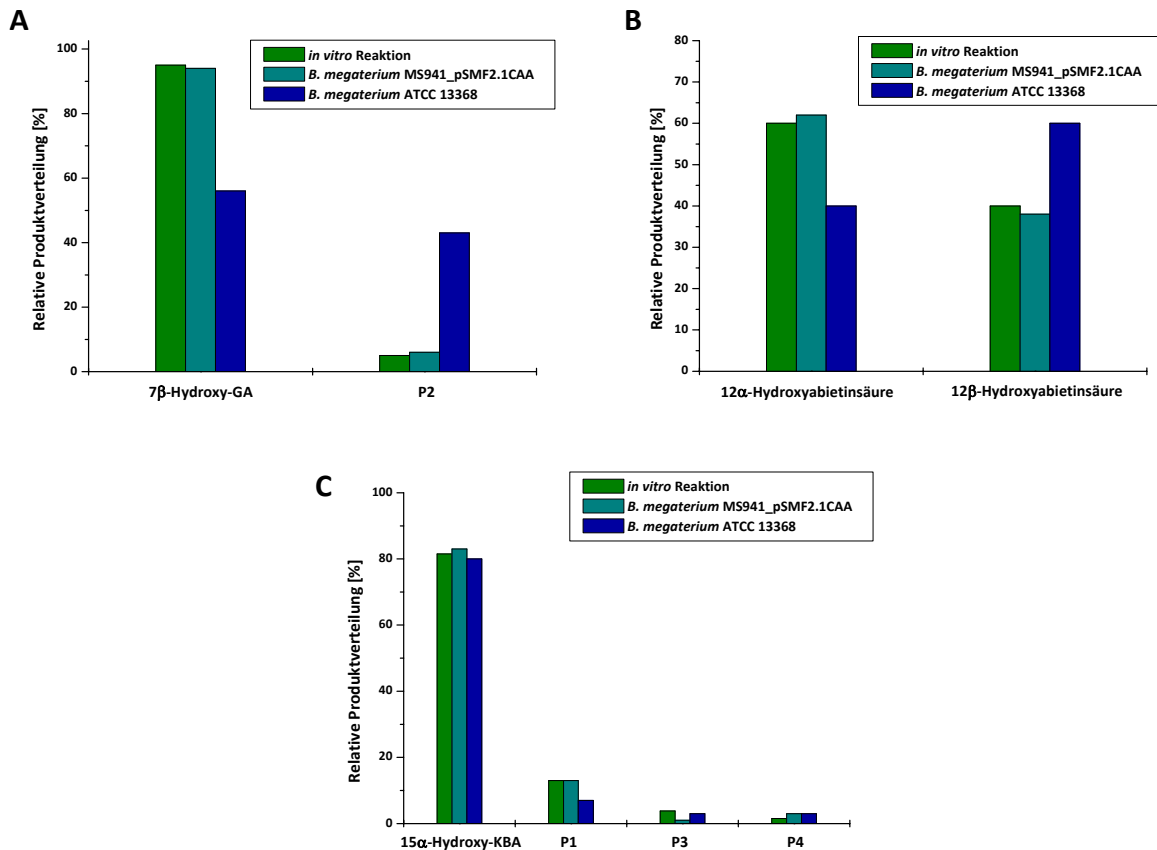


Abb. 4.3 Einfluss der Redoxpartner auf die Regioselektivität. A) Produktverteilung nach Umsatz von 18 β -Glycyrrhetinsäure; B) Produktverteilung nach Umsatz von Abietinsäure und C) Produktverteilung nach Umsatz von 11-Keto- β -boswelliasäure. Die prozentualen Produktanteile nach der *in vitro* Reaktion sind in grün, die nach Umsatz mit dem rekombinanten System in hellblau und die nach Ganzzellkatalyse mit *B. megaterium* ATCC 13368 sind in dunkelblau dargestellt.

Im Hinblick auf eine mögliche biotechnologische Anwendung von CYP106A2 ist dieses Phänomen natürlich äußerst interessant, da das Produktmuster durch den Einsatz unterschiedlicher Elektronentransferketten beeinflusst werden kann.

Abschließend kann gesagt werden, dass die zuvor gesteckten Ziele durch die verwendeten Methoden voll erreicht werden konnten. Das Substratspektrum von CYP106A2 konnte erfolgreich erweitert werden, wodurch neue Erkenntnisse über die Substratspezifität dieses Enzyms erhalten wurden. Darüber hinaus konnten durch die Entwicklung des rekombinanten CYP106A2 basierten Biokatalysators Grundlagen erarbeitet werden, die eine zukünftige biotechnologische Anwendung von CYP106A2 ermöglichen.

5 Literaturverzeichnis

- Axelrod J (1955) The enzymatic deamination of amphetamine (benzedrine). *Journal of Biological Chemistry* 214 (2):753-763.
- Barg H, Malten M, Jahn M, Jahn D (eds) (2005) Protein and vitamin production in *Bacillus megaterium* vol 18. Microbial processes and products, 1st edn. Humana Press, Inc., Totowa.
- Bell SG, Hoskins N, Xu F, Caprotti D, Rao Z, Wong LL (2006) Cytochrome P450 enzymes from the metabolically diverse bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Biochem Biophys Res Commun* 342 (1):191-196.
- Berg A (1982) Characterization of the ferredoxin Component of the steroid 15 beta-hydroxylases system from *Bacillus megaterium*. *Biochem Biophys Res Commun* 105 (1):303-311.
- Berg A, Carlstrom K, Gustafsson JA, Ingelman-Sundberg M (1975) Demonstration of a cytochrome P-450-dependent steroid 15beta-hydroxylase in *Bacillus megaterium*. *Biochem Biophys Res Commun* 66 (4):1414-1423.
- Berg A, Gustafsson JA, Ingelman-Sundberg M (1976) Characterization of a cytochrome P-450-dependent steroid hydroxylase system present in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* 251 (9):2831-2838.
- Berg A, Ingelman-Sundberg M, Gustafsson JA (1979a) Isolation and characterization of cytochrome P-450meg. *Acta Biol Med Ger* 38 (2-3):333-344.
- Berg A, Ingelman-Sundberg M, Gustafsson JA (1979b) Purification and characterization of cytochrome P-450meg. *J Biol Chem* 254 (12):5264-5271.
- Berg A, Rafter JJ (1981) Studies on the substrate specificity and inducibility of cytochrome P-450meg. *Biochem J* 196 (3):781-786.
- Bernhardt R (1996) Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 127:137-221.
- Bernhardt R (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol* 124 (1):128-145.
- Bernhardt R, Waterman MR (2007) Cytochrome P450 and Steroid Hormone Biosynthesis. In: Sigel A, Sigel H, Sigel RKO (eds) *The Ubiquitous Roles of Cytochrome P450 Proteins*, vol 3. Metal Ions in Life Sciences. John Wiley & Sons, pp 361-396.
- Bicas JL, Dionisio AP, Pastore GM (2009) Bio-oxidation of terpenes: an approach for the flavor industry. *Chem Rev* 109 (9):4518-4531.

- Biedendieck R, Gamer M, Jaensch L, Meyer S, Rohde M, Deckwer WD, Jahn D (2007a) A sucrose-inducible promoter system for the intra- and extracellular protein production in *Bacillus megaterium*. *J Biotechnol* 132 (4):426-430.
- Biedendieck R, Malten M, Barg H, Bunk B, Martens JH, Deery E, Leech H, Warren MJ, Jahn D (2010) Metabolic engineering of cobalamin (vitamin B12) production in *Bacillus megaterium*. *Microb Biotechnol* 3 (1):24-37.
- Biedendieck R, Yang Y, Deckwer WD, Malten M, Jahn D (2007b) Plasmid system for the intracellular production and purification of affinity-tagged proteins in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng* 96 (3):525-537.
- Bleif S (2007) Identifizierung neuer potentieller Substrate von CYP106A2. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Bleif S, Hannemann F, Lisurek M, von Kries JP, Zapp J, Dietzen M, Antes I, Bernhardt R (2011a) Identification of CYP106A2 as a Regioselective Allylic Bacterial Diterpene Hydroxylase. *Chembiochem* 12 (4):576-582.
- Bleif S, Hannemann F, Zapp J, Hartmann D, Jauch J, Bernhardt R (2011b) A new *Bacillus megaterium* whole-cell catalyst for the hydroxylation of the pentacyclic triterpene 11-keto-beta-boswellic acid (KBA) based on a recombinant cytochrome P450 system. *Appl Microbiol Biotechnol*. doi:10.1007/s00253-011-3467-0 [doi].
- Bohlmann J, Keeling CI (2008) Terpenoid biomaterials. *Plant J* 54 (4):656-669.
- Brown BJ, Carlton BC (1980) Plasmid-mediated transformation in *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* 142 (2):508-512.
- Bunk B, Schulz A, Stammen S, Munch R, Warren MJ, Rohde M, Jahn D, Biedendieck R (2010) A short story about a big magic bug. *Bioeng Bugs* 1 (2):85-91.
- Burger S, Tatge H, Hofmann F, Genth H, Just I, Gerhard R (2003) Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A using the *Bacillus megaterium* system. *Biochem Biophys Res Commun* 307 (3):584-588.
- Chatterjee P, Kouzi SA, Pezzuto JM, Hamann MT (2000) Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Appl Environ Microbiol* 66 (9):3850-3855.
- Chefson A, Auclair K (2006) Progress towards the easier use of P450 enzymes. *Mol Biosyst* 2 (10):462-469.
- Chen RR (2007) Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 74 (4):730-738.

- Cirino PC, Arnold FH (2003) A self-sufficient peroxide-driven hydroxylation biocatalyst. *Angew Chem Int Ed Engl* 42 (28):3299-3301.
- Coon MJ, Vaz AD, Bestervelt LL (1996) Cytochrome P450 2: peroxidative reactions of diversozymes. *FASEB J* 10 (4):428-434.
- Cryle MJ, Stok JE, De Voss JJ (2003) Reactions Catalyzed by Bacterial Cytochromes P450. *Australian Journal of Chemistry* 56 (8):749-762.
- Das A, Grinkova YV, Sligar SG (2007) Redox potential control by drug binding to cytochrome P450 3A4. *J Am Chem Soc* 129 (45):13778-13779.
- Davis EA, Morris DJ (1991) Medicinal uses of licorice through the millennia: The good and plenty of it. *Molecular and Cellular Endocrinology* 78 (1-2):1-6.
- De Bary A (1884) *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozen und Bakterien*. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Deeni YY, Paine MJ, Ayrton AD, Clarke SE, Chenery R, Wolf CR (2001) Expression, purification, and biochemical characterization of a human cytochrome P450 CYP2D6-NADPH cytochrome P450 reductase fusion protein. *Arch Biochem Biophys* 396 (1):16-24.
- Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I (2005) Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev* 105 (6):2253-2277.
- Di Nardo G, Fantuzzi A, Sideri A, Panicco P, Sassone C, Giunta C, Gilardi G (2007) Wild-type CYP102A1 as a biocatalyst: turnover of drugs usually metabolised by human liver enzymes. *J Biol Inorg Chem* 12 (3):313-323.
- Dietrich JA, Yoshikuni Y, Fisher KJ, Woolard FX, Ockey D, McPhee DJ, Renninger NS, Chang MC, Baker D, Keasling JD (2009) A novel semi-biosynthetic route for artemisinin production using engineered substrate-promiscuous P450(BM3). *ACS Chem Biol* 4 (4):261-267.
- Dubendorff JW, Studier FW (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* 219 (1):45-59.
- Eiben S, Bartelmas H, Urlacher VB (2007) Construction of a thermostable cytochrome P450 chimera derived from self-sufficient mesophilic parents. *Appl Microbiol Biotechnol* 75 (5):1055-1061.
- Eppinger M, Bunk B, Johns MA, Edirisinghe JN, Kutumbaka KK, Koenig SS, Creasy HH, Rosovitz MJ, Riley DR, Daugherty S, Martin M, Elbourne LD, Paulsen I, Biedendieck R, Braun C, Grayburn S, Dhingra S, Lukyanchuk V, Ball B, Ul-Qamar R, Seibel J, Bremer E, Jahn D, Ravel J, Vary PS (2011) Genome sequences of the biotechnologically

- important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319. *J Bacteriol* 193 (16):4199-4213.
- Estabrook RW, Baron J, Peterson J, Ishimura Y (1971) Oxygenated cytochrome P-450 as an intermediate in hydroxylation reactions. *Biochem J* 125 (2):3P-4P.
- Ewen KM, 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 (42):28590-28598.
- Frank A, Unger M (2006) Analysis of frankincense from various *Boswellia* species with inhibitory activity on human drug metabolising cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography mass spectrometry after automated on-line extraction. *J Chromatogr A* 1112 (1-2):255-262.
- Fregel R, Rodriguez V, Cabrera VM (2008) Microwave improved *Escherichia coli* transformation. *Lett Appl Microbiol* 46 (4):498-499.
- Furuya T, Nishi T, Shibata D, Suzuki H, Ohta D, Kino K (2008) Characterization of orphan monooxygenases by rapid substrate screening using FT-ICR mass spectrometry. *Chem Biol* 15 (6):563-572.
- Furuya T, Shibata D, Kino K (2009) Phylogenetic analysis of *Bacillus* P450 monooxygenases and evaluation of their activity towards steroids. *Steroids* 74 (12):906-912.
- Gamer M, Frode D, Biedendieck R, Stammen S, Jahn D (2009) A T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 82 (6):1195-1203.
- Garfinkel D (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 77 (2):493-509.
- Gillam EM (2008) Engineering cytochrome p450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 21 (1):220-231.
- Giraud C, Tran A, Rey E, Vincent J, Treluyer JM, Pons G (2004) In vitro characterization of clobazam metabolism by recombinant cytochrome P450 enzymes: importance of CYP2C19. *Drug Metab Dispos* 32 (11):1279-1286.
- Goni G, Zollner A, Lisurek M, Velazquez-Campoy A, Pinto S, Gomez-Moreno C, Hannemann F, Bernhardt R, Medina M (2009) Cyanobacterial electron carrier proteins as electron donors to CYP106A2 from *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Biochim Biophys Acta* 1794 (11):1635-1642.

- González MA, Correa-Royero J, Agudelo L, Mesa A, Betancur-Galvis L (2009) Synthesis and biological evaluation of abietic acid derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44 (6):2468-2472.
- 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 (1):83-90.
- Grote A, Hiller K, Scheer M, Munch R, Nortemann B, Hempel DC, Jahn D (2005) JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res* 33 (Web Server issue):W526-531.
- Guengerich FP (2002) Rate-limiting steps in cytochrome P450 catalysis. *Biol Chem* 383 (10):1553-1564.
- Guengerich FP (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J* 8 (1):E101-111.
- Gupta I, Parihar A, Malhotra P, Gupta S, Ludtke R, Safayhi H, Ammon HP (2001) Effects of gum resin of *Boswellia serrata* in patients with chronic colitis. *Planta Med* 67 (5):391-395.
- Hanlon SP, Friedberg T, Wolf CR, Ghisalba O, Kittelmann M (2007) Recombinant Yeast and Bacteria that Express Human P450s: Bioreactors for Drug Discovery, Development, and Biotechnology. In: *Modern Biooxidation*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp 233-252.
- Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, Bernhardt R (2007) Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta* 1770 (3):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.
- Hasemann CA, Kurumbail RG, Boddupalli SS, Peterson JA, Deisenhofer J (1995) Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* 3 (1):41-62.
- Hawkes DB, Adams GW, Burlingame AL, Ortiz de Montellano PR, De Voss JJ (2002) Cytochrome P450(cin) (CYP176A), isolation, expression, and characterization. *J Biol Chem* 277 (31):27725-27732.
- Hayaishi O, Katagiri M, Rothberg S (1955) MECHANISM OF THE PYROCATECHASE REACTION. *Journal of the American Chemical Society* 77 (20):5450-5451.
- He JS, Fulco AJ (1991) A barbiturate-regulated protein binding to a common sequence in the cytochrome P450 genes of rodents and bacteria. *J Biol Chem* 266 (12):7864-7869.

- Herz W, Wahlborg HJ, Lloyd WD, Schuller WH, Hedrick GW (1965) Resin Acids. IV. 12-Hydroxyabiatic Acid and Its Reduction. *The Journal of Organic Chemistry* 30 (9):3190-3195.
- Hollmann F, Withold B, Schmid A (2002) $[\text{cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$: a versatile tool for efficient and non-enzymatic regeneration of nicotinamide and flavin coenzymes. *J Mol Cat B Enzym* 791:1-10.
- Hussain HA, Ward JM (2003) Enhanced heterologous expression of two *Streptomyces griseolus* cytochrome P450s and *Streptomyces coelicolor* ferredoxin reductase as potentially efficient hydroxylation catalysts. *Appl Environ Microbiol* 69 (1):373-382.
- Inui H, Maeda A, Ohkawa H (2007) Molecular characterization of specifically active recombinant fused enzymes consisting of CYP3A4, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase, and cytochrome b5. *Biochemistry* 46 (35):10213-10221.
- Isin EM, Guengerich FP (2008) Substrate binding to cytochromes P450. *Anal Bioanal Chem* 392 (6):1019-1030.
- Jefcoate CR (1978) Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy. *Methods Enzymol* 52:258-279.
- Jia M, Li Y (2005) The relationship among gene expression, folding free energy and codon usage bias in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 579 (24):5333-5337.
- Julsing MK, Cornelissen S, Buhler B, Schmid A (2008) Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts? *Curr Opin Chem Biol* 12 (2):177-186.
- Katagiri M, Ganguli BN, Gunsalus IC (1968) A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation. *J Biol Chem* 243 (12):3543-3546.
- Kim D, Heo YS, Ortiz de Montellano PR (2008) Efficient catalytic turnover of cytochrome P450(cam) is supported by a T252N mutation. *Arch Biochem Biophys* 474 (1):150-156.
- Kim JY (2003) Overproduction and secretion of *Bacillus circulans* endo-beta-1,3-1,4-glucanase gene (bglBC1) in *B. subtilis* and *B. megaterium*. *Biotechnol Lett* 25 (17):1445-1449.
- King DJ, Azari MR, Wiseman A (1988) Immobilization of a cytochrome P-450 enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 137:675-686.
- Klingenberg M (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75 (2):376-386.

- Krohn K, Budianto E, Flörke U, Hausen BM (1992) Untersuchung der allergenen Prinzipien aus Kolophonium: Autoxidation, Synthese und Sensibilisierung. *Liebigs Annalen der Chemie* 1992 (9):911-919.
- Krüger P, Daneshfar R, Eckert GP, Klein J, Volmer DA, Bahr U, Müller WE, Karas M, Schubert-Zsilavecz M, Abdel-Tawab M (2008) Metabolism of boswellic acids in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos* 36 (6):1135-1142.
- Kunnimalaiyaan M, Vary PS (2005) Molecular characterization of plasmid pBM300 from *Bacillus megaterium* QM B1551. *Appl Environ Microbiol* 71 (6):3068-3076.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.
- Lamb DC, Guengerich FP, Kelly SL, Waterman MR (2006) Exploiting *Streptomyces coelicolor* A3(2) P450s as a model for application in drug discovery. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2 (1):27-40.
- Lamb DC, Lei L, Warrilow AG, Lepesheva GI, Mullins JG, Waterman MR, Kelly SL (2009) The first virally encoded cytochrome p450. *J Virol* 83 (16):8266-8269.
- Lisurek M (2004) Homologie-Modellierung und Protein-Engineering der Steroid-15 β -Hydroxylase (CYP106A2) aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Lisurek M, Kang MJ, Hartmann RW, 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 (2):677-682.
- Lisurek M, Simgen B, Antes I, Bernhardt R (2008) Theoretical and experimental evaluation of a CYP106A2 low homology model and production of mutants with changed activity and selectivity of hydroxylation. *Chembiochem* 9 (9):1439-1449.
- Liu D, Song D, Guo G, Wang R, Lv J, Jing Y, Zhao L (2007) The synthesis of 18 β -glycyrrhetic acid derivatives which have increased antiproliferative and apoptotic effects in leukemia cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (16):5432-5439.
- Loughlin WA (2000) Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology* 74 (1):49-62.
- Luthra A, Denisov IG, Sligar SG (2011) Spectroscopic features of cytochrome P450 reaction intermediates. *Arch Biochem Biophys* 507 (1):26-35.
- Maatooq GT, Marzouk AM, Gray AI, Rosazza JP (2010) Bioactive microbial metabolites from glycyrrhetic acid. *Phytochemistry* 71 (2-3):262-270.

- Maitraie D, Hung C-F, Tu H-Y, Liou Y-T, Wei B-L, Yang S-C, Wang J-P, Lin C-N (2009) Synthesis, anti-inflammatory, and antioxidant activities of 18 β -glycyrrhetic acid derivatives as chemical mediators and xanthine oxidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 (7):2785-2792.
- Malten M, Biedendieck R, Gamer M, Drews AC, Stammen S, Buchholz K, Dijkhuizen L, Jahn D (2006) A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export, and one-step purification of affinity-tagged heterologous levansucrase from growth medium. *Appl Environ Microbiol* 72 (2):1677-1679.
- Malten M, Hollmann R, Deckwer WD, Jahn D (2005) Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase DsrS in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng* 89 (2):206-218.
- Mason HS, Fowlks WL, Peterson E (1955) Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex¹. *Journal of the American Chemical Society* 77 (10):2914-2915.
- Maurer SC, Kühnel K, Kaysser LA, Eiben S, Schmid RD, Urlacher VB (2005) Catalytic hydroxylation in biphasic systems using CYP102A1 mutants. *Adv Synth Catal* 347:1090-1098.
- Maurer SC, Schulze H, Schmid RD, Urlacher V (2003) Immobilisation of P450 BM-3 and an NADP⁺ cofactor recycling system: Towards a technical application of heme-containing monooxygenases in fine chemical synthesis. *Adv Synth Catal* 345:802-810.
- Maves SA, Yeom H, McLean MA, Sligar SG (1997) Decreased substrate affinity upon alteration of the substrate-docking region in cytochrome P450(BM-3). *FEBS Lett* 414 (2):213-218.
- McAleer W, Jacob TA, Turnbull LB, Schoenewaldt EF, Stoudt TH (1958) Hydroxylation of progesterone by *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *Arch Biochem Biophys* 73 (1):127-130.
- Mendel CM (1989) The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev* 10 (3):232-274.
- Meunier B, de Visser SP, Shaik S (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chem Rev* 104 (9):3947-3980.
- Mizutani M, Ohta D (2010) Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annu Rev Plant Biol* 61:291-315.
- Modi S, Sutcliffe MJ, Primrose WU, Lian LY, Roberts GC (1996) The catalytic mechanism of cytochrome P450 BM3 involves a 6 Å movement of the bound substrate on reduction. *Nat Struct Biol* 3 (5):414-417.

- Mor G, Eliza M, Song J, Wiita B, Chen S, Naftolin F (2001) 17 α -Methyl testosterone is a competitive inhibitor of aromatase activity in Jar choriocarcinoma cells and macrophage-like THP-1 cells in culture. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 79 (1-5):239-246.
- Mouri T, Michizoe J, Ichinose H, Kamiya N, Goto M (2006) A recombinant *Escherichia coli* whole cell biocatalyst harboring a cytochrome P450cam monooxygenase system coupled with enzymatic cofactor regeneration. *Appl Microbiol Biotechnol* 72 (3):514-520.
- Nabekura T, Yamaki T, Ueno K, Kitagawa S (2008) Inhibition of P-glycoprotein and multidrug resistance protein 1 by dietary phytochemicals. *Cancer Chemother Pharmacol* 62 (5):867-873.
- Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, et al. (1987) The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 6 (1):1-11.
- Nebert DW, Gonzalez FJ (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* 56:945-993.
- Nelson DR (2009) The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics* 4 (1):59-65.
- Nelson DR (2011) Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1814 (1):14-18.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6 (1):1-42.
- Newcomb M, Hollenberg PF, Coon MJ (2003) Multiple mechanisms and multiple oxidants in P450-catalyzed hydroxylations. *Arch Biochem Biophys* 409 (1):72-79.
- Niwa T, Murayama N, Yamazaki H (2009) Oxidation of endobiotics mediated by xenobiotic-metabolizing forms of human cytochrome. *Curr Drug Metab* 10 (7):700-712.
- O'Reilly E, Kohler V, Flitsch SL, Turner NJ (2011) Cytochromes P450 as useful biocatalysts: addressing the limitations. *Chem Commun (Camb)* 47 (9):2490-2501.
- Ogura H, Nishida CR, Hoch UR, Perera R, Dawson JH, Ortiz de Montellano PR (2004) EpoK, a cytochrome P450 involved in biosynthesis of the anticancer agents epothilones A and B. Substrate-mediated rescue of a P450 enzyme. *Biochemistry* 43 (46):14712-14721.
- Omura T (2005) Heme-thiolate proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 338 (1):404-409.

- Omura T, Sato R (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties. *J Biol Chem* 239:2379-2385.
- Ortiz de Montellano PR (2010) Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. *Chem Rev* 110 (2):932-948.
- Otey CR, Bandara G, Lalonde J, Takahashi K, Arnold FH (2006) Preparation of human metabolites of propranolol using laboratory-evolved bacterial cytochromes P450. *Biotechnol Bioeng* 93 (3):494-499.
- Park SY, Yamane K, Adachi S, Shiro Y, Weiss KE, Maves SA, Sligar SG (2002) Thermophilic cytochrome P450 (CYP119) from *Sulfolobus solfataricus*: high resolution structure and functional properties. *J Inorg Biochem* 91 (4):491-501.
- Podust LM, von Kries JP, Eddine AN, Kim Y, Yermalitskaya LV, Kuehne R, Ouellet H, Warriar T, Altekoster M, Lee JS, Rademann J, Oschkinat H, Kaufmann SH, Waterman MR (2007) Small-molecule scaffolds for CYP51 inhibitors identified by high-throughput screening and defined by X-ray crystallography. *Antimicrob Agents Chemother* 51 (11):3915-3923.
- Poeckel D, Werz O (2006) Boswellic acids: biological actions and molecular targets. *Curr Med Chem* 13 (28):3359-3369.
- Porwal S, Lal S, Cheema S, Kalia VC (2009) Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in *Bacillus*. *PLoS One* 4 (2):e4438.
- Pylypenko O, Schlichting I (2004) Structural aspects of ligand binding to and electron transfer in bacterial and fungal P450s. *Annu Rev Biochem* 73:991-1018.
- Qin Y-J, Feng B, Song X-B, Zhou W-B, Yu H-S, Zhao L-L, Yu L-Y, Ma B-P (2010) Biotransformation of Glycyrrhetic Acid by *Cunninghamella blakesleeana*. *Chinese Journal of Natural Medicines* 8 (5):373-381.
- Rarey M, Kramer B, Lengauer T (1997) Multiple automatic base selection: Protein–ligand docking based on incremental construction without manual intervention. *J Comput Aided Mol Des* 11 (4):369-384.
- Rarey M, Kramer B, Lengauer T, Klebe G (1996) A Fast Flexible Docking Method using an Incremental Construction Algorithm. *Journal of Molecular Biology* 261 (3):470-489.
- Rauschenbach R, Isernhagen M, Noeske-Jungblut C, Boidol W, Siewert G (1993) Cloning sequencing and expression of the gene for cytochrome P450_{meg}, the steroid-15 beta-monooxygenase from *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Mol Gen Genet* 241 (1-2):170-176.
- Rittle J, Green MT (2010) Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics. *Science* 330 (6006):933-937.

- Ro DK, Arimura G, Lau SY, Piers E, Bohlmann J (2005) Loblolly pine abietadienol/abietadienal oxidase PtAO (CYP720B1) is a multifunctional, multisubstrate cytochrome P450 monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (22):8060-8065.
- Ruijsenaars HJ, Sperling EM, Wiegerinck PH, Brands FT, Wery J, de Bont JA (2007) Testosterone 15beta-hydroxylation by solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12. *J Biotechnol* 131 (2):205-208.
- Rygu T, Hillen W (1991) Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl Microbiol Biotechnol* 35 (5):594-599.
- Rylott EL, Jackson RG, Edwards J, Womack GL, Seth-Smith HM, Rathbone DA, Strand SE, Bruce NC (2006) An explosive-degrading cytochrome P450 activity and its targeted application for the phytoremediation of RDX. *Nat, Biotechnol* 24 (2):216-219.
- Sagara Y, Wada A, Takata Y, Waterman MR, Sekimizu K, Horiuchi T (1993) Direct expression of adrenodoxin reductase in *Escherichia coli* and the functional characterization. *Biol Pharm Bull* 16 (7):627-630.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, vol 3. CSHL Press.
- Schenkman JB, Jansson I (1998) Spectral analyses of cytochromes P450. *Methods Mol Biol* 107:25-33.
- Schewe H, Kaup BA, Schrader J (2008) Improvement of P450(BM-3) whole-cell biocatalysis by integrating heterologous cofactor regeneration combining glucose facilitator and dehydrogenase in *E. coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78 (1):55-65.
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409 (6817):258-268.
- Scholle MD, White CA, Kunnimalaiyaan M, Vary PS (2003) Sequencing and characterization of pBM400 from *Bacillus megaterium* QM B1551. *Appl Environ Microbiol* 69 (11):6888-6898.
- Schroer K, Kittelmann M, Lutz S (2010) Recombinant human cytochrome P450 monooxygenases for drug metabolite synthesis. *Biotechnol Bioeng* 106 (5):699-706.
- Schroer K, Mackfeld U, Tan IA, Wandrey C, Heuser F, Bringer-Meyer S, Weckbecker A, Hummel W, Dausmann T, Pfaller R, Liese A, Lutz S (2007) Continuous asymmetric ketone reduction processes with recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 132 (4):438-444.
- Schroer K, Zelic B, Oldiges M, Lutz S (2009) Metabolomics for biotransformations: Intracellular redox cofactor analysis and enzyme kinetics offer insight into whole cell processes. *Biotechnol Bioeng* 104 (2):251-260.

- Sielaff B, Andreesen JR (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 (5):1148-1159.
- Simgen B, Contzen J, Schwarzer R, Bernhardt R, Jung C (2000) Substrate binding to 15beta-hydroxylase (CYP106A2) probed by FT infrared spectroscopic studies of the iron ligand CO stretch vibration. *Biochem Biophys Res Commun* 269 (3):737-742.
- Sono M, Roach MP, Coulter ED, Dawson JH (1996) Heme-Containing Oxygenases. *Chem Rev* 96 (7):2841-2888.
- Stammen S, Muller BK, Korneli C, Biedendieck R, Gamer M, Franco-Lara E, Jahn D (2010) High-yield intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium*. *Appl Environ Microbiol* 76 (12):4037-4046.
- Syrovets T, Buchele B, Gedig E, Slupsky JR, Simmet T (2000) Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and IIalpha. *Mol Pharmacol* 58 (1):71-81.
- Tischer W, Kasche V (1999) Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol* 17 (8):326-335.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24:145-149.
- Uhlmann H, Beckert V, Schwarz D, Bernhardt R (1992) Expression of bovine adrenodoxin in *E. coli* and site-directed mutagenesis of /2 Fe-2S/ cluster ligands. *Biochem Biophys Res Commun* 188 (3):1131-1138.
- Urlacher VB, Girhard M (2011) Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol*. doi:S0167-7799(11)00116-8 [pii]10.1016/j.tibtech.2011.06.012 [doi]
- Urlacher VB, Lutz-Wahl S, Schmid RD (2004) Microbial P450 enzymes in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 64 (3):317-325.
- Vary PS (1994) Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology* 140 (Pt 5):1001-1013.
- Vary PS, Biedendieck R, Fuerch T, Meinhardt F, Rohde M, Deckwer WD, Jahn D (2007) *Bacillus megaterium*--from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl Microbiol Biotechnol* 76 (5):957-967.
- Virus C (2006) Etablierung und Evaluierung eines Screeningsystems für die molekulare Evolution der Steroid-15 β -Hydroxylase (CYP106A2) aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.

- Virus C, Bernhardt R (2008) Molecular Evolution of a Steroid Hydroxylating Cytochrome P450 Using a Versatile Steroid Detection System for Screening. *Lipids* 43 (12):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 (Pt 6):1215-1218.
- Watts NB, Notelovitz M, Timmons MC, Addison WA, Wiita B, Downey LJ (1995) Comparison of Oral Estrogens and Estrogens Plus Androgen on Bone Mineral Density, Menopausal Symptoms, and Lipid-Lipoprotein Profiles in Surgical Menopause. *Obstetrics & Gynecology* 85 (4):529-537.
- Weis R, Winkler M, Schittmayer M, Kambourakis S, Vink M, Rozzell JD, Glieder A (2009) A Diversified Library of Bacterial and Fungal Bifunctional Cytochrome P450 Enzymes for Drug Metabolite Synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis* 351 (13):2140-2146.
- Wittchen KD, Meinhardt F (1995) Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. *Appl Microbiol Biotechnol* 42 (6):871-877.
- Wong TS, Arnold FH, Schwaneberg U (2004) Laboratory evolution of cytochrome p450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents. *Biotechnol Bioeng* 85 (3):351-358.
- Xin X, Liu Y, Ye M, Guo H, Guo D (2006) Microbial transformation of glycyrrhetic acid by *Mucor polymorphosporus*. *Planta Med* 72 (2):156-161.
- Yang Y, Biedendieck R, Wang W, Gamer M, Malten M, Jahn D, Deckwer WD (2006) High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Fact* 5:36.
- Yang Y, Malten M, Grote A, Jahn D, Deckwer WD (2007) Codon optimized *Thermobifida fusca* hydrolase secreted by *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng* 96 (4):780-794.
- Yun CH, Yim SK, Kim DH, Ahn T (2006) Functional expression of human cytochrome P450 enzymes in *Escherichia coli*. *Curr Drug Metab* 7 (4):411-429.
- Zehentgruber D, Hannemann F, Bleif S, Bernhardt R, Lutz S (2010) Towards preparative scale steroid hydroxylation with cytochrome P450 monooxygenase CYP106A2. *Chembiochem* 11 (5):713-721.
- Zhao J, Tan E, Ferras J, Auclair K (2007) Activity of human P450 2D6 in biphasic solvent systems. *Biotechnol Bioeng* 98 (2):508-513.
- Zulak KG, Bohlmann J (2010) Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense. *J Integr Plant Biol* 52 (1):86-97.

6 Anhang

6.1 Verwendete Expressionsplasmide

6.1.1 Expressionsplasmide für *E. coli*

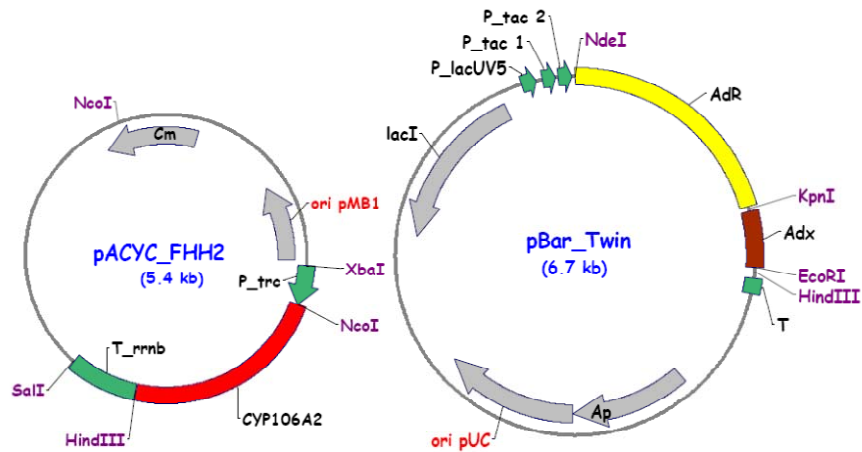


Abb. 6.1 Plasmide zur Koexpression von CYP106A2 und AdR/Adx. Der 6,7-kb große Vektor pBar_Twin beinhaltet zwei Kopien des tac und einen lacUV5 Promoter, die cDNAs von AdR und Adx₄₋₁₀₈, das β -Lactamasegen und den High-copy Replikationsursprung der pUC Plasmidserie sowie ein Ampicillinresistenzgen. Die cDNA von CYP106A2 befindet sich auf dem 5,4 kb großen Plasmid pACYC_FHH2.8 unter der Kontrolle des tac Promoters und eines vom *rrnB*-Gen abgeleiteten Transkriptionsterminators. Das Plasmid enthält den Low-Copy pMB1 Replikationsursprung und die Sequenz des Chloramphenicol-Resistenzgenes (Hannemann et al. 2006).

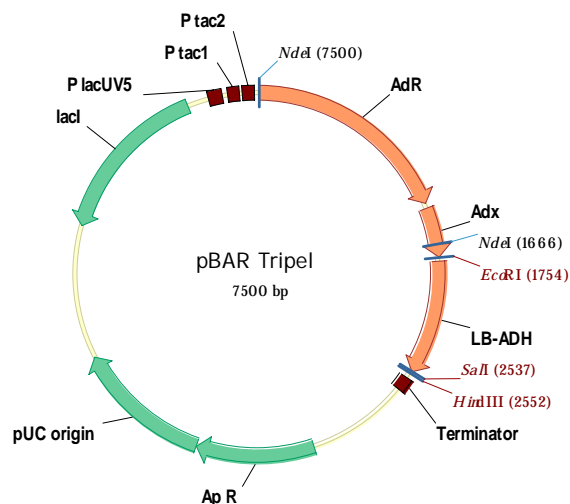


Abb. 6.2 Plasmid zur Koexpression von AdR/Adx/LB-ADH. Der 7,5-kb große Vektor pBar Tripel beinhaltet zwei Kopien des tac und einen lacUV5 Promoter, die cDNAs von AdR, Adx₄₋₁₀₈ und LB-ADH, das β -Lactamasegen und den High-copy Replikationsursprung der pUC Plasmidserie sowie ein Ampicillinresistenzgen.

6.1.2 Expressionsplasmide für *Bacillus megaterium*

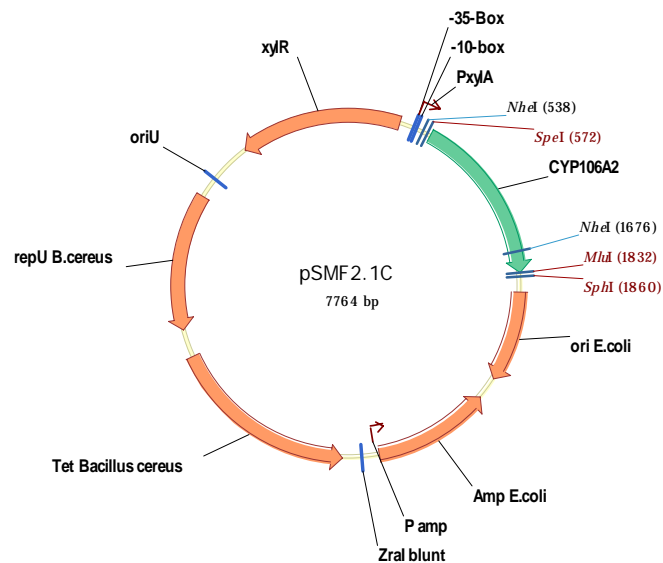


Abb. 6.3 Expressionsplasmid zur rekombinanten Proteinproduktion in *Bacillus megaterium*. Der 7.764 bp große Vektor pSMF2.1C beinhaltet die cDNA von CYP106A2. Elemente für die rekombinante, induzierbare Genexpression in *B. megaterium* sind der durch Xylose induzierbare Promotor (*PxyIA*) und das für den Xyloserepressor kodierende Gen (*xyIR*). Elemente für die Plasmidreplikation in *Bacillus* sind der Replikationsursprung *oriU*, *RepU*, und das Tetracyclinresistenzgen. Elemente für die Plasmidreplikation in *E.coli* sind der Replikationsursprung (*ori E.coli*) und das Ampizillinresistenzgen.

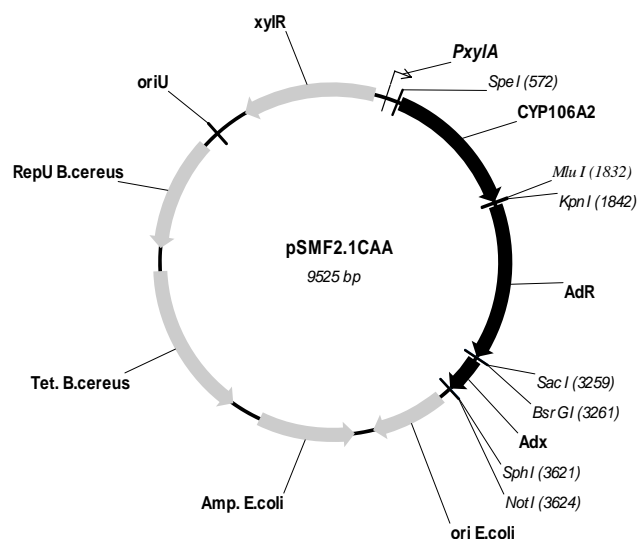


Abb. 6.4 Koexpressionsplasmid zur rekombinanten Proteinproduktion in *Bacillus megaterium*. Der 9.525 bp große Vektor pSMF2.1CAA beinhaltet die cDNAs von CYP106A2, AdR und Adx. Elemente für die rekombinante, induzierbare Genexpression in *B. megaterium* sind der durch Xylose induzierbare Promotor (*PxyIA*) und das für den Xyloserepressor kodierende Gen (*xyIR*). Elemente für die Plasmidreplikation in *Bacillus* sind der Replikationsursprung *oriU*, *RepU*, und das Tetracyclinresistenzgen. Elemente für die Plasmidreplikation in *E.coli* sind der Replikationsursprung (*ori E.coli*) und das Ampizillinresistenzgen (Bleif et al. 2011b).

6.2 Lösungen und Puffer für die Protoplastenpräparation und Transformation von *B. megaterium*

2 x AB3 (Antibiotic Medium No. 3)

7 g AB3 in 200 ml dH₂O

2 x SMM

1.16 g Maleinsäure (0.04 M)

0.8 g NaOH (0.08 M)

2.03 g MgCl₂ x 6H₂O (0.04 M)

85.58 g Saccharose (1 M)

in ca. 130 ml dH₂O in der angegebenen Reihenfolge lösen

pH mit HCl auf 6.5 einstellen

mit dH₂O auf 250 ml auffüllen

SMMP

2 x AB3 und 2 x SMM 1:1

PEG-P

20 g PEG-6000 auf 50 ml mit 1 x SMM auffüllen

CR5-Topagar (500 ml)

Lösung A:

51.5 g Saccharose

3.25 g MOPS

0.3 g NaOH

auf 250 ml mit dH₂O auffüllen

pH mit NaOH auf 7.3 einstellen

Lösung B:

2g Agar

0.1 g Casamino-Acids

5 g Hefe-Extrakt

mit 142.5 ml dH₂O auffüllen

8 x CR5-Salze

1.25 g K₂SO₄

50 g MgCl₂ x 6H₂O

0.25 g KH₂PO₄

11 g CaCl₂

in 625 ml dH₂O lösen

12 % Prolin

3 g Prolin

auf 25 ml mit dH₂O auffüllen

20 % Glucose

20 g Glucose

auf 100 ml mit dH₂O auffüllen

Für 3.5 ml CR5-Topagar

1.75 ml Lösung A

1 ml Lösung B

0.346 ml CR5-Salze

0.175 ml 12 % Prolin

0.175 ml 20 % Glucose

6.3 Sequenzen

Auf den Codon Adaptation Index (CAI) von *B. megaterium* optimierte cDNA von AdR.

atgtctacacaagaacaaacacctcaaatttgtagtaggatctggacctgctggattttatacagctcaacatcttttaaacaatca
ttctcgcgctcatgtagatattatgaaaaacaactgtacctttggattagttcgttttggagtagctcctgatcatcctgaagtaa
aaacgtaattaacacatttacacagacagctcgttctgatcgttgctttttatggaaatgtagaagtaggacgtgatgaacgta
caagaacttcaagatgcttatcatgctgtagtattatcttatggctgaagatcatcaagcttttagatattccagggtgaagaattacc
tgggtatcttctgctcgtgctttgttaggatggataatggattacctgaaaatcgtgaattagctcctgattatcttgtgatacagct
gtaatcttaggacaaggcaacgtagcttttagatgtagctcgtatctttattaacacctccggatcatttagaaaaaacggatattacag
aagctgctctggagctttacgtcaatctcgtgtaaaaaacagatggattgtaggacgtcgtggacctttacaagtagcttttacgatt
aaagaacttcgcgaaatgattcaattacctggaacacgctcctatgtagatcctgctgatttttaggacttcaggatcgtattaaaga
agctgcacgtcctcgtaaacgtttaatggaattattattacgtacagctacagaaaaacctgggtagaagaagctgctcgtagagc
atctgcttctcgtgcttggggattacgttttttcgtagccctcaacaagtattaccttctcctgatggacgtcgtgctgctggaattcgtt
tagctgtaacacgctttagaaggattggagaagctacacgtgctgtacctacaggtgatgtagaagattaccttggacttgattatta
agctctattggatataaatctcgtcctattgatccttctgtacctttgatcctaaatagggtgtagtacctaataatggaaggacgtgtag
tagatgtacctggattatattgttctggatgggtaaaacgtggacctacaggtgtaattacaacaacaatgacagatagcttttaac
aggccaaattctttacaagatctaaagctggacattaccttcaggacctcgtcctggatcgtctttattaagctttacttgattct
cgtggagatggcctgtatcttttctgattgggaaaaattagatgctgaagaagatcttagaggacaagcttctggaaaacctcgtg
aaaaattattagatcctcaagaaatgcttcgtttacttggccac**taa**

6.4 Veröffentlichungen und Patente

Bleif S., Hannemann F., Zapp J., Hartmann D., Jauch J., Bernhardt R.

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. (2011) *in press*.

Bleif S., Hannemann F., Lisurek M., von Kries J.P., Zapp J., Dietzen M., Antes I., Bernhardt R.

Identification of CYP106A2 as a regioselective allylic bacterial diterpene hydroxylase.

ChemBioChem (2011), 12 (4): 576-582.

Zehentgruber D., Hannemann F., **Bleif S.**, Bernhardt R., Lütz S.

Towards preparative scale steroid hydroxylation with cytochrome P450 monooxygenase CYP106A2.

ChemBioChem (2010), 11(5): 713-721.

Bleif S., Hannemann F., Lisurek M., von Kries J.P., Zapp J., Jauch J., Bernhardt R.

Biokatalysator für die Hydroxylierung von Di- und Triterpenen.

Patent (2009), DE 102009025996.1.

Weiterhin sind zwei Veröffentlichungen als Koautor in Vorbereitung, die die Ergebnisse des Glycyrrhetinsäureumsatzes und den Einfluss der Redoxpartner auf die Regioselektivität der CYP106A2-abhängigen Hydroxylierung beinhalten.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden internationalen Konferenzen präsentiert:

Bleif S., von Kries J.P., Lisurek M., Hannemann F., Bernhardt R.

New substrates of CYP106A2 from *Bacillus megaterium* ATCC 13368. **(Vortrag)**

6th Status Seminar Chemical Biology, DECHEMA, Frankfurt, Deutschland, 30. November-1. Dezember, 2009.

Bleif S, von Kries J.P., Lisurek M., Hannemann F., Bernhardt R.

New potential substrates of CYP106A2 from *Bacillus megaterium* ATCC 13368. **(Poster)**

16th International Conference on Cytochrome P450, Nago, Okinawa, Japan, 21. -25. Juni, 2009.

Bleif S, von Kries J.P., Lisurek M., Hannemann F., Bernhardt R.

New substrates of CYP106A2. **(Poster)**

FEBS Advanced Course, Cytochrome P450 Systems: from Structure to Application, Kranjska Gora, Slowenien, 23.-28. September, 2008.

Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Rita Bernhardt bedanke ich mich für die Überlassung der interessanten Fragestellung, die stete Diskussionsbereitschaft, das rege Interesse am Fortschritt dieser Arbeit und den gewährten Freiraum bei der Bearbeitung dieses Themas. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, an internationalen Kongressen teilzunehmen.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Dr. Frank Hannemann, der mir unglaublich viel beigebracht hat. Danke für die konstruktiven Diskussionen, die Unterstützung im *B. megaterium* Projekt, für die Durchsicht von Postern, Vorträgen und Publikationen und natürlich für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Johann Jauch (Institut für Organische Chemie, Universität des Saarlandes) danke ich für die Bereitstellung der 11-Keto- β -boswelliasäure, sowie für die zahlreichen Tipps im Umgang mit den pentacyclischen Triterpenen.

Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn (Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig) danke ich für die Bereitstellung des *B. megaterium* Shuttle-Vektors pKMBm4 und des *B. megaterium* Stamms MS941. Simon Stammen (Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig) sei gedankt für die hilfreichen Hinweise im Umgang mit *B. megaterium* und für die konstruktiven Telefonkonferenzen.

Herrn Dr. Stephan Lütz (Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich) danke ich für die Bereitstellung des Plasmids pBTacLbADH.

Herrn Dr. Josef Zapp (Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität des Saarlandes) möchte ich überaus danken für die Messungen der NMR-Spektren und seine Geduld in den zahlreichen Stunden, in denen er mir die Auswertung der 2D-NMR-Spektren näher gebracht hat.

Matthias Dietzen und Frau Prof. Dr. Iris Antes (Max-Planck-Institut für Informatik, Universität des Saarlandes) sei gedankt für die Durchführung der molekularen Dockingkalkulationen.

Desweiteren bedanke ich mich bei Katharina „Katharinchen“ Bompais und Wolfgang „Der wahre MacGyver“ Reinle für die Bereitstellung der gereinigten Proteine, die hilfreichen Ratschläge, das immer offene Ohr bei Problemen und die moralische Unterstützung.

Auch bei Gabi „The secretary“ Schon möchte ich mich für die Hilfe bei allen organisatorischen Problemen bedanken und natürlich für die Unterstützung, oftmals in Form von Schokolade.

Ein ganz großer Dank gilt meinem Labor-und Büronachbarn Michael „The Master“ Ringle, der mich in schwierigen Phasen immer wieder aufgebaut hat. Ich danke dir, für dein immer offenes Ohr, für die konstruktiven Diskussionen, für die wirklich lustige Zeit im Labor und ganz besonders für deine bedingungslose Freundschaft. Ich werde dich vermissen!

Ein großer Dank geht an Ming-Kwai „W“ Giese für die lustige Zeit. Ich danke dir für deine Unterstützung und deine Fähigkeit mir innerhalb von 5 Minuten das Gefühl zu geben, alles erreichen zu können.

Kerstin „Ewensen“ Ewen sei gedankt für die vielen aufbauenden Gespräche, insbesondere während der stressigen Bewerbungsphase und die Versorgung mit Grundnahrungsmitteln, wenn es mal später wurde. Geteiltes Leid ist halbes Leid. Dankeschön.

Yogan „Mr Khatri“ Khatri, danke ich für die konstruktiven Diskussionen und natürlich für die Versorgung mit Süßigkeiten.

Tarek „Hakki Tak“ Hakki danke ich für die lustige Zeit im Büro und die hilfreichen Tipps.

Anna „Anna-San“ Hobler und Daniela „Danie“ Schmitz sei gedankt für die lustigen Unternehmungen nach Dienstschluss.

Allen Teilnehmern der Untergruppe „CYP106A2 und CYP105A1“ für die konstruktiven Anregungen.

Dem gesamten Lab 348, insbesondere Jens „El Hombre“ Neunzig, Michael “The Master“ Ringle, Ming-Kwai „W“ Giese und Michael „Hektor“ Kleser für die lustige Zeit im Labor. Es hat unglaublich viel Spaß gemacht mit euch zu arbeiten!

Allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des AK Bernhardtts danke ich für das angenehme Arbeitsklima und den Spaß, den wir zusammen hatten.

Ein großes Dankeschön geht an meine ehemaligen Kommilitonen Saskia Hähn und Frauke Maurer für die zahlreichen Aufmunterungen. Frauke, ich danke dir für die tolle gemeinsame

Studienzeit und dafür, dass du meine Launen tapfer ertragen hast. Danke, für die Freundschaft, die uns verbindet.

Ein Dank geht an „die Mädels“ Zsa-Zsa Buch, Ramona Hessedenz, Nicole Seegmüller, Julia Conrad und Sandra Marbotte-Bystry für ihre Unterstützung und dafür dass sie mir immer vor Augen führen, dass da draußen auch noch ein Leben ohne Chemie existiert. Besonders Zsa-Zsa danke ich für unsere einzigartige Freundschaft.

Ein großes Dankeschön geht an meine Großeltern Ilse und Karl Matheis für ihre Liebe und Unterstützung. Ich vermisse euch!

Zudem bedanke ich mich bei meinem Onkel Werner Bleif für die aufmunternden Gespräche und natürlich für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an meinen Freund Mark Bartholomä, der mich in jeder nur erdenklichen Weise unterstützt, meinen perfektionistischen Wahnsinn erträgt und der es wie kein anderer versteht, mich jeden Tag aufs neue zu motivieren. Trotz des „großen Teichs“ zwischen uns, hast du mir in den letzten 4 Jahren nie das Gefühl gegeben allein zu sein.

Mein letzter und größter Dank gilt meinen wunderbaren Eltern Ulrike und Friedrich Bleif, die mich in all meinen Vorhaben unterstützen und mir das Gefühl geben, Berge versetzen zu können. Ohne euch wäre das alles niemals möglich gewesen. Danke!