

**Identifizierung und Charakterisierung
neuer Cytochrom P450 Systeme
aus *Bacillus megaterium* DSM319**

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. Biol. Elisa Brill

Saarbrücken

2013

Tag des Kolloquiums: 20.11.2013

Dekan: Prof. Dr. Volkhard Helms

Berichterstatter: Prof. Dr. Rita Bernhardt
Prof. Dr. Gert-Wieland Kohring

Vorsitz: Prof. Dr. Uli Müller

Akad. Mitarbeiter: Dr. Konstantin Schneider

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	2
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
SUMMARY	7
ZUSAMMENFASSUNG	8
1. EINLEITUNG	9
1.1. CYTOCHROM P450 SYSTEME	9
1.1.1. <i>Allgemeine Aspekte</i>	9
1.1.2. <i>Aufbau und Struktur der Cytochrome P450</i>	10
1.1.3. <i>Reaktionen und Mechanismus der Cytochrome P450</i>	12
1.1.4. <i>Redoxpartner der Cytochrome P450</i>	15
1.1.5. <i>Substrate der Cytochrome P450</i>	21
1.1.6. <i>Biotechnologische Anwendung der Cytochrome P450</i>	22
1.1.7. <i>Mikrobielle Cytochrome P450</i>	25
1.2. <i>BACILLUS MEGATERIUM</i>	26
1.3. CYTOCHROME P450 AUS <i>BACILLUS MEGATERIUM</i>	28
1.4. AUFGABENSTELLUNG.....	29
2. MATERIAL UND METHODEN.....	31
2.1. MATERIAL.....	31
2.1.1. <i>Bakterienstämme</i>	31
2.1.2. <i>Oligonukleotide</i>	32
2.1.3. <i>Vektoren</i>	32
2.2. METHODEN	34
2.2.1. <i>Bioinformatische Methoden</i>	34
2.2.2. <i>Molekularbiologische Methoden</i>	34
2.2.3. <i>Mikrobiologische Methoden</i>	37
2.2.4. <i>Proteinreinigung der Proteine aus B. megaterium</i>	39
2.2.5. <i>Proteinanalysen</i>	41
2.2.6. <i>Spektroskopische Methoden</i>	42
2.2.7. <i>Cytochrom P450 abhängige Substratumsätze</i>	46
2.2.8. <i>Chromatographische Methoden</i>	48
2.2.9. <i>Quantitative Real-Time Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)</i>	49
3. ERGEBNISSE	53
3.1. BIOINFORMATISCHE ANALYSEN.....	53
3.1.1. <i>Untersuchung der Cytochrome P450</i>	54

3.1.2.	<i>Untersuchung des Flavodoxins</i>	56
3.1.3.	<i>Untersuchung der Ferredoxine</i>	57
3.1.4.	<i>Untersuchung der Ferredoxin Reduktasen</i>	58
3.2.	KLONIERUNG, EXPRESSION UND REINIGUNG VON PROTEINEN	60
3.3.	SPEKTROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG.....	63
3.3.1.	<i>Cytochrome P450</i>	64
3.3.2.	<i>Flavodoxin</i>	65
3.3.3.	<i>Ferredoxine</i>	66
3.3.4.	<i>Ferredoxin Reduktasen</i>	68
3.4.	TYP I-DIFFERENZSPEKTROSKOPIE UND BESTIMMUNG DER DISSOZIATIONSKONSTANTEN K_D	68
3.4.1.	<i>CYP106A1</i>	69
3.4.2.	<i>CYP109E1</i>	73
3.4.3.	<i>CYP109A2</i>	77
3.5.	<i>IN VITRO</i> SUBSTRATUMSATZ	77
3.5.1.	<i>In vitro Substratumsatz mit CYP106A1</i>	78
3.5.2.	<i>In vitro Substratumsatz mit CYP109E1</i>	85
3.5.3.	<i>In vitro Substratumsatz mit CYP109A2</i>	89
3.6.	SCREENING DER NATURSTOFFBIBLIOTHEK MIT CYP106A1	91
3.7.	KINETISCHE ANALYSEN	95
3.7.1.	<i>Kinetische Analyse des CYP106A1-abhängigen KBA Umsatzes</i>	96
3.7.2.	<i>Kinetische Analyse des CYP109E1-abhängigen Vitamin D3 Umsatzes</i>	97
3.7.3.	<i>Kinetische Analyse des CYP109A2-abhängigen Vitamin D3 Umsatzes</i>	98
3.8.	QUANTITATIVE REAL-TIME REVERSE TRANSKRIPTASE PCR (QRT-PCR)	99
3.9.	<i>BACILLUS MEGATERIUM</i> MS941 GANZZELLSYSTEM.....	101
3.9.1.	<i>Expression der Cytochrome P450 und der Redoxproteine in Bacillus megaterium MS941</i> . 102	
3.9.2.	<i>Ganzzellumsätze in Bacillus megaterium MS941</i>	105
3.10.	NMR CHARAKTERISIERUNG DER UMSATZPRODUKTE.....	111
3.10.1.	<i>Produktcharakterisierung des CYP106A1-abhängigen KBA Umsatzes</i>	111
3.10.2.	<i>Produktcharakterisierung der CYP109E1- und CYP109A2- abhängigen Substratumsätze</i> ..	112
3.11.	ZEITABHÄNGIGE <i>IN VIVO</i> SUBSTRATUMSETZUNGEN	115
3.11.1.	<i>Zeitabhängiger KBA Umsatz durch CYP106A1 Biokatalysatoren</i>	116
3.11.2.	<i>Zeitabhängiger Vitamin D3 Umsatz durch CYP109E1 Biokatalysatoren</i>	118
3.11.3.	<i>Zeitabhängiger Vitamin D3 Umsatz durch CYP109A2 Biokatalysatoren</i>	120
4.	DISKUSSION UND AUSBLICK	122
4.1.	BIOINFORMATISCHE ANALYSEN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON CYTOCHROM P450 SYSTEMEN	123
4.2.	EXPRESSION, REINIGUNG UND SPEKTROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG	125
4.3.	IDENTIFIZIERUNG VON REDOXPARTNERN DER CYTOCHROME P450	127
4.4.	QUANTITATIVE REAL-TIME REVERSE TRANSKRIPTASE PCR (QRT-PCR)	130
4.5.	IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTRATEN UND KATALYTISCHE AKTIVITÄT	132

4.5.1.	<i>Substratidentifizierung für CYP106A1 und kinetische Analyse des CYP106A1-abhängigen KBA Umsatzes</i>	132
4.5.2.	<i>Substratidentifizierung für CYP109E1 und CYP109A2 und kinetische Analysen der CYP109E1- und CYP109A2-abhängigen Vitamin D3 Umsätze</i>	137
4.6.	GANZZELLUMSÄTZE IN <i>B. MEGATERIUM</i>	140
4.7.	STRUKTURAUFKLÄRUNG DER PRODUKTE.....	141
4.7.1.	<i>Produktcharakterisierung des CYP106A1-abhängigen KBA Umsatzes</i>	141
4.7.2.	<i>Produktcharakterisierung der CYP109E1- und CYP109A2-abhängigen Substratumsätze</i> ..	142
4.8.	EINFLUSS DER REDOXPARTNER AUF DIE PRODUKTBILDUNG	150
5.	LITERATURVERZEICHNIS	155
6.	ANHANG	167
6.1.	OLIGONUKLEOTIDE	167
6.2.	VERWENDETE PLASMIDE.....	169
6.2.1.	<i>Expressionsplasmide für E. coli</i>	169
6.2.2.	<i>Expressionsplasmide für B. megaterium</i>	170
6.3.	AMINOSÄURESEQUENZEN.....	171
6.4.	NMR-DATEN	173
6.5.	VERÖFFENTLICHUNGEN UND PATENTE.....	177

Abkürzungsverzeichnis

AdR	Adrenodoxinreduktase
Adx	Adrenodoxin
Ap	Ampicillin
Arh1	Adrenodoxin Reduktase Homolog 1
<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CYP, P450	Cytochrom P450
δ	Chemische Verschiebung
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
FdR	Ferredoxinreduktase
Fdx	Ferredoxin
Fld	Flavodoxin
FMN	Flavinmononukleotid
Fpr	Ferredoxin-/Flavodoxinreduktase aus <i>Escherichia coli</i>
g	Gramm
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
LC	Flüssigchromatographie (Liquid Chromatography)
LC-MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
M	Molar; mol pro Liter
min	Minute
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NB	Nutrient Broth I (Nährmedium)
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PdR	Putidaredoxinreduktase
Pdx	Putidaredoxin

pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	parts per million
qRT-PCR	quantitative real-time Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
SRS	Substraterkennungsstelle (substrate recognition site)
T	Temperatur
TB	Terrific Broth (Nährmedium)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV/Vis	Ultravioletter und visueller Wellenlängenbereich
Vmax	maximale Geschwindigkeit

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 are versatile biocatalysts that catalyze the regio- and stereospecific oxidation of non-activated hydrocarbons. In the genome of *Bacillus megaterium* DSM319, a strain who has recently been sequenced, genes encoding cytochromes P450 and potential redox partners of the cytochromes P450 were identified. Three cytochromes P450, CYP106A1, CYP109E1 und CYP109A2, and eight potential autologous redox proteins, one flavodoxin (Fld), four ferredoxins and three ferredoxin reductases, were cloned, expressed and purified. Fld and three ferredoxins were able to support the activity of the P450s displaying the first cloned natural redox partners of cytochromes P450 from *B. megaterium*. Using qRT-PCR a co-expression of the P450s with Fld under iron limiting conditions and with one ferredoxin under sufficient iron supply was demonstrated indicating that *B. megaterium* can switch between different redox proteins depending on the iron level. For all cytochromes pharmaceutically interesting substrates like steroids, terpenes und vitamin D3 were identified. In order to provide sufficient amounts of the products to characterize them structurally by NMR spectroscopy, recombinant *B. megaterium* MS941 whole-cell biocatalysts were constructed, which are also the basis for a biotechnological application of the cytochrome P450 systems. Thereby, CYP109E1 was identified as the first wildtype 16 β -steroidhydroxylase.

Zusammenfassung

Cytochrome P450 sind vielseitige Biokatalysatoren, die die regio- und stereospezifische Oxidation nicht-aktivierter Kohlenwasserstoffe katalysieren. In dem Genom des kürzlich sequenzierten *Bacillus megaterium* Stammes DSM319 wurden Gene identifiziert, die Cytochrome P450 und mögliche Redoxpartner kodieren. Drei Cytochrome P450, CYP106A1, CYP109E1 und CYP109A2, sowie acht potentielle autologe Redoxproteine, ein Flavodoxin (Fld), vier Ferredoxine und drei Ferredoxin Reduktasen, wurden kloniert, exprimiert und gereinigt. Fld und drei Ferredoxine waren in der Lage, die Aktivität der P450s zu unterstützen und stellen damit die ersten klonierten natürlichen Redoxpartner von Cytochromen P450 aus *B. megaterium* dar. Mittels qRT-PCR wurde eine Koexpression der P450s mit Fld unter Eisenmangel und mit einem Ferredoxin bei ausreichender Eisenversorgung nachgewiesen, so dass *B. megaterium* in Abhängigkeit des verfügbaren Eisens zwischen verschiedenen Redoxproteinen wechseln kann. Für alle drei Cytochrome konnten pharmazeutisch interessante Substrate wie Steroide, Terpene und Vitamin D3 identifiziert werden. Um ausreichende Mengen der Produkte für eine strukturelle Charakterisierung mittels NMR zur Verfügung zu stellen, wurden rekombinante *B. megaterium* MS941 Ganzzellbiokatalysatoren konstruiert, welche auch die Grundlage für einen biotechnologischen Einsatz der Cytochrom P450 Systeme bilden. Dabei konnte mit CYP109E1 die erste bakterielle Wildtyp 16 β -Steroidhydroxylase identifiziert werden.

1. Einleitung

1.1. Cytochrom P450 Systeme

1.1.1. Allgemeine Aspekte

Cytochrome P450 (CYPs, P450s) stellen eine Superfamilie von Häm b enthaltenden externen Monooxygenasen dar, die ein Eisen-ProtoporphyrinIX als prosthetische Gruppe enthalten. Im Jahre 1958 wurde erstmals ein CO-bindendes Pigment aus Lebermikrosomen von Schweinen bzw. Ratten isoliert, welches im reduzierten, CO-gebundenen Zustand ein Absorptionsmaximum bei 450 nm aufwies (Garfinkel 1958; Klingenberg 1958). Omura und Sato wiesen später nach, dass es sich bei diesem Pigment um ein atypisches Hämoprotein handelte, dem sie aufgrund der Ausbildung des Absorptionsmaximums bei 450 nm im reduzierten Eisen-CO-Komplex den Namen Cytochrom P450 gaben und das sie näher charakterisierten (Omura und Sato 1962; Omura und Sato 1964a; Omura und Sato 1964b). Seither wuchs die Zahl der Cytochrome P450 stetig und umfasste zu Beginn des Jahres 2013 mehr als 18500 verschiedene Enzyme (Nelson 2013) aus allen biologischen Reichen (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>). Dabei unterscheidet sich die Anzahl der Cytochrome P450 in den verschiedenen Organismen zum Teil stark: Während der Mensch 57 und Pflanzen oft mehrere Hundert verschiedene Cytochrome P450 enthalten (Ortiz de Montellano 2010), besitzt das Myxobakterium *Sorangium cellulosum* So ce56 21 Cytochrom P450 Gene (Khatri et al. 2010), das Darmbakterium *E. coli* jedoch keines. Die Vielzahl der identifizierten Cytochrome P450 erforderte eine einheitliche Nomenklatur, nach der alle Cytochrome P450 auf der Basis von Sequenzhomologien eingeteilt werden. Bei dem Cytochrom P450 CYP106A1 zum Beispiel steht CYP für Cytochrom P450, die arabische Zahl 106 für die Familie, der Buchstabe A für die Unterfamilie und die zweite arabische Zahl 1 für das individuelle Enzym. Bei einer Sequenzidentität von mindestens 40% gehören Cytochrome zu einer Familie, bei mindestens 55% Sequenzidentität zu einer Unterfamilie.

1.1.2. Aufbau und Struktur der Cytochrome P450

Obwohl Cytochrome P450 aus verschiedenen Genfamilien oft weniger als 20% Sequenzidentität aufweisen, besitzen alle Cytochrome P450 eine ähnliche Faltung und räumliche Struktur, die auf einen gemeinsamen Mechanismus der Sauerstoff Aktivierung hinweisen (Graham und Peterson 1999). Dabei ist die Kernstruktur sehr stark konserviert, während die variableren Regionen an der Substraterkennung und -bindung sowie der Redoxpartnerbindung beteiligt sind (Graham und Peterson 1999). Die konservierte P450 Kernstruktur wird von einem Vier-Helix-Bündel gebildet, das aus den drei parallelen Helices D, L und I und der antiparallelen Helix E besteht (Abb. 1.1A) (Presnell und Cohen 1989). Die Hämgruppe befindet sich zwischen der distalen I-Helix und der proximalen L-Helix und ist über ein Cystein an den Loop gebunden, der auch das Hämbindemotiv $FxxGx(H/R)xCxG$ enthält (Denisov et al. 2005). Bei diesem absolut konservierten Cystein handelt es sich um den fünften Liganden des Hämeisens. Dieser Schwefelligand liegt als Thiolat vor und bildet die Grundlage der charakteristischen namensgebenden Absorption des reduzierten Eisen-CO-Komplexes bei 450 nm (Abb. 1.1B). Aufgrund dieser Cystein Thiolat Gruppe werden Cytochrome auch als Häm-Thiolat-Proteine bezeichnet. Die lange I-Helix ist in unmittelbarer Nähe des Häms lokalisiert und enthält die konservierte Konsensussequenz $(A/G)GxS(E/D)T$. Das stark konservierte Threonin befindet sich im aktiven Zentrum und spielt eine wichtige Rolle für die Aktivierung des molekularen Sauerstoffs im Katalysezyklus (Denisov et al. 2005). Die Aminosäuren Glutaminsäure und Arginin des $ExxR$ Motivs in der K-Helix bilden eine weitere konservierte Sequenz, die Bestandteil aller Cytochrome P450 ist (Nelson et al. 1996). Obwohl die räumliche Struktur der Cytochrome P450 stark konserviert ist, gibt es zwischen verschiedenen Cytochromen dennoch eine strukturelle Diversität, die es zum Beispiel ermöglicht, dass Cytochrome Substrate umsetzen, die sich in ihrer Größe sehr stark unterscheiden (Denisov et al. 2005). Auf der strukturellen Ebene wird die Substraterkennung und -bindung durch die sechs sogenannten Substraterkennungsstellen (substrate recognition sites, SRS) vermittelt (Gotoh 1992) (Abb. 1.1A). Diese bilden die Grundlage dafür, dass Cytochrome P450 zu den vielseitigsten bekannten Biokatalysatoren gehören und erklären die bemerkenswerte Vielfalt der katalysierten chemischen Reaktionen und die große Zahl der umgesetzten Substrate (Hannemann et al. 2007).

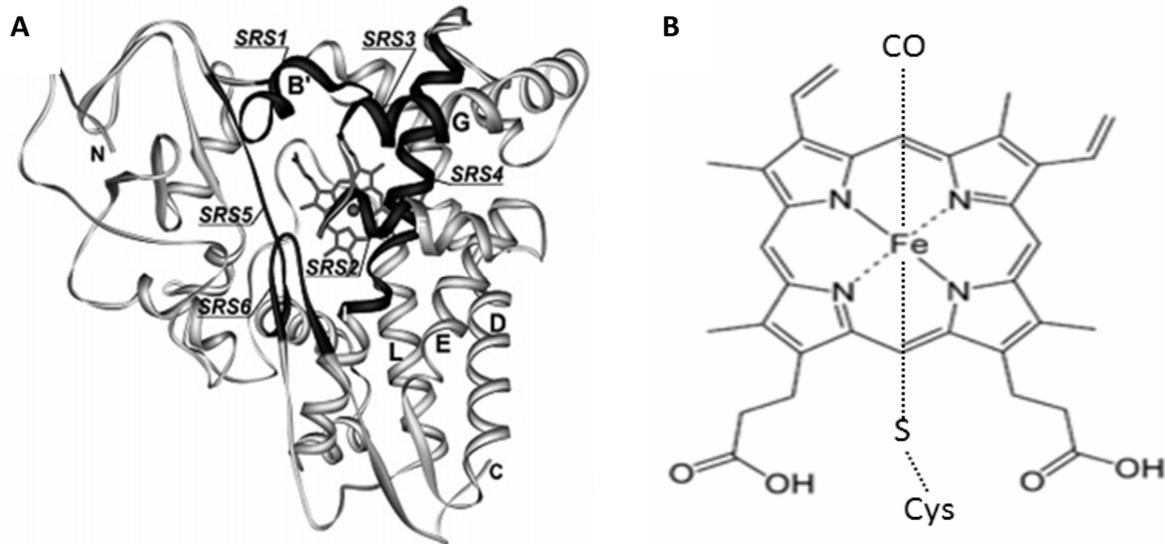


Abb. 1.1: (A) Die dreidimensionale Struktur aller Cytochrome P450 ist sehr stark konserviert und wird von verschiedenen α -Helices, β -Faltblättern und Loops gebildet. Die Substraterkennung und -bindung wird durch die sechs Substraterkennungsstellen (SRS) vermittelt. Die Grafik wurde aus (Denisov et al. 2005) entnommen. (B) Schematische Darstellung des P450-Häms im reduzierten Eisen-CO-Komplex mit dem konservierten Cystein als fünften Liganden des Hämeisens. Dieser Komplex bildet die Grundlage der charakteristischen namensgebenden Absorption der Cytochrome P450 bei 450 nm.

Die prosthetische Hämgruppe der Cytochrome P450 kann als nützlicher Chromophor bei Untersuchungen zur Bindung von Substraten und Inhibitoren dienen. Durch die Anlagerung von Substraten oder Inhibitoren verändert sich das Ligandenfeld des Häm-Eisens, was spektralphotometrisch verfolgt und zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten (K_D) genutzt werden kann. Grundsätzlich werden drei verschiedene Bindungsspektren unterschieden, bei denen es sich um Typ I, Typ II und reverse Typ I Spektren, die auch als modifizierte Typ II Spektren bezeichnet werden, handelt (Schenkman und Jansson 1998). Ein Typ I Spektrum resultiert aus der Verdrängung des axialen Wassers von der sechsten Koordinationsstelle des Häm-Eisens, wodurch ein Übergang vom low-spin Zustand (417 nm) zum high-spin Zustand induziert wird. Dieser high-spin Zustand ist durch ein Maximum bei etwa 390 nm und ein Minimum bei etwa 420 nm gekennzeichnet (Abb. 1.2) und kann vorwiegend bei der Bindung von Substraten an Cytochrome P450 beobachtet werden (Schenkman und Jansson 1998). Wie aus Abb. 1.2 hervorgeht, weisen TypII Spektren ein Minimum bei 390-405 nm und ein Maximum bei 425-435 nm auf (Schenkman und Jansson 1998) und treten meist bei der Bindung eines Inhibitors an ein Cytochrom auf. Diese oft

Stickstoffatome enthaltenden Inhibitoren stabilisieren das geringe Reduktionspotential des P450 und verhindern die Bindung von Sauerstoff an das Häm (Locuson et al. 2007). Der reverse Typ I oder modifizierte Typ II Shift ist ein Spiegelbild des Typ I Shifts mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm und einem Minimum bei 390 nm (Shimada et al. 2013). Die genauen, dieser spektralen Verschiebung zugrunde liegenden, Wechselwirkungen sind bisher unbekannt.

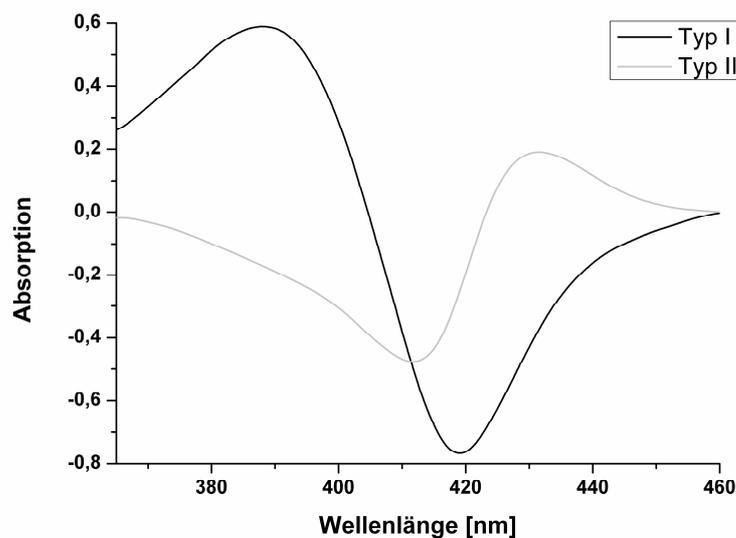


Abb. 1.2: Differenzspektren, die bei der Bindung eines Substrates bzw. eines Inhibitors an ein Cytochrom P450 beobachtet werden. Die Bindung eines Substrates induziert meist ein TypI-Spektrum (schwarz), die eines Inhibitors ein TypII-Spektrum (grau).

1.1.3. Reaktionen und Mechanismus der Cytochrome P450

Die Cytochrome P450 fungieren meist als terminale Monooxygenasen, indem sie molekularen Sauerstoff aktivieren und ein Sauerstoffatom in das Substrat integrieren, während das andere Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird. Da die Cytochrome die für diese Reaktion benötigten Elektronen von einem externen Elektronendonator erhalten, handelt es sich bei diesen Enzymen um externe Monooxygenasen. Die Cytochrome P450 katalysieren folgende Reaktion, indem sie NAD(P)H als externen Elektronendonator benutzen, wobei RH das Substrat darstellt und ROH das entsprechende hydroxylierte Produkt:



Cytochrome P450 sind durch eine sehr hohe Diversität bezüglich der von ihnen katalysierten Reaktionen und der umgesetzten Substrate charakterisiert: Die von Cytochromen P450 katalysierten Reaktionen umfassen zum Beispiel Hydroxylierungen, N-, O- und S-Desalkylierungen, Sulfoxidationen, Epoxidierungen, Desaminierungen, Entschwefelungen, Dehalogenierungen, Peroxidierungen und N-Oxid-Reduktionen (Bernhardt 2006). Wegen dieser Vielseitigkeit sind die Cytochrome in verschiedene biologische Prozesse wie die Assimilierung von Kohlenstoffquellen, die Karzinogenese, die Biosynthese von fettlöslichen Vitaminen, Gallensäuren, Fettsäuren und Steroidhormonen, die Degradierung von Herbiziden und Insektiziden und den Metabolismus von Arznei- und Fremdstoffen involviert (Bernhardt 1996; Bernhardt und Waterman 2007; Urlacher und Eiben 2006; Werck-Reichhart und Feyereisen 2000). Die Substrate der Cytochrome P450 schließen Steroide, Fettsäuren, Prostaglandine, Pestizide, Arzneistoffe, Karzinogene, Anästhetika und organische Lösemittel ein (Bernhardt 1996; Bernhardt 2006). Diese hohe Vielseitigkeit bezüglich der katalysierten Reaktionen und der umgesetzten Substrate stellt die Grundlage für das große biotechnologische Potential der Cytochrome P450 dar (Bernhardt 2006; Urlacher und Girhard 2012): Durch die Aktivität der Cytochrome P450 kann eine Vielzahl von Substanzen produziert werden, deren chemische Synthese zum Beispiel durch selektive Hydroxylierungen sowohl schwierig als auch teuer ist.

Der Katalysezyklus, der allen Cytochrom P450 Reaktionen zugrunde liegt, wurde 1968 basierend auf Untersuchungen an CYP101A1 aus *Pseudomonas putida* und an mikrosomalen Systemen (Estabrook et al. 1971; Katagiri et al. 1968) vorgeschlagen und ist heute in einer aktualisierten Form allgemein akzeptiert. Dieser in Abb. 1.3 dargestellte Katalysezyklus, der eine sequentielle Zwei-Elektronen-Reduktion des Cytochroms P450 beinhaltet, besteht aus 8 Intermediaten (Denisov et al. 2005). Im substratfreien Zustand ist das Eisen(III) des Häms sechsfach koordiniert und befindet sich im low-spin Zustand. Dabei sind die äquatorialen Positionen des Eisens mit den vier Stickstoffatomen des Protoporphyrins IX besetzt, während die axialen Positionen vom Cysteinat und einem Wassermolekül eingenommen werden (1). Durch die Bindung eines Substrates im aktiven Zentrum wird das Wassermolekül verdrängt, wodurch ein Übergang zum fünffach koordinierten high-spin Enzym-Substrat-Komplex (2) hervorgerufen wird. Damit geht auch eine Herabsetzung des Redoxpotentials einher, welche

wiederum die Reduktion des Fe(III) zum Fe(II) (3) durch ein Elektron erleichtert. Die Bindung von Sauerstoff führt zu einem Oxy-P450 Komplex (4), der durch Übertragung eines zweiten Elektrons zu einem sehr instabilen Peroxo-Fe(III)-Intermediat reduziert wird (5), welches durch Protonierung in die Hydroperoxo-Fe(III)-Form übergeht (6). Durch eine zweite Protonierung am distalen Sauerstoffatom und anschließende Spaltung der O-O-Bindung entsteht unter Wasserabspaltung ein sehr reaktiver Oxo-Eisen(IV)-Komplex, die sogenannte „compound I“ (7). Dieser hochreaktive Komplex greift schließlich das Substrat an und katalysiert die Insertion des Sauerstoffatoms in das Substrat (8). Das hydroxylierte Produkt dissoziiert vom Cytochrom ab und der Katalysezyklus kann wieder mit dem substratfreien, low-spin Zustand (1) starten. Neben dem vollständigen Durchlaufen des Zyklus von (1) bis (8) können jedoch auch Nebenreaktionen auftreten, die zu einer Rückkehr zu Komplex (2) führen, so dass das hydroxylierte Produkt nicht gebildet werden kann. Diese auch unter physiologischen Bedingungen häufig auftretenden Nebenreaktionen werden als sogenannte „shunt pathways“ bezeichnet. Die am besten untersuchte Reaktion ist der „Peroxid Shunt“, bei der der Hydroperoxo-Fe(III)-Komplex (6) unter Abspaltung von H_2O_2 in die high-spin Enzym-Substrat-Form (2) übergeht. Eine weitere Shunt Reaktion stellt die Autooxidation des Oxy-P450 Komplexes (4) zum Zustand (2) dar. Daneben existiert der „Oxidase Shunt“: Dabei wird Sauerstoff unter Verbrauch von zwei Molekülen NAD(P)H zu Wasser reduziert, so dass der Oxo-Eisen(IV)-Komplex (7) in die high-spin Enzym-Substrat-Form (2) übergeht.

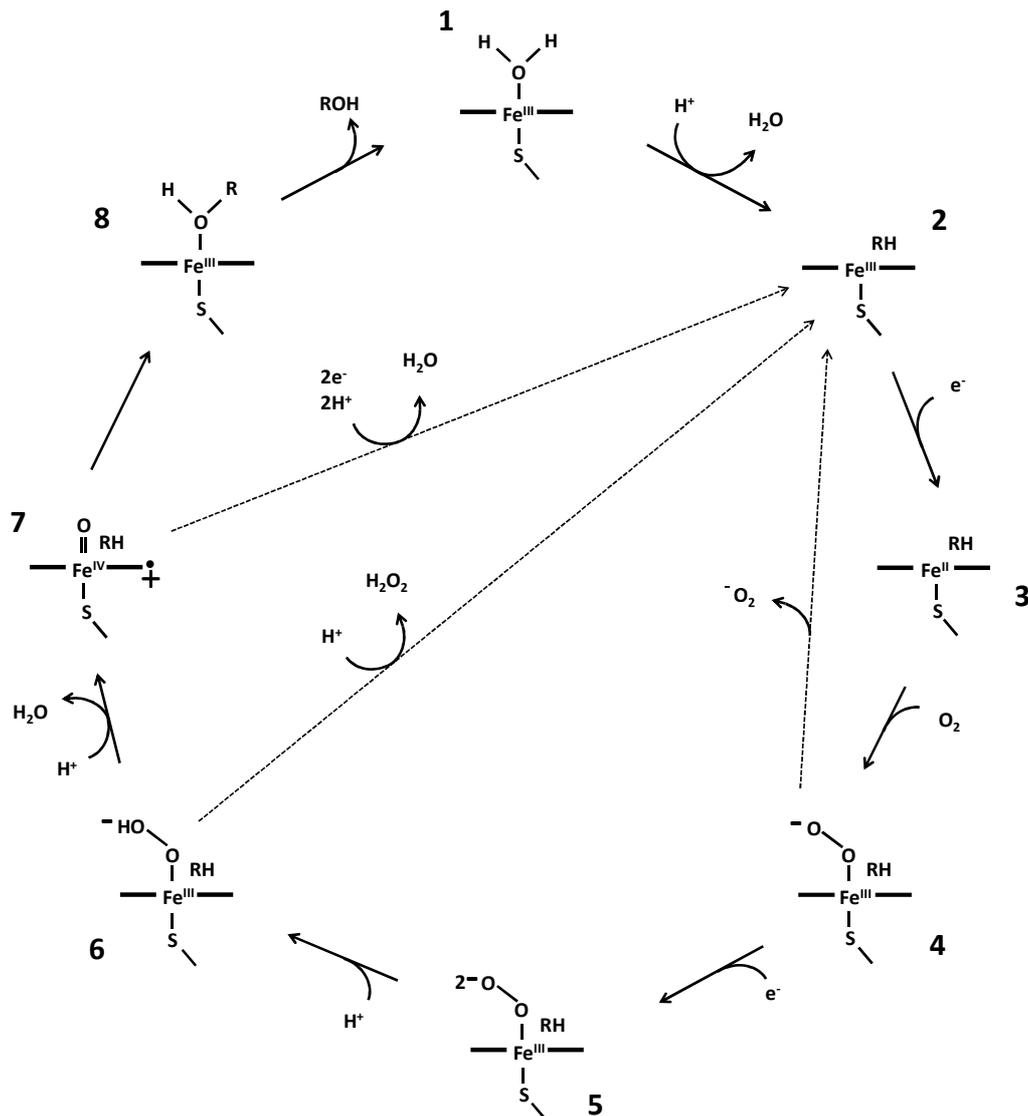


Abb. 1.3: Katalysezyklus der Cytochrome P450, geändert nach (Denisov et al. 2005).

1.1.4. Redoxpartner der Cytochrome P450

Wie bereits erwähnt, sind die Cytochrome P450 für die Ausübung ihrer katalytischen Aktivität auf die Bereitstellung von Elektronen durch einen externen Elektronendonator angewiesen. Die meisten Cytochrome P450 sind jedoch nicht in der Lage, mit dem externen primären Elektronendonator NAD(P)H direkt zu interagieren, sondern ein oder zwei Hilfsproteine sind notwendig, um Elektronen von NAD(P)H auf das Cytochrom P450 zu übertragen. Bezüglich der Proteinkomponenten, die an der Elektronentransfer Reaktion

beteiligt sind, können die Cytochrom P450 Systeme in verschiedene Klassen eingeteilt werden (Hannemann et al. 2007). Eine der beiden Hauptklassen stellt der bakterielle/mitochondriale Typ der Cytochrom P450 Systeme dar (Klasse I), in dem die Elektronen von NAD(P)H durch eine FAD-haltige Ferredoxin Reduktase und ein Ferredoxin auf das Cytochrom P450 übertragen werden (Abb. 1.4 A, B). Im bakteriellen System liegen dabei alle drei Komponenten in löslicher Form vor. Im mitochondrialen System hingegen ist nur das Ferredoxin löslich, während die Ferredoxin Reduktase membranassoziiert und das Cytochrom membrangebunden ist. Bei der Ferredoxin Komponente der Mitochondrien handelt es sich um ein [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin, während in Bakterien daneben auch andere Cluster Typen beschrieben sind: In *Streptomyces griseus* und *Bacillus subtilis* konnten zum Beispiel [3Fe-4S]- und [4Fe-4S]-Cluster Ferredoxine als autologe Redoxpartner der Cytochrome P450 identifiziert werden (Chun et al. 2007; Girhard et al. 2010). Die mikrosomalen P450 Systeme bilden die zweite Hauptklasse (Klasse II) und sind dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Diflavin-Cytochrom P450 Reduktase (CPR) und das Cytochrom P450 selbst enthalten (Abb. 1.4 C). Die CPR besitzt ein FAD und ein FMN als prosthetische Gruppe und ist wie das Cytochrom P450 in der ER-Membran gebunden. Neben diesen beiden Hauptklassen existieren (vorwiegend in Bakterien) weitere Elektronentransfersysteme, die andere Komponenten wie Flavodoxine anstelle von Ferredoxinen besitzen (Abb. 1.4D) oder in denen unterschiedliche Komponenten des Cytochrom P450 Systems miteinander verbunden sind und Fusionsproteine bilden (Hannemann et al. 2007). Die ein Flavodoxin enthaltenden Cytochrom P450 Systeme (Klasse III) ähneln bezüglich des generellen Aufbaus aus drei Komponenten – eine FAD-haltige Reduktase, ein zweites Hilfsprotein und das Cytochrom P450 – stark dem klassischen bakteriellen System der Klasse I. Bei der Klasse I handelt es sich bei dem zweiten Hilfsprotein um ein Eisen-Schwefel-Protein, im Falle der Klasse III um ein FMN-haltiges Flavodoxin. Aus diesem Blickwinkel betrachtet ähneln die Klasse III P450 Systeme hinsichtlich der Redoxzentren mehr dem eukaryotischen mikrosomalen System. Das bekannteste und am besten charakterisierte Cytochrom P450 Fusionsprotein stellt die Fettsäure Hydroxylase CYP102A1 (P450 BM3) aus *B. megaterium* dar. CYP102A1 besteht aus einer P450-Domäne, die mit einer Diflavin-Reduktase-Domäne zu einer Polypeptidkette verknüpft ist und dadurch nicht auf externe Redoxproteine angewiesen, sondern katalytisch autark ist (Boddupalli et al. 1990; Narhi und Fulco 1986). Bei den bakteriellen Cytochrom P450 System treten vorwiegend Flavoproteine und Ferredoxine als Redoxpartner der Cytochrome auf, weshalb diese hier detaillierter betrachtet werden sollen.

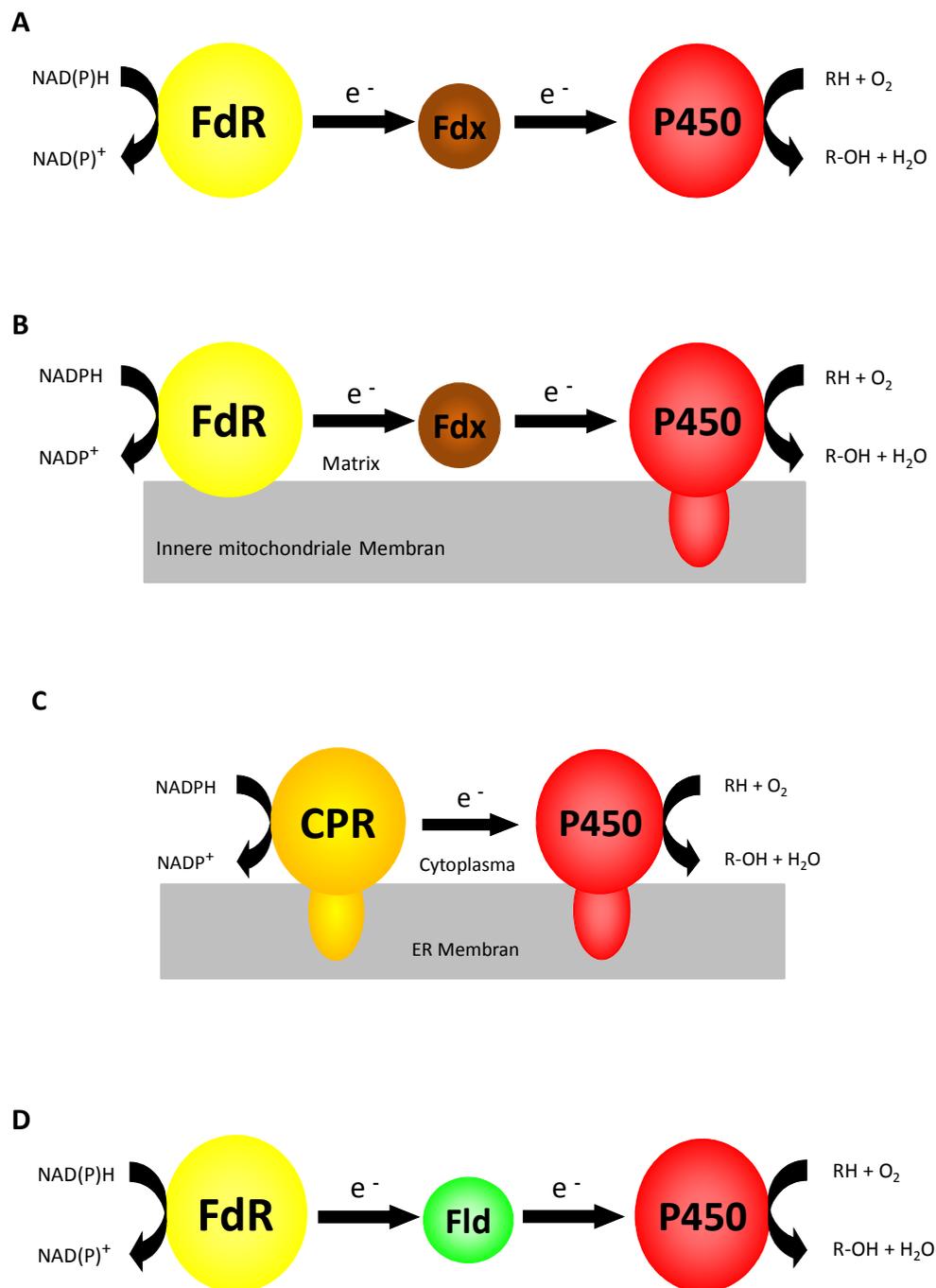


Abb. 1.4: Schematische Darstellung verschiedener Cytochrom P450 Systeme. In Klasse I werden der bakterielle (A) und der mitochondriale Typ (B) der Cytochrom P450 Systeme zusammengefasst. Das mikrosomale System (C) stellt die Klasse II dar. Das bakterielle System, das ein Flavodoxin anstelle eines Ferredoxins enthält, bildet die Klasse III (D). Die Grafik wurde modifiziert nach (Hannemann et al. 2007).

1.1.4.1 Flavoproteine

Flavoproteine sind an vielfältigen biologischen Prozessen beteiligt und kommen ubiquitär in allen Lebensreichen vor. Sie besitzen ein Flavin als prosthetische Gruppe und sind aufgrund des Isoalloxazinrings des Flavins in der Lage, als Ein- und als Zweielektronenüberträger zu fungieren. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass das Flavin wie in Abb. 1.5 dargestellt in drei unterschiedlichen Redoxzuständen vorkommen kann: Die vollständig oxidierte Chinon-Form kann durch Aufnahme eines Elektrons in die Semichinon-Form übergehen, welche durch Aufnahme eines zweiten Elektrons als vollständig reduzierte Hydrochinon-Form vorliegt (Chapman und Reid 1999). Flavoproteine enthalten als prosthetische Gruppe meist ein Flavinmononukleotid (FMN) oder ein Flavinadenindinukleotid (FAD), das durch Übertragung eines AMP-Restes auf FMN entsteht. Flavoproteine können wiederum in vier Klassen unterteilt werden (Massey 1995), von denen die im Zusammenhang mit Cytochrom P450 Systemen relevante Klasse der Elektronentransferasen, speziell die Ferredoxin Reduktasen und die Flavodoxine, hier näher erläutert werden soll.

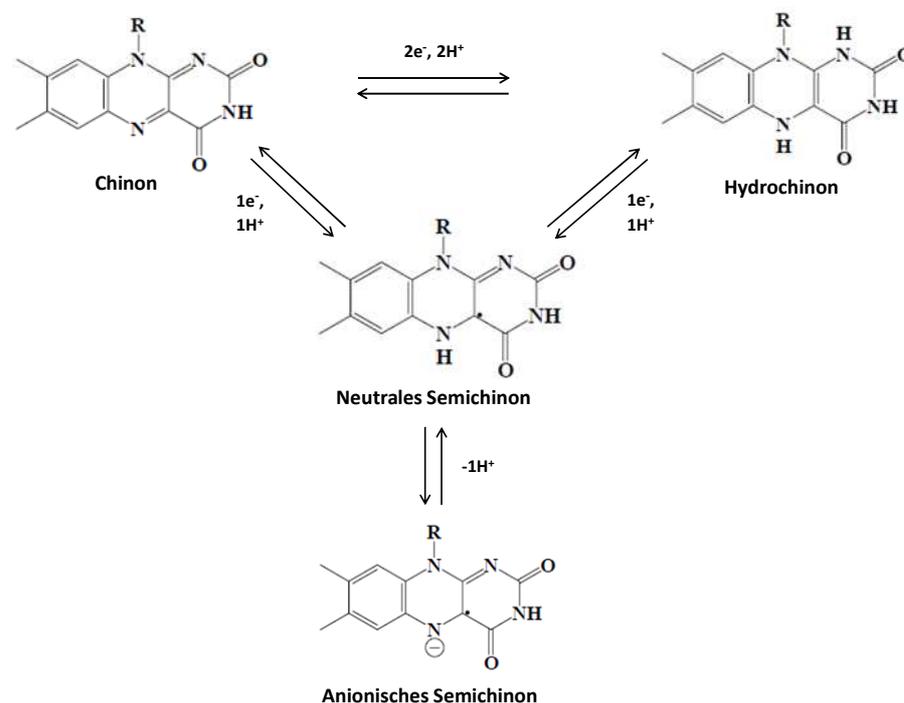


Abb. 1.5: Struktur und Redoxübergänge des Isoalloxazinrings der Flavine. Das Flavin kann in drei unterschiedlichen Redoxzuständen vorkommen: Die vollständig oxidierte Chinon-Form kann durch Aufnahme eines Elektrons in die Semichinon-Form übergehen, welche durch Aufnahme eines zweiten Elektrons als vollständig reduzierte Hydrochinon-Form vorliegt. Daher kann der Isoalloxazinring des Flavins sowohl als Ein- als auch als Zweielektronenüberträger fungieren.

Ferredoxin Reduktasen (FdR) enthalten ein nicht-kovalent gebundenes FAD-Molekül als prosthetische Gruppe und bestehen aus einer Flavin- und einer NAD(P)H-Bindedomäne. Sie sind aufgrund des Isoalloxazinrings in der Lage, Elektronen zwischen dem Zweielektronenüberträger NAD(P)H und dem Einelektronenüberträger Fdx zu vermitteln. Beispiele für solche, an Cytochrom P450 Systemen beteiligte Ferredoxin Reduktasen, stellen die Putidaredoxin Reduktase (PdR) aus *Pseudomonas putida* und die mitochondriale Adrenodoxin Reduktase (AdR) dar (Hannemann et al. 2007).

Flavodoxine sind kleine saure Elektronentransferproteine (14-23 kDa), die ein stark, aber nicht kovalent gebundenes FMN als prosthetische Gruppe enthalten. Sie wurden zuerst in Cyanobakterien (Smillie 1965) und Clostridien (Knight et al. 1966) unter Eisenmangel entdeckt, wo sie die eisenhaltigen Ferredoxine in Reaktionen, die zur Reduktion von N_2 und $NADP^+$ führten, ersetzten (Sancho 2006). Obwohl es sich dabei um ihre am besten charakterisierten physiologischen Aufgaben handelt und diese den Schwerpunkt der Flavodoxin Forschung bilden, sind Flavodoxine auch in viele weitere wichtige Reaktionen involviert (Sancho 2006). So sind zum Beispiel Flavodoxin spezifische Stoffwechselwege in *Escherichia coli* und *Helicobacter pylori* bekannt, wo Flavodoxin ein essentielles, konstitutives Protein darstellt (Freigang et al. 2002; Puan et al. 2005; Zheng et al. 1999). Daneben konnte die Beteiligung eines Flavodoxins an der Nitratreduktion in *Azotobacter vinelandii* (Gangeswaran und Eady 1996) sowie an der Biotinsynthese in *B. subtilis* (Stok und De Voss 2000) nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit Cytochrom P450 Systemen sind zum einen Beispiele bekannt, in denen das Flavodoxin den natürlichen Redoxpartner darstellt; zum anderen können Flavodoxine auch die endogenen Redoxpartner einiger heterolog exprimierter Cytochrome P450 ersetzen (Hannemann et al. 2007).

1.1.4.2 Ferredoxine

Bei Ferredoxinen handelt es sich um kleine, saure Elektronentransferproteine mit Molekulargewichten von 6-24 kDa (Lovenberg 2003), die zu den Eisen-Schwefel-Proteinen gehören. In diesen Proteinen bilden Eisenkationen zusammen mit Sulfidationen (S^{2-}) sogenannte Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S-Cluster), welche wichtige anorganische prosthetische Gruppen darstellen. Man vermutet, dass diese Fe-S-Cluster zu den ältesten Katalysatoren in der Evolution von Biomolekülen gehören (Huber et al. 2003; Wächtershäuser 2007). Es können grundsätzlich einfache und komplexe Fe-S-Proteine

unterschieden werden, wobei erstere ausschließlich einen oder mehrere Fe-S-Cluster als prosthetische Gruppen besitzen. Komplexe Fe-S-Proteine hingegen weisen neben dem Fe-S-Cluster noch weitere prosthetische Gruppen wie zum Beispiel Flavine auf. Fe-S-Cluster kommen in allen biologischen Reichen vor und fungieren als Kofaktoren vieler Proteine, die an verschiedensten biochemischen Prozessen beteiligt sind. So üben Fe-S-Proteine zum Beispiel wichtige Funktionen beim Elektronentransfer (Photosynthese, Zellatmung, Stickstofffixierung), bei der Regulation der Genexpression oder bei der Bindung von Substraten aus (Lill und Mühlhoff 2008). Außerdem können sie als Sensoren von Umweltreizen sowie als Stabilisatoren von Proteinstrukturen dienen (Beinert 2000; Lill et al. 1999; Lill und Mühlhoff 2008). Es sind verschiedene Fe-S-Cluster Typen bekannt: Der einfachste Typ besteht aus einem einzigen Eisenion, das tetraedrisch mit den Sulfhydrylgruppen von vier Cysteinresten des Proteins verknüpft ist. Solche Fe-S-Proteine werden Rubredoxine genannt (Abb. 1.6A). Die rhombischen [2Fe-2S]-Cluster bestehen aus zwei Eisenionen, zwei anorganischen Sulfidgruppen und vier Cysteinresten (Abb. 1.6B). Die kubischen [4Fe-4S]-Cluster enthalten entsprechend vier Eisenionen, vier anorganische Sulfidgruppen und vier ligandierende Cysteinreste (Abb. 1.6C). HiPIPs (High Potential Iron Proteins) besitzen ebenfalls einen [4Fe-4S]-Cluster, unterscheiden sich von den übrigen [4Fe-4S]-Proteinen jedoch durch ihr höheres Redoxpotential (Beinert 2000; Lill et al. 1999; Lill und Mühlhoff 2008). Des Weiteren existieren [3Fe-4S]-Cluster, die wahrscheinlich während der Fe-S-Cluster Synthese durch Verlust eines Eisenions aus [4Fe-4S]-Clustern entstanden (Lill und Mühlhoff 2008).

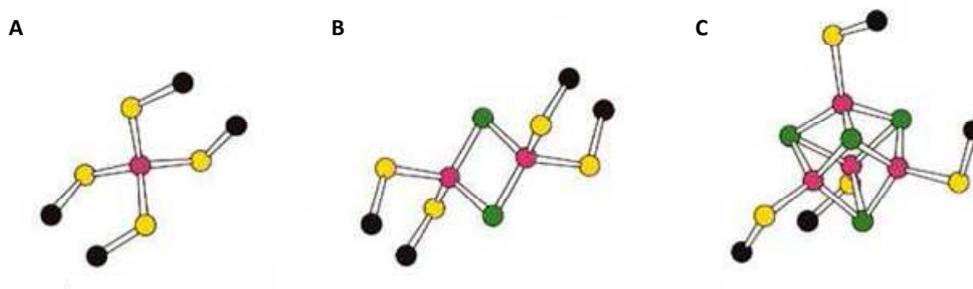


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der wichtigsten Typen von Eisen-Schwefel-Clustern, welche aus Eisenionen (rot), anorganischen Sulfidgruppen (grün) und Cysteinresten (gelb) zusammengesetzt sind. (A) zeigt ein Rubredoxin, den einfachsten Typ eines Fe-S-Clusters, bestehend aus einem einzigen Eisenion, das tetraedrisch mit den Sulfhydrylgruppen von vier Cysteinresten des Proteins verknüpft ist. Die rhombischen [2Fe-2S]-Cluster bestehen aus zwei Eisenionen, zwei anorganischen Sulfidgruppen und vier Cysteinresten (B). Die in (C) dargestellten kubischen [4Fe-4S]-Cluster enthalten vier Eisenionen, vier anorganische Sulfidgruppen und vier ligandierende Cysteinreste. Grafik entnommen aus (Berg 2003).

In Cytochrom P450 Systemen wurden bisher sowohl [2Fe–2S]- als auch Nicht-[2Fe–2S]-Cluster Ferredoxine als Redoxpartner für Cytochrome P450 identifiziert (Ewen et al. 2009; Hannemann et al. 2007), wobei die Nicht-[2Fe–2S]-Cluster Ferredoxine weiter in [3Fe–4S]- und [4Fe–4S]-Cluster Ferredoxine sowie Dicluster Ferredoxine bestehend aus einem [3Fe–4S]- und einem [4Fe–4S]-Cluster oder zwei [4Fe–4S]-Clustern unterteilt werden können.

1.1.5. Substrate der Cytochrome P450

Wie bereits erwähnt, beruht das große biotechnologische Potential der Cytochrome P450 unter anderem auf ihrer Fähigkeit, eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen als Substrate zu akzeptieren (Bernhardt 2006). Diese Substrate schließen die große Klasse der Terpene und Terpenoide ein, die auch in dieser Arbeit vorwiegend als Substrate der Cytochrome P450 untersucht wurden und deshalb hier näher betrachtet werden sollen. Terpene unterscheiden sich von den nur aus Kohlenwasserstoffen bestehenden Terpenen durch zusätzliche funktionelle Gruppen. Zwischen diesen beiden Begriffen wird jedoch oft nicht unterschieden, so dass diese meist synonym zueinander eingesetzt werden. Die auch als Isoprenoide bezeichneten Terpene stellen eine strukturell heterogene Gruppe von Naturstoffen dar, die vorwiegend aus Pflanzen, aber auch aus Tieren und Bakterien isoliert werden konnten (Withers und Keasling 2007). Alle Terpene bestehen aus Isopreneinheiten und besitzen die Summenformeln $(C_5H_8)_n$, wobei n die Anzahl der verknüpften Isopreneinheiten darstellt. Je nach Anzahl der Isopreneinheiten werden Hemi- (C_5), Mono- (C_{10}), Sesqui- (C_{15}), Di- (C_{20}), Sester- (C_{25}), Tri- (C_{30}), Tetra- (C_{40}), und Polyterpene ($(C_5)_n$ mit $n > 8$) unterschieden (Breitmaier 2005). Von den tetracyclischen Triterpenen stammen auch die Steroide ab, die wiederum in Cholestane (C_{27}), Pregnane (C_{21}), Androstane (C_{19}), Estrane (C_{18}) und die Gallsäuren (C_{24}) unterteilt werden können. Terpene besitzen umfangreiche biologische Aufgaben und erfüllen eine Reihe wichtiger physiologischer und sozialer Funktionen (Roberts 2007). Daher wurden sie in der Produktion von Geschmacksstoffen, Duftstoffen, Kosmetika, Farbstoffen und Arzneimitteln oder als Bausteine in der organischen Chemie eingesetzt (de Carvalho und da Fonseca 2006; Harada und Misawa 2012). So wird das Sesquiterpen Artemisinin als Antimalariamittel (White 2008) und das Triterpen Glycyrrhetin als Süßstoff und wegen seiner antiinflammatorischen und hepatoprotektiven Eigenschaften als Arzneimittel eingesetzt (Asl und Hosseinzadeh 2008). Das Diterpen Taxol (Paclitaxel) und

das Sesquiterpen Parthenolid besitzen tumorhemmende Eigenschaften (Goldspiel 1997; Harada und Misawa 2012), während für die Triterpensäure Betulinsäure eine Wirksamkeit gegen HIV nachgewiesen werden konnte (Asres et al. 2005). Viele Terpene kommen in der Natur aber nur in geringen Mengen vor oder liefern bei der Isolierung aus den natürlichen Quellen nur eine niedrige Ausbeute. Da vor allem oxidierte Terpene wertvolle und begehrte Substanzen darstellen, besteht ein großes industrielles Interesse an neuen, biologisch aktiven Terpenen mit einem höheren Marktwert. Die chemische Synthese und die selektive Funktionalisierung solcher Substanzen stellt wegen geringer Spezifitäten und der Notwendigkeit gefährlicher und teurer Katalysatoren und Reagenzien eine Herausforderung dar (Harada und Misawa 2012). Eine Alternative bildet die Biosynthese solcher Isoprenoide mithilfe gentechnisch veränderter heterologer Wirtsorganismen, wobei der Großteil solcher Biotransformationen mit Ganzzellsystemen durchgeführt wurde, die Cytochrome P450 exprimierten. In diesem Kontext ist der Einsatz von Cytochromen P450 besonders vielversprechend, da bereits gezeigt werden konnte, dass diese Enzyme mit einer hohen Aktivität selektive Oxidierungen von Terpenen durchführen können (Hawkes et al. 2002).

1.1.6. Biotechnologische Anwendung der Cytochrome P450

Im Bereich der Biokatalyse sind isolierte Cytochrome P450 für industrielle Anwendungen im Großmaßstab nicht geeignet, da sie unter Prozessbedingungen nicht stabil sind, oft geringe Aktivitäten besitzen, aus mehreren Komponenten bestehen und teure Kofaktoren in stöchiometrischen Mengen benötigen (Chefson und Auclair 2006). Aufgrund dieser Limitationen ist die praktische Anwendung von Cytochromen P450 momentan meist noch auf die Produktion von Feinchemikalien wie Pharmazeutika, Geschmacks- und Geruchsstoffe begrenzt (Sakaki 2012). Daneben gibt es jedoch auch wenige Beispiele für einen erfolgreichen Einsatz der P450 im industriellen Großmaßstab unter Verwendung von Ganzzellsystemen: Dabei handelt es sich etwa um die Synthese des HMG-CoA-Reduktasehemmers Pravastatin durch 6 β -Hydroxylierung von Compactin (Watanabe et al. 1995), die Herstellung von Dicarbonsäuren aus Fettsäuren und Alkanen (Kelly und Kelly 2013) und die Produktion von Corticosteroiden wie Cortisol und Pregnenolon (Duport et al. 1998; Szczebara et al. 2003). In den letzten Jahrzehnten wurden jedoch auch bedeutende Fortschritte darin erzielt, die noch vorhandenen Limitierungen zu verringern und so die

Anwendung der Cytochrome P450 auszuweiten. Einen Schwerpunkt bildete dabei die Verbesserung der Enzymeigenschaften durch Mutagenesen wie ortsgerichtete Mutagenese oder molekulare Evolution, wodurch die Aktivität, Substratspezifität, Stabilität und die Lösemitteltoleranz der Cytochrome erhöht werden konnten (O'Reilly et al. 2011). Auch durch die Anwendung von Ganzzell Biokatalysatoren können einige dieser Limitierungen beseitigt werden, wobei intakte mikrobielle Zellen, die Cytochrome P450 unter physiologischen Bedingungen exprimieren, oft die Biokatalysatoren der Wahl sind (Urlacher und Girhard 2012). Ein Vorteil der Ganzzellsysteme liegt in der simultanen Regeneration des Kofaktors NAD(P)H im zellulären Metabolismus und dem Vorhandensein von Elektronentransferproteinen, so dass zum Teil auf eine zusätzliche Koexpression von Redoxproteinen verzichtet werden kann (Kelly und Kelly 2013). Zudem sind die Komponenten des P450 Systems im zellulären Milieu wesentlich stabiler als gereinigte Proteine *in vitro* und das durch Entkopplungsreaktionen entstandene H₂O₂ wird durch die zelluläre Katalase unschädlich gemacht (Sakaki 2012). Dennoch müssen bei Ganzzellsystemen auch Faktoren wie die Substrataufnahme, der Produkttransport, die Toxizität von Substraten und Produkten, die unzureichende Versorgung mit NADPH, die Physiologie des Wirtes und die Stabilität des Stammes berücksichtigt werden (van Beilen et al. 2003).

Für die oft sehr hydrophoben Substrate der Cytochrome P450 stellt die äußere Zellmembran der Mikroorganismen eine effiziente Barriere dar. Zudem sind diese Substanzen aufgrund ihrer Hydrophobizität im wässrigen Milieu, in dem die Kultivierung der Ganzzellsysteme stattfindet, nur schlecht löslich, wodurch die Substrate nicht in die Zellen gelangen und folglich nicht umgesetzt werden können. Diesen Einschränkungen wurde zum Beispiel durch wässrig-organische Zweiphasensysteme begegnet, in denen die organische Phase als Substratreservoir dient und die Produktextraktion erleichtert und die wässrige Phase den Biokatalysator vor der Degradation schützt (Urlacher und Girhard 2012). Des Weiteren können dadurch die Produktausbeuten erhöht und gleichzeitig toxische Effekte verringert werden (Julsing et al. 2012). Weitere Möglichkeiten stellen Substanzen wie Cyclodextrine oder organische Lösemittel wie Ethanol, Methanol und DMSO dar, welche die Membranpermeabilität und die Substratlöslichkeit erhöhen. Daneben können diese Ziele auch durch oberflächenaktive Substanzen wie Rhamnolipide, Triton X, Tween oder Saponine bzw. chelatierende Substanzen wie EDTA erreicht werden (Julsing et al. 2012). Aufgrund ihrer Relevanz für diese Arbeit soll hier kurz auf die Cyclodextrine und die Saponine eingegangen werden.

Cyclodextrine entstehen durch den enzymatischen Abbau von Stärke und bestehen aus zyklisch angeordneten α -1,4-glykosidisch-verknüpften Glukoseeinheiten. Je nach der Anzahl der Glukoseeinheiten unterscheidet man zwischen α -, β - und γ -Cyclodextrinen, die sechs, sieben bzw. acht Glukoseeinheiten enthalten. Durch chemische Modifikationen dieser Basis-Cyclodextrine sind weitere Derivate entstanden, die veränderte Eigenschaften wie zum Beispiel eine verbesserte Löslichkeit und Stabilität aufweisen (Eastburn und Tao 1994). Die Glukoseeinheiten ordnen sich dabei derart an, dass sich eine konusförmige Gesamtstruktur des Cyclodextrins ergibt. Durch die Stellung der Hydroxylgruppen entsteht im Innern ein hydrophober Hohlraum, der von einer hydrophilen Außenfläche umgeben ist (Singh et al. 2002). Dadurch können Cyclodextrine Komplexe mit vielen wasserunlöslichen Substanzen bilden und diese so solubilisieren. Cyclodextrine erfahren mittlerweile eine breite Anwendung und werden beispielsweise in der Nahrungsmittel-, Pharma-, Kosmetik- Verpackungs- und Textilindustrie sowie im Umweltschutz eingesetzt (Singh et al. 2002).

Saponine sind in Pflanzen vorkommende oberflächenaktive Glykoside, die sich durch ihre oberflächenaktiven Eigenschaften von anderen Glykosiden unterscheiden (Sparg et al. 2004). Sie bestehen aus einem steroidal oder triterpenoiden Grundgerüst, das als Sapogenin oder Aglykon bezeichnet wird (Challinor und De Voss 2013) und glykosidisch mit Zuckerresten verknüpft ist. Ihre Funktion in den Pflanzen selbst ist bisher noch nicht komplett verstanden, es liegen jedoch Hinweise vor, dass sie zur Abwehr gegen Bakterien und Insekten oder als Monosaccharid Quelle dienen können (Francis et al. 2002). Für pflanzliche Saponine wurde daneben eine Vielzahl biologischer Aktivitäten wie cytotoxische, antiinflammatorische, hämolytische, fungizide und antibakterielle Eigenschaften nachgewiesen (Sparg et al. 2004). Saponine sind in der Lage, über ihre hydrophoben Anteile mit hydrophoben Bestandteilen eukaryotischer und prokaryotischer Biomembrane zu interagieren und dadurch eine Porenbildung herbeizuführen (Armah et al. 1999). Durch diese Poren kann der unselektive Durchtritt niedermolekularer Substanzen in das Zellinnere erleichtert werden. Dieser Effekt kann im Kontext von Cytochrom P450 Biokatalysatoren dazu ausgenutzt werden, die Aufnahme hydrophober Substrate in das Cytosol und damit den Substratumsatz zu verbessern. Bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Quillaja-Saponin aus dem Seifenrindenbaum (*Quillaja saponaria*) handelt es sich um eine heterogene Mischung verschiedener Aglykon- und Zuckerreste, in der die triterpenoide Quillajasäure das Haupt-Aglykon darstellt.

1.1.7. Mikrobielle Cytochrome P450

Während Cytochrome P450 in fast allen Eukaryoten vorkommen, besitzen Archaeen und Bakterien oft keine P450. Die wenigen Cytochrome P450 enthaltenden Organismen sind dabei jedoch als Produzenten von Naturstoffen äußerst interessant (Kelly und Kelly 2013). In den ersten Jahren nach ihrer Entdeckung wurde die Cytochrom P450 Forschung zunächst von Studien zu Säuger P450 dominiert. In den 1960er Jahren richtete sich der Fokus jedoch zunehmend auch auf mikrobielle Cytochrome, nachdem CYPs in Hefen entdeckt wurden (Lindenmayer und Smith 1964) und mit CYP101A1 (P450_{CAM}) aus *Pseudomonas putida* das erste bakterielle Cytochrom P450 (Appleby 1967) identifiziert werden konnte. Seitdem nahm die Zahl der identifizierten mikrobiellen P450 stetig zu, was auch an den mehr als 1000 verschiedenen bakteriellen Cytochrom P450 Familien deutlich wird, denen zum Beispiel 50 in Tieren gegenüberstehen (Kelly und Kelly 2013). Die Biodiversität der mikrobiellen P450 geht dabei meist mit der Nutzung verschiedener Kohlenstoff Quellen zum Wachstum einher, worauf auch einige biotechnologische Anwendungen wie das Cytochrom P450 katalysierte Wachstum auf dem explosiven RDX (Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin) mit nachfolgender Phytoremediation (Rylott et al. 2006) und das Wachstum von *Candida tropicalis* auf Öl (Lebeault et al. 1971) basierten. Darauf folgten biotechnologische Anwendungen, die CYPs mit einbezogen: Der Einsatz von Fadenpilzen zur Produktion von Corticosteroiden durch Ausnutzung ihrer Cytochrom P450 katalysierten Fähigkeit der, chemisch schwierig zu erreichenden, 11-Hydroxylierung von Steroiden ermöglichte die erste industrielle Biotransformation (Smith et al. 1993). Wie schon in Abschnitt 1.1.4 aufgeführt, können auch mikrobielle Cytochrome P450 in Abhängigkeit der benötigten Redoxproteine in verschiedene Klassen eingeteilt werden (Hannemann et al. 2007), die einen entscheidenden Einfluss auf biotechnologische Anwendungen ausüben können. Die einzelnen Komponenten der meisten bakteriellen Cytochrome sind löslich und deshalb im Gegensatz zu dem Großteil der meist membrangebundenen eukaryotischen Cytochrome P450 einfach zu reinigen und zu handhaben (Virus et al. 2006). Zudem zeichnen sich bakterielle CYPs in der Regel durch eine höhere Stabilität und Selektivität sowie höhere Aktivitäten und Expressionsraten als die eukaryotischen Systeme aus. Diese Vorteile trugen entscheidend dazu bei, dass mikrobielle Cytochrome P450 heute in so verschiedenen Bereichen wie der Nahrungsmittelsicherheit, der industriellen Biotechnologie, der Umwelt und der menschlichen Gesundheit eine Anwendung finden (Kelly und Kelly 2013). Dies wurde dadurch erreicht, dass mikrobielle Cytochrome P450 zum Beispiel in der Lage sind, Lignin zu degradieren, menschliche

Arzneimittelmetabolite zu bilden, sowie Antibiotika, Antikrebsmittel und Pathogen-Inhibitoren herzustellen (Kelly und Kelly 2013).

1.2. *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium (*B. megaterium*) ist ein Gram-positives, Sporen bildendes, hauptsächlich aerobes Bakterium mit einem GC-Gehalt von etwa 39%. Es weist mit einem Zelldurchmesser von mehr als 1 μm und mit 60 μm^3 ein mehr als 100-mal höheres Volumen als *E. coli* auf (Abb. 1.7), weshalb es auch als „big beast“ bezeichnet wird. Es wurde erstmals 1884 beschrieben (De Bary 1884) und aufgrund der Größe der vegetativen Zellen und Sporen als Modellorganismus für morphologische Untersuchungen und für Studien zur Zellwand Biosynthese und Sporulation eingesetzt (Vary 1992). In den 1960ern war *B. megaterium* vor *B. subtilis* der Modellorganismus der Wahl für weitreichende Studien zur Biochemie, Sporulation und zu Bakteriophagen von Gram-positiven Bakterien (Bunk et al. 2010). Seine Fähigkeit, auf verschiedenen Kohlenstoffquellen zu wachsen, macht diesen Organismus zudem zu einem idealen industriellen Produktionswirt (Vary 2007), welcher bisher vorwiegend für die Proteinproduktion eingesetzt wurde. Zu den von *B. megaterium* hergestellten Produkten gehören industrielle Enzyme wie Penicillin Acyclase, verschiedene Amylasen, Vitamine sowie diagnostische und therapeutische Proteine (David et al. 2011; Vary 2007). Daneben gibt es weitere Gründe für das biotechnologische und industrielle Interesse an *B. megaterium*: Es ist nicht pathogen, es hält Plasmide in der Zelle stabil und produziert keine alkalischen Proteasen, so dass es idealerweise dazu geeignet ist, homologe und heterologe Proteine zu produzieren (Malten 2005; Meinhardt F 1989; Richhardt et al. 2010; Sussman 1988). Da *B. megaterium* keine Endotoxine besitzt, kann dieser Organismus sogar in der Nahrungsmittel- und pharmazeutischen Industrie eingesetzt werden (Vary 2007). Die Genetik von *B. megaterium* ist sehr stark entwickelt und etabliert worden, so dass viele Techniken und Methoden zur Verfügung stehen, um diesen Mikroorganismus genetisch zu manipulieren: Vektor Systeme für eine induzierbare starke Expression sind für eine rekombinante Genexpression entwickelt und optimiert worden (Biedendieck et al. 2007; Malten 2005). Mittlerweile sind auch Methoden zugänglich, um *B. megaterium* effizient zu

transformieren (Vary 2007) und um einen direkten genetischen Knock-out durch Transkonjugation durchzuführen (Richhardt et al. 2010). Zudem sind Mutanten hergestellt worden, um eine breitere industrielle Anwendung zu erleichtern (Richhardt et al. 2010). Die hohe biotechnologische Relevanz von *B. megaterium* förderte die Analyse metabolischer und regulatorischer Netzwerke, so dass heutzutage eine Vielzahl systembiologischer Werkzeuge zur Verfügung steht, um zelluläre Bestandteile auf der Ebene des Transkriptoms, Proteoms, Metaboloms oder Fluxoms aufzuklären (Korneli et al. 2013). Um das Potential von *B. megaterium* vollständig auszuschöpfen, wurden kürzlich die Genome der *B. megaterium* Stämme QM B1551 und DSM319 sequenziert (Eppinger et al. 2011), da die Verfügbarkeit der gesamten Genomsequenz eines Bakteriums die Untersuchung dieses Organismus erheblich erleichtert. Beide Stämme besitzen ein 5,1 Mbp großes Genom, das etwa 5300 Gene enthält, wobei der Stamm QM B1551 im Gegensatz zu dem plasmidlosen Stamm DSM319 zusätzlich sieben Plasmide mit insgesamt 523 Genen aufweist (Eppinger et al. 2011).

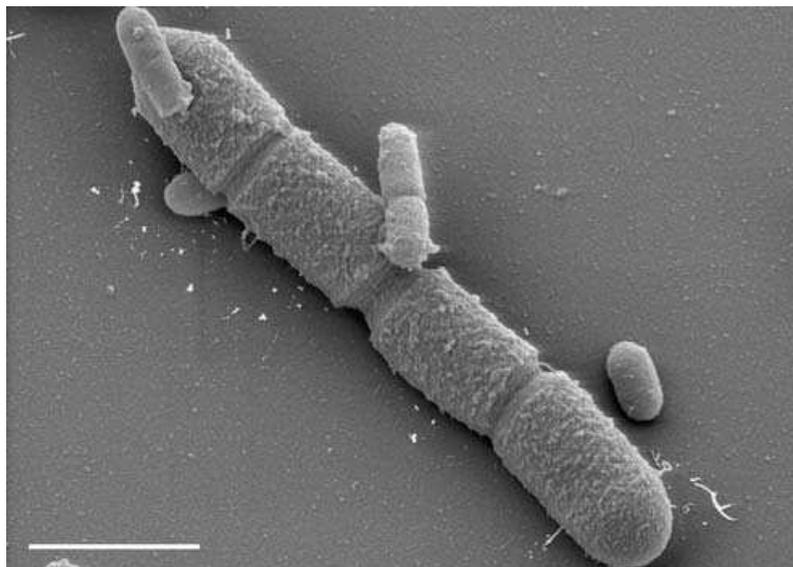


Abb. 1.7: Elektronenmikroskopisches Bild von vegetativen *B. megaterium* und *E. coli* Zellen. *B. megaterium* Zellen weisen mit einem Volumen von $60 \mu\text{m}^3$ ein mehr als 100-mal höheres Volumen auf als *E. coli* (Volumen von $0,5 \mu\text{m}^3$). Grafik entnommen aus (Vary 2007).

1.3. Cytochrome P450 aus *Bacillus megaterium*

Zu den interessantesten, in *B. megaterium* vorhandenen Proteinen gehören Cytochrome P450 (He und Fulco 1991). Das Cytochrom P450 CYP102A1 (P450 BM3) aus *B. megaterium* ist das bisher am besten untersuchte bakterielle Cytochrom P450, welches für die Oxidation einer Vielzahl biotechnologisch interessanter Substanzen eingesetzt wurde (zum Überblick siehe (Whitehouse et al. 2012)). Das Cytochrom P450 CYP106A1 (P450 BM1) aus *B. megaterium* ATCC 14581 (He et al. 1989) wurde bisher vorwiegend auf der Ebene der Genregulation und Genexpression untersucht (He et al. 1995; Shaw et al. 2000). Auch das Cytochrom P450 BM2 wurde in *B. megaterium* ATCC 14581 identifiziert, konnte aber nie in intakter Form kloniert werden, so dass es schlecht charakterisiert blieb (Fulco 1991). CYP106A2 aus *B. megaterium* ATCC 13368 (Berg et al. 1976; Berg et al. 1979) wurde hingegen schon sehr gut untersucht und charakterisiert. So konnte gezeigt werden, dass dieses Cytochrom in der Lage ist, einige biotechnologisch relevante Steroide wie Progesteron, 11-Desoxycortisol und Testosteron (Nguyen et al. 2012; Virus et al. 2006; Zehentgruber et al. 2010) sowie Terpene wie Abietinsäure, 11-Keto- β -Boswelliasäure und Dipterocarpol umzusetzen (Bleif et al. 2011; Bleif et al. 2012; Schmitz et al. 2012). Das Genom des *B. megaterium* Stammes ATCC 13368 wurde jedoch bisher nicht sequenziert. Zudem konnten die homologen Redoxpartner von CYP106A2 zwar gereinigt (Berg et al. 1976; Berg et al. 1979), allerdings nie kloniert werden. Bei CYP102A1 aus *B. megaterium* handelt es sich um ein autarkes P450, bei dem die Redoxpartner an das Cytochrom fusioniert vorliegen (Whitehouse et al. 2012), wodurch sich auch die hohe katalytische Aktivität dieses Cytochroms erklären lässt. Durch diese Fusion ist CYP102A1 unabhängig von Redoxproteinen, so dass sich die Suche nach effizienten Redoxpartnern für dieses Cytochrom erübrigte. Auch für die Cytochrome P450 BM1 und P450 BM2 aus verschiedenen *B. megaterium* Stämmen wie zum Beispiel *B. megaterium* ATCC 14581 konnten bisher keine Elektronentransferproteine identifiziert werden (Fulco 1991). Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind demnach keine natürlichen Redoxpartner von Cytochromen P450 aus *B. megaterium* kloniert worden. Das Vorliegen der Sequenzinformationen der *B. megaterium* Stämme QM B1551 und DSM319 (Eppinger et al. 2011) bot somit die Möglichkeit, sowohl Cytochrome P450 als auch deren potentielle natürliche Redoxpartner zu identifizieren.

1.4. Aufgabenstellung

Cytochrome P450 sind durch ihre einmalige Fähigkeit, die regio- und stereospezifische Oxidation einer Vielzahl an Substraten zu katalysieren, gekennzeichnet. Diese einzigartigen katalytischen Fähigkeiten gehen mit ihrer Beteiligung an diversen physiologischen Funktionen sowie an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten einher und bilden die Grundlage des biotechnologischen Interesses an Cytochromen P450. Dies wird auch an der stetig steigenden Zahl an Sequenzierprojekten und damit an neu identifizierten Cytochrom P450 Genen deutlich, wobei eine Vielzahl dieser neu identifizierten Cytochrome aus Mikroorganismen stammt. So wurde kürzlich das Genom des *B. megaterium* Stammes DSM319 sequenziert, der – wie schon eine Vielzahl bekannter *B. megaterium* Stämme zuvor – eine vielversprechende Quelle für neue Cytochrome P450 mit veränderten Substratspektren, Selektivitäten und Aktivitäten darstellt.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Cytochrom P450 Systemen aus *Bacillus megaterium* DSM319, dessen Genom kürzlich sequenziert wurde. Dieser Stamm besitzt mindestens drei Cytochrome P450 mit hohen Ähnlichkeiten zu den schon bekannten CYP106 und CYP109 Familien. Diese Cytochrome P450 sind in der Lage, pharmazeutisch wichtige Steroide zu hydroxylieren und biotechnologisch interessante Fettsäuren und Terpene herzustellen. In der vorliegenden Arbeit sollten in *B. megaterium* DSM319 zuerst die Gene, die für Cytochrome P450 kodieren, mittels bioinformatischer Methoden analysiert werden. In einem nächsten Schritt sollten diese kloniert, in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Da Cytochrome P450 zur Ausübung ihrer katalytischen Aktivität auf Elektronentransferproteine angewiesen sind, sollten funktionelle Redoxpartner aus *B. megaterium* selbst oder aus einem anderen Organismus identifiziert werden.

Nach der Etablierung eines geeigneten Redoxsystems sollten Substrate für die *B. megaterium* Cytochrome gefunden werden, wobei diese Suche nach Substraten mögliche physiologische Substrate sowie Substanzen, deren Produkte pharmazeutisch oder biotechnologisch interessant sind, einschließen sollte. Vorzugsweise sollten verschiedene Terpene, Steroide und andere natürliche Substanzen als potentielle Substrate gescreent werden. Hinweise auf mögliche Substrate sollten dabei zunächst anhand der Induktion eines Typ I-Shifts, welcher die Bindung einer Substanz an das Cytochrom anzeigt, erhalten werden. Da es sich bei der Bindung einer Substanz an ein Cytochrom P450 um eine zwingende, jedoch nicht ausreichende Voraussetzung für eine Substratumsetzung handelt, sollte der Nachweis des

Substratumsatzes mit Hilfe eines *in vitro* Rekonstitutionsassays und anschließender Analytik der Produktbildung mittels HPLC erfolgen.

Nach der erfolgreichen Identifizierung von Substraten sollten die Strukturen der Produkte der Cytochrom P450 abhängigen Substratumsetzung mittels NMR bestimmt werden, wofür jedoch Produktmengen im mg-Bereich benötigt werden. Da diese geforderten Produktmengen *in vitro* aus Zeit- und Kostengründen nicht erzielt werden können, sollten rekombinante Ganzzell Biokatalysatoren basierend auf *B. megaterium* MS941 konstruiert und charakterisiert werden. Zudem sollten durch Analyse der Genexpression der Cytochrome und der Redoxpartner mittels quantitativer real-time Reverse Transkriptase PCR Einblicke in die natürlichen Funktionen und die physiologische Bedeutung der Cytochrom P450 Systeme in *Bacillus megaterium* selbst gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

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

2.1.1. Bakterienstämme

Tab 2.1: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme von *E. coli* und *Bacillus megaterium* (*B. megaterium*)

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> Top10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen
<i>E. coli</i> C43(DE3)	abgeleitet von <i>E. coli</i> BL21(DE3): <i>E. coli</i> B F ⁻ dcm ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) gal λ (DE3) plus eine uncharakterisierte Mutation plus Selektion für die Resistenz gegenüber verschiedenen toxischen Proteinen	<i>Lucigen OverExpress</i> TM <i>Competent Cells 41(DE3)</i> , <i>C41(DE3)pLysS</i> and <i>C43(DE3), C43(DE3)pLysS</i> <i>Instruction Manual</i>
<i>Bacillus megaterium</i> MS941	Mutante von <i>Bacillus megaterium</i> DSM319, Δ nprM	(Wittchen und Meinhardt 1995)

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

2.1.2. Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Nukleotidsequenz sowie der Verwendungszweck der einzelnen Oligonukleotide sind dem Anhang zu entnehmen.

2.1.3. Vektoren

In dieser Arbeit wurden für das Arbeiten mit *E. coli* der Klonierungsvektor pCR4®Blunt-TOPO® (Invitrogen) und die Expressionsvektoren pTrc99A, pET17b und pET3d (Novagen) verwendet. Für die Expression in *B. megaterium* wurde der Vektor pSMF2.1 (Bleif et al. 2012) eingesetzt. Die Vektorkarten der erstellten Expressionsplasmide sind dem Anhang zu entnehmen.

Tab 2.2: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Klonierungs- und Expressionsvektoren

Vektor	Beschreibung	Referenz
pCR4®Blunt-TOPO®	Klonierungsvektor, Zero Blunt® Topo® PCR cloning Kit, Ap ^R	Invitrogen (2012)
pSMF2.1	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor, Ap ^R , Tc ^R	(Bleif et al. 2012)
pET17b-CYP106A1	pET17b (Ap ^R) mit CYP106A1 (<i>NdeI/HindIII</i>) und C-terminalem His-Tag	Diese Arbeit
pET17b-CYP109E1	pET17b (Ap ^R) mit CYP109E1 (<i>NdeI/KpnI</i>) und C-terminalem His-Tag	Diese Arbeit
pET17b-CYP109A2	pET17b (Ap ^R) mit CYP109A2 (<i>NdeI/KpnI</i>) und C-terminalem His-Tag	Diese Arbeit
pET3d-Fld	pET3d (Ap ^R) mit Fld (<i>NcoI/BamHI</i>) und C-terminalem His-Tag	Diese Arbeit
pET17b-Fdx1	pET17b (Ap ^R) mit Fdx1 (<i>NdeI/KpnI</i>) und C-terminalem His-Tag	Diese Arbeit
pET17b-Fdx2	pET17b (Ap ^R) mit Fdx2 (<i>NdeI/HindIII</i>) und C-terminalem His-Tag	Diese Arbeit
pET17b-Fdx3	pET17b (Ap ^R) mit Fdx3 (<i>NdeI/HindIII</i>) und C-terminalem His-Tag	Diese Arbeit
pET17b-Fdx4	pET17b (Ap ^R) mit Fdx4 (<i>NdeI/HindIII</i>) und C-terminalem His-Tag	Diese Arbeit
pET17b-FdR1	pET17b (Ap ^R) mit FdR1 (<i>NdeI/KpnI</i>) und C-terminalem His-Tag	Diese Arbeit

pET3d-FdR2	pET3d (Ap ^R) mit FdR2 (<i>NcoI/BamHI</i>) und C-terminalem His-Tag	Diese Arbeit
pTrc99A-FdR3	pTrc99A (Ap ^R) mit FdR3 (<i>NcoI/BamHI</i>) und C-terminalem His-Tag	Diese Arbeit
pSMF2.1BAFld	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor (Ap ^R , Tc ^R) mit CYP106A1 (<i>SpeI/MluI</i>), Arh1 (<i>KpnI/SacI</i>) und Fld (<i>BsrGI/SphI</i>)	Diese Arbeit
pSMF2.1BAFdx2	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor (Ap ^R , Tc ^R) mit CYP106A1 (<i>SpeI/MluI</i>), Arh1 (<i>KpnI/SacI</i>) und Fdx2 (<i>SacI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pSMF2.1BAFdx3	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor (Ap ^R , Tc ^R) mit CYP106A1 (<i>SpeI/MluI</i>), Arh1 (<i>KpnI/SacI</i>) und Fdx3 (<i>SacI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pSMF2.1BAFdx4	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor (Ap ^R , Tc ^R) mit CYP106A1 (<i>SpeI/MluI</i>), Arh1 (<i>KpnI/SacI</i>) und Fdx2 (<i>SacI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pSMF2.1E	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor (Ap ^R , Tc ^R) mit CYP109E1 (<i>SpeI/KpnI</i>)	Diese Arbeit
pSMF2.1EAFld	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor (Ap ^R , Tc ^R) mit CYP109E1 (<i>SpeI/KpnI</i>), Arh1 (<i>KpnI/SacI</i>) und Fld (<i>BsrGI/SphI</i>)	Diese Arbeit
pSMF2.1EAFdx2	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor (Ap ^R , Tc ^R) mit CYP109E1 (<i>SpeI/KpnI</i>), Arh1 (<i>KpnI/SacI</i>) und Fdx2 (<i>SacI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pSMF2.1EAFdx3	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor (Ap ^R , Tc ^R) mit CYP109E1 (<i>SpeI/KpnI</i>), Arh1 (<i>KpnI/SacI</i>) und Fdx3 (<i>SacI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pSMF2.1EAFdx4	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor (Ap ^R , Tc ^R) mit CYP109E1 (<i>SpeI/KpnI</i>), Arh1 (<i>KpnI/SacI</i>) und Fdx2 (<i>SacI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pSMF2.1A	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor (Ap ^R , Tc ^R) mit CYP109A2 (<i>SpeI/MluI</i>)	Diese Arbeit
pSMF2.1AAFld	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor (Ap ^R , Tc ^R) mit CYP109A2 (<i>SpeI/MluI</i>), Arh1 (<i>KpnI/SacI</i>) und Fld (<i>BsrGI/SphI</i>)	Diese Arbeit
pSMF2.1AAFdx2	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor (Ap ^R , Tc ^R) mit CYP109A2 (<i>SpeI/MluI</i>), Arh1 (<i>KpnI/SacI</i>) und Fdx2 (<i>SacI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pSMF2.1AAFdx3	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor (Ap ^R , Tc ^R) mit CYP109A2 (<i>SpeI/MluI</i>), Arh1 (<i>KpnI/SacI</i>) und Fdx3 (<i>SacI/NotI</i>)	Diese Arbeit
pSMF2.1AAFdx4	<i>B. megaterium</i> Shuttle-Vektor (Ap ^R , Tc ^R) mit CYP109A2 (<i>SpeI/MluI</i>), Arh1 (<i>KpnI/SacI</i>) und Fdx4 (<i>SacI/NotI</i>)	Diese Arbeit

2.2. Methoden

2.2.1. Bioinformatische Methoden

Das Genom von *B. megaterium* DSM319 wurde auf das Vorhandensein potentieller Cytochrome P450 und potentieller Redoxpartner der Cytochrome P450 untersucht. Zur Identifizierung von Genen, die für Cytochrome P450 kodieren, wurde eine Datenbanksuche anhand der Signatur des Häm-Bindemotivs, FxxGx(H/R)xCxG, durchgeführt. Gene, die solche Motive aufwiesen, wurden weiterhin auf das Vorhandensein des stark konservierten Threonins in der potentiellen I-Helix und des konservierten EXXR Motivs in der K-Helix untersucht (Khatri et al. 2010). Die Einteilung der Cytochrome P450 in Familien und Unterfamilien erfolgte durch Dr. David Nelson gemäß der P450 Nomenklatur (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). Potentielle Flavodoxin-, Ferredoxin- und Ferredoxin Reduktasegene wurden identifiziert, indem eine Datenbanksuche mit dem Programm „BLAST“ (Basic Local Alignment Search Tool) nach Genen, die Ähnlichkeiten zu bekannten Flavodoxinen, Ferredoxinen und Ferredoxin Reduktasen aufweisen, durchgeführt wurde.

Die DNA-Sequenzen der erhaltenen Hits wurden mit Hilfe des „ExpASy Translate tool“ (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>) in die entsprechenden Aminosäuresequenzen übersetzt. Das theoretische Molekulargewicht und der theoretische isoelektrische Punkt der Proteine wurden anhand dieser Aminosäuresequenzen mit dem Programm „Compute pI/Mw“ (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html) berechnet. Um den Eisen-Schwefel Cluster Typ und die Domänenstruktur der Ferredoxine zu untersuchen, wurde die Motiv-Datenbank „Pfam“ (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) verwendet (Finn et al. 2010). Die Klassifizierung und Einteilung der identifizierten Cytochrome P450 in Familien und Unterfamilien erfolgte durch Dr. David Nelson gemäß der Nomenklatur der Cytochrome P450 (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>).

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

Alle gentechnischen Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook & Russell, 2001). Die verwendeten

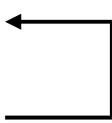
Restriktionsendonukleasen stammten von New England BioLabs Inc. und wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die ausgewählten Gene wurden mittels PCR unter Verwendung von genomischer DNA von *B. megaterium* MS941 oder Plasmid-DNA als Matrize und den entsprechenden Primern amplifiziert. Als Polymerase wurde die Phusion Polymerase (Finnzymes, Vantaa, Finnland) verwendet. Ein PCR-Ansatz (50 µl) enthielt:

DNA (100 ng genomische DNA, 10 ng Plasmid-DNA)	1,0 µl
Phusion Puffer HF (5x)	10,0 µl
dNTPs (5 mM)	2,0 µl
Primer for (10 µM)	2,5 µl
Primer rev (10 µM)	2,5 µl
Phusion Polymerase	1,0 µl
H ₂ O	31,0 µl

Die PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

98°C	3 min	
98°C	30 s	
55-65°C	30 s	
72°C	30 s/1kb	
72°C	10 min	

Die Annealing Temperatur variierte wie oben angegeben in Abhängigkeit des zu amplifizierenden Gens von 55°C bis 65°C. In Tabelle 2.3 sind die entsprechenden Annealing Temperaturen für die Amplifikation der verschiedenen Gene aufgelistet.

Tab 2.3: Übersicht über die für die PCR verwendeten Annealing Temperaturen zur Amplifikation der jeweiligen Gene

Gen	Annealing-Temperatur
CYP109E1, CYP109A2	57°C
Fdx2, Fdx3, Fdx4, FdR1	60°C
CYP106A1, Fld, Fdx1, FdR2, FdR3	65°C

2.2.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten, Topo-Klonierung, Ligation

Nach erfolgreicher Amplifikation der entsprechenden Gene wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des Kits „NucleoSpin® Extract II“ (Macherey-Nagel) aus dem Agarosegel isoliert und in den pCR4Blunt-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert. Nach der Zwischenklonierung wurden die DNA-Fragmente über die durch die PCR eingefügten Schnittstellen aus dem Topo-Vektor ausgeschnitten und erneut aus dem Agarosegel isoliert. Anschließend erfolgte die Ligation der DNA-Fragmente in die mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Expressionsvektoren mit Hilfe des "Fast-Link™ DNA Ligation Kit" (Epicentre) in einem PTC-200 Thermocycler (MJ Research Inc.) nach folgendem Programm:

16°C 15 min
 20°C 15 min
 70°C 15 min
 4°C forever

Die Ligation erfolgte bei einem molaren Verhältnis von Vektor:Insert von 5:1. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Eine Übersicht über die so erstellten Plasmide ist Tab. 2.2 zu entnehmen.

2.2.2.3 Plasmidisolierung und Bestimmung der DNA-Konzentration

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden in Abhängigkeit des Kulturvolumens das NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit bzw. das Nucleobond Plasmid Purification AX 100 Kit (Machery & Nagel) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die DNA-Konzentration

wurde spektrophotometrisch mit Hilfe des Spektralphotometers UV-2101 PC (Shimadzu) anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt, wobei eine Absorption von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht.

2.2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurden 1%ige Agarosegele (in 0,5 x TBE-Puffer), die den Farbstoff „DNA Gelred Nucleic acid Gel stain“ zur Detektion der DNA enthielten, eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt, wobei der DNA-Marker Smart Ladder (Eurogentech) als Größenstandard verwendet wurde.

2.2.2.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der jeweiligen Topo- bzw. Expressionsvektoren wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

2.2.3. Mikrobiologische Methoden

2.2.3.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen und Transformation

Die Herstellung chemisch kompetenter bzw. elektrokompenter *E. coli* Zellen erfolgte nach *Sambroock et al.* (Sambrook & Russell, 2001). Für die heterologe Proteinexpression wurden chemisch kompetente BL21 bzw. C43(DE3) Zellen mittels Hitzeschock transformiert, während bei den Klonierungen aufgrund der deutlich höheren Transformationseffizienz (Fregel et al. 2008) elektrokompente TOP10 Zellen mittels Elektroporation transformiert wurden.

2.2.3.2 Herstellung von Protoplasten und Transformation von *B. megaterium* MS941

Die Herstellung von Protoplasten und Transformation von *B. megaterium* MS941 erfolgte nach der Methode von Barg *et al.* (Barg et al. 2005). Dazu wurde 50 ml LB-Medium in einem 300 ml Schikanekolben mit 1 ml einer Übernacht Kultur von *B. megaterium* MS941 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von 1 bei 200 UpM und 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 5000 UpM und 4°C geerntet und das Pellet in 5 ml SMMP resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Lysozymlösung (in 10 mg/ml SMMP) erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37°C und die regelmäßige Kontrolle der Protoplastenbildung unter dem Mikroskop. Sobald 80 bis 100% der Zellen als Protoplasten

vorlagen, wurden diese für 10 min bei 3000 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert, in 5 ml SMMP resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Nach erneutem Resuspendieren des Zellpellets in 5 ml SMMP wurden die Protoplasten mit 750 µl einer 87%igen Glycerinlösung versetzt. Die Protoplasten wurden zu 500 µl aliquotiert und bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden 500 µl *B. megaterium* Protoplasten zu 5 µg Plasmid-DNA (gelöst in 20 µl SMMP) gegeben und die Protoplasten-DNA-Lösung langsam zu 1,5 ml PEG-P Lösung pipettiert. Nach Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur wurde 5 ml SMMP zugegeben und für 10 min bei 3000 UpM und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen, das Pellet in 500 µl SMMP resuspendiert und für 45 min ohne Schütteln, gefolgt von 45 min bei 300 UpM inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz in 3,5 ml CR5-Topagar überführt, vorsichtig gemischt und auf vorgewärmten LB-Platten, die Tetracyclin der Endkonzentration 10 µg/ml enthielten, verteilt. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C wurden die Klone erneut auf LB-Platten (10 µg/ml Tetracyclin) ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert.

2.2.3.3 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

E. coli wurde in den komplexen Flüssigmedien Nährbouillon I (NB) oder Luria-Bertani (LB) kultiviert. Für die Expression in *E. coli* wurde TB-Medium, bestehend aus 24 g/l Hefeextrakt, 12 g/l Trypton, 4 ml/l Glycerin, 2,31 g/l KH_2PO_4 , 12,5 g/l K_2HPO_4 und H_2O (ad 1 l), eingesetzt. Zur Selektion wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml verwendet. *B. megaterium* wurde in LB-Flüssigmedium oder einem komplexen Medium kultiviert, das 24 g/l Hefeextrakt, 12 g/l Soyton, 4 ml/l Glycerin, 2,31 g/l KH_2PO_4 , 12,5 g/l K_2HPO_4 und H_2O (ad 1 l) enthielt. Zur Selektion wurde Tetracyclin in einer Endkonzentration von 10 µg/ml verwendet.

Für *E. coli* und *B. megaterium* wurden LB-Agarplatten mit 1,5% Agar-Agar verwendet. Die Lagerung der Bakterien erfolgte für kürzere Zeiträume auf LB-Agarplatten bei 4°C. Zur langfristigen Lagerung wurden Glycerinstocks durch eine 1:1 Mischung einer Übernacht-Kultur mit einer 87%igen Glycerinlösung hergestellt und diese bei -80°C gelagert.

2.2.3.4 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Die heterologe Proteinexpression aller aus *B. megaterium* stammenden Proteine außer FdR3 (Cytochrome P450, Flavodoxin, Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen FdR1 und FdR2) erfolgte in *E. coli* C43(DE3) Zellen. Die Ferredoxin Reduktase FdR3 wurde in *E. coli* BL21

Zellen exprimiert. Dazu wurde 10 ml TB-Medium, das Ampicillin der Endkonzentration 100 µg/ml enthielt, mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150 UpM kultiviert. Mit 5 ml dieser Vorkultur wurde 250 ml TB-Medium der gleichen Ampicillin-Konzentration in 2 l Schikanekolben angeimpft und bei 37°C und 100 UpM kultiviert. Um das Wachstum der Bakterienkultur zu kontrollieren, wurde in regelmäßigen Abständen die optische Dichte (OD) bei 600 nm im Spektralphotometer gemessen, wobei TB-Medium als Leerwert eingesetzt wurde. Sobald ein Wert von etwa 0,5 erreicht war, wurden die Kulturen mit IPTG in der Endkonzentration 1 mM induziert. Bei der Expression der Cytochrome P450 wurde gleichzeitig mit der Induktion der Häm-Vorläufer δ -Aminolävulinsäure in der Endkonzentration 0,5 mM zugegeben. Die Proteinexpression erfolgte bei 28°C und 100 UpM. 24 h nach Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4500 UpM und 4°C für 20 min geerntet, der Überstand verworfen und das Zellpellet bei -20°C gelagert.

Die Mutante Arh1_A18G aus *Schizosaccharomyces pombe*, die durch eine gesteigerte Ausbeute an Holoprotein im Vergleich zum Wildtyp Arh1 gekennzeichnet ist und in dieser Arbeit nur Arh1 genannt wurde, wurde wie zuvor beschrieben exprimiert und gereinigt (Ewen et al. 2008). Die Reduktase AdR aus *Bos taurus* und CYP106A2 (mit His₆-Tag) aus *B. megaterium* wurden in unserem Institut von Katharina Bompais und Wolfgang Reinle in *E. coli* Zellen rekombinant exprimiert und gereinigt (Lisurek 2004; Sagara et al. 1993). Die Expression und Reinigung der *E. coli* Fpr erfolgte in unserem Institut durch Dr. Michael Ringle (Ringle et al. 2012) und wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.4. Proteinreinigung der Proteine aus *B. megaterium*

2.2.4.1 Ultraschallaufschluss

Die Zellpellets wurden in Lysepuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0; 300 mM NaCl) resuspendiert und mit dem Serin-Proteaseinhibitor PMSF in einer Endkonzentration von 1 mM versetzt. Der Aufschluss wurde unter permanenter Eiskühlung mit dem Sonotrodentyp 1, einer Schwingungsamplitude von 25 mm, einem Puls von 30 Sekunden, einer Ratio von 1 und einer Rührerdrehzahl von 200 UpM mit einer Rührzeit von 30 min in Anwesenheit eines Magnetrührstabes durchgeführt. Nach dem Aufschluss wurde die Suspension bei 30000 g und 4°C für 30 min unter Vakuum zentrifugiert (Ultrazentrifugation). Dadurch wurden Zelltrümmer und Membranproteine pelletiert, während sich die zytosolischen Proteine im Überstand befanden. Dieser Überstand wurde nun gesammelt und durch Immobilisierte

Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Alle Proteinreinigungen wurden bei 4°C mit der Chromatographieanlage Äkta Prime (GE Healthcare Life Sciences) durchgeführt.

2.2.4.1 Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Alle aus *B. megaterium* stammenden Proteine enthielten einen aus sechs aufeinander folgenden Histidinen bestehenden His₆-Tag. Dieser Tag ermöglicht die Reinigung mittels Immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie, die auf der reversiblen Wechselwirkung zwischen den Histidin Seitenketten und immobilisierten Metallionen, hier Co²⁺, basiert. Die Reinigung erfolgte mit Hilfe des Äkta PrimeTM Chromatographiesystems (Pharmacia) unter Verwendung des Säulenmaterials TALON® Metal Affinity Resin (Clontech). Die Lysate wurden mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min auf die Säule geladen. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit Äquilibrationpuffer, der hier dem Lysepuffer entsprach, entfernt. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit Elutionspuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol), wobei Fraktionen zu je 2 ml gesammelt wurden. Nach der Elution wurde die Säule wiederum mit Lysepuffer äquilibriert. Die gesammelten Fraktionen wurden UV/Vis-spektroskopisch von 200 - 700 nm vermessen. Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration (Millipore Amicon®Ultra Ultracel®) auf ein maximales Volumen von 1,5 ml konzentriert und einer Größenausschlusschromatographie unterzogen.

2.2.4.2 Größenausschlusschromatographie

Die konzentrierten Proben wurden mit 100 µl einer 40%igen Glukoselösung versetzt und auf eine mit SuperdexTM 75 pg (Clontech) gefüllte und mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte am Äkta PrimeTM Chromatographiesystem (Pharmacia) mit einer Flussrate von 0,1 ml/min, wobei 2 ml Fraktionen gesammelt wurden. Die Fraktionen wurden UV/Vis-spektroskopisch von 200 - 700 nm vermessen und der Reinheitswert (Q-Wert) jeder Fraktion berechnet. Geeignete Fraktionen wurden vereinigt, aufkonzentriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.5. Proteinanalysen

2.2.5.1 BC-Assay

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde der BC-Assay (Uptima/Interchim, Montlucon, France) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Überprüfung der Reinheit und des Molekulargewichts der exprimierten und gereinigten Proteine wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Dafür wurde eine vertikale Hoefer Mighty-Small-Mini-Gel-Apparatur (Amersham Pharmacia Biotech) mit 15%igen SDS-Trenngelen eingesetzt und die Trennung bei 20 mA durchgeführt (Sambrook & Russell, 2001). Die Proteine wurden mit Coomassie-Lösung (0,1% w/v Coomassie Blue, 10% v/v Essigsäure, 40% v/v dH₂O, 50% v/v Methanol) gefärbt und der Hintergrund des Gels mit Entfärbelösung (10% v/v Essigsäure, 45% v/v dH₂O 45% v/v Methanol) entfärbt. Zur Abschätzung der Molekulargewichte wurde ein Größenstandard eingesetzt (peqGOLD Protein-Marker IV, peqlab).

Zum Nachweis der Proteinexpression in *B. megaterium* wurde jeweils eine von der optischen Dichte bei 578 nm (OD₅₇₈) abhängige Probenmenge eingesetzt, so dass eine gleichbleibende Zellzahl in jeder Probe gewährleistet war. Entsprechende Aliquote von *B. megaterium* Zellsuspensionen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 10000 g pelletiert, in Lysepuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0; 20 mM EDTA; 5 mg/ml Lysozym) resuspendiert und bei 37°C für 30 min inkubiert. Zur Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wurden die Zellsuspensionen 15 min bei 10000 g zentrifugiert. Proben des Zellysats wurden mit dem gleichen Volumen 2x SDS-Probenpuffer gemischt und für 10 min bei 100°C gekocht. Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte analog zu der der reinen Proteine.

2.2.5.3 Western Blot

Für Western Blot Analysen wurden die Proben wie unter 2.2.5.2 beschrieben vorbereitet und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für Western Blot Analysen von CYP106A1, Arh1 und Fld wurden die Gele bei 10 mA während 45 min auf hybond-ECL Nitrocellulose Membranen (Biorad, Richmond, CA, USA) geblottet (Towbin et al. 1992). Zur Blockierung von freien unspezifischen Proteinbindungsstellen wurden die Membranen über Nacht bei 4°C in TBS Puffer (50 mM Tris-base pH 7,5; 200 mM NaCl; 0,1% Tween 20), der 3% Milchpulver enthielt, gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS Puffer wurden die Membranen für 2 h

mit dem jeweiligen primären Antikörper (1:1000 Verdünnung) in TBS Puffer inkubiert. Die primären Antikörper gegen CYP106A1, Arh1 und Fld wurden durch Charles River Company hergestellt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS Puffer wurden die Membranen mit einem sekundären Antikörper (1:2000 Verdünnung), einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten goat antirabbit IgG (Dako, Glostrup, Denmark), in TBS Puffer für 1 h versetzt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS Puffer (10 mM Kaliumphosphat Puffer pH 7,4; 150 mM NaCl) wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 4 mg 4-Chlor-1-Naphtol (gelöst in 2 ml Ethanol) und 10 μ l 30% H₂O₂ in 25 ml PBS Puffer gestartet.

Für Western Blot Analysen der Ferredoxine wurden die Gele bei 10 mA während 45 min auf Sequi-Blot PVDF Membranen (Biorad, Richmond, CA, USA) geblottet. Zur Blockierung freier unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Membranen für 15 min in PBS-Tween Puffer (10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,3% Tween 20), der 3% Milchpulver enthielt, inkubiert. Die Membranen wurden anschließend für 1 h mit der Anti His₆-Peroxidase (Roche Applied Science) in einer 1:1500 Verdünnung versetzt. Die Membranen wurden 3 Mal mit PBS-Tween Puffer gewaschen und die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 7,5 mg Diaminobenzidin und 25 μ l 30% H₂O₂ in 30 ml PBS-Tween Puffer gestartet.

2.2.6. Spektroskopische Methoden

2.2.6.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die Zelldichte von *E. coli* Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm bestimmt (OD₆₀₀). Die optische Dichte von *B. megaterium* Kulturen wurde durch die Messung der Absorption bei 578 nm (OD₅₇₈) bestimmt.

2.2.6.2 UV/vis-Spektroskopie zur Bestimmung der Konzentration reiner Proteine

UV/Vis-Spektren der gereinigten Proteine wurden an einem Zweistrahlphotometer (UV-2101PC, Shimadzu, Japan) von 200 nm bis 700 nm aufgenommen. Um die Konzentrationen des Flavodoxins und der Ferredoxine zu bestimmen, mussten die molaren Extinktionskoeffizienten an den charakteristischen Maxima der Proteine ermittelt werden. Dies wurde durch Korrelation der mittels BC Assay (2.2.5.1) bestimmten Gesamtproteinkonzentration der reinen Proteine und der Absorptionswerte an den charakteristischen Maxima der Proteine erreicht. Zudem wurde der Reinheitsgrad der

einzelnen Proteine anhand der jeweiligen Q-Werte berechnet. Bei dem Q-Wert handelt es sich um den Quotienten aus den Absorptionswerten an den charakteristischen Maxima der jeweiligen Proteine und den Absorptionswerten bei 276 nm, welche die allgemeine Proteinabsorption reflektieren. Bei allen Reinigungen wurde der Reinheitsgrad über die entsprechenden Q-Werte und die Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz unter Berücksichtigung der jeweiligen Extinktionskoeffizienten bestimmt.

Um UV/Vis-Spektren des reduzierten Fld zu erhalten, wurde eine 40 µM Fld-Lösung mit 4 µM Arh1 versetzt, wodurch das Spektrum des gereinigten Fld nicht verändert wurde. Die Reduktion erfolgte durch Zugabe von 400 µM NADPH. Eine vollständige Oxidation des gereinigten Fld wurde erreicht, indem 30 µM Fld-Lösung mit 50 µM Kaliumhexacyanoferrat ($K_3[Fe(CN)_6]$) versetzt wurden und das überschüssige Kaliumhexacyanoferrat durch Ultrafiltration (Millipore Amicon®Ultra Ultracel®) wieder entfernt wurde.

2.2.6.3 Bestimmung der Cytochrom P450 Konzentration

Die Bestimmung der Cytochrom P450 Konzentration erfolgte mittels CO-Differenzspektroskopie (COD) nach der Methode von Omura und Sato (Omura und Sato 1964a). Cytochrome P450 erhielten ihren Namen von ihren ungewöhnlichen spektralen Eigenschaften; der reduzierte Kohlenmonoxid (CO) gebundene Komplex besitzt ein typisches Absorptionsmaximum bei 450 nm, welches nach oben erwähnter Methode die Bestimmung der Cytochrom P450-Konzentration ermöglicht. Die gereinigten Cytochrome P450 wurden mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 1:200 verdünnt und mit einer Spatelspitze Natriumdithionit ($Na_2S_2O_4$) versetzt, wodurch des Eisen im Häm reduziert wurde. Die Probe wurde auf zwei Küvetten aufgeteilt, wobei eine Küvette als Referenz diente und die andere 1 min mit CO begast wurde. Die Messung des CO-Differenzspektrums erfolgte von 400 nm bis 500 nm. Die Cytochrom P450 Konzentration wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$c(\text{P450}) = \frac{A_{450} - A_{490} * F}{\epsilon * d}$$

c (P450): Cytochrom P450 Konzentration (in mM)

A_{450} : Absorption bei 450 nm

A_{490} : Absorption bei 490 nm

- F: Verdünnungsfaktor (200)
 ϵ : Extinktionskoeffizient ($91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
d: Schichtdicke der Küvette (1 cm)

2.2.6.4 Typ I-Differenzspektroskopie und Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D

Die Messung von Substrat-induzierten TypI-Differenzspektren erfolgte an einem Zweistrahlphotometer (UV-2101PC, Shimadzu, Japan) nach der Methode von Schenkman und Jansson (Schenkman und Jansson 1998). Die Bindung von sogenannten TypI-Substraten im aktiven Zentrum bedingt eine Verdrängung des axialen Wassers von der sechsten Koordinationsstelle des Häm-Eisens. Dies resultiert in einer Verschiebung des Absorptionsmaximums vom low-spin Zustand (417 nm) zum high-spin Zustand, der durch ein Absorptionsmaximum bei niedrigeren Wellenlängen und ein Absorptionsminimum bei etwa 417 nm gekennzeichnet ist. Für die Messungen wurden zwei Tandem-Quarz-Küvetten eingesetzt, die jeweils aus zwei Kammern (R_1 und R_2 bzw. P_1 und P_2) bestehen (Abb. 2.1). Die Kammern R_2 und P_2 enthielten jeweils eine $10 \mu\text{M}$ Cytochrom P450 Lösung in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4, während die Kammern R_1 und P_1 nur 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 enthielten. Die in DMSO gelösten Substrate (5 mM Stocklösung) wurden in steigenden Konzentrationen zu den Kammern P_1 und R_2 gegeben. Die entsprechende Menge DMSO wurde den Kammern R_1 und P_2 zugegeben und nach einer Inkubation von 5 min wurde ein Spektrum von 350 nm bis 500 nm aufgenommen. Die Daten wurden durch Auftragung der Differenzen der Absorptionswerte des Maximums und des Minimums (ΔA) gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen und anschließender Auswertung mit dem Programm Origin (OriginLab Corporation, Massachusetts, USA) analysiert. Alle Titrationen wurden in Triplikaten durchgeführt, so dass der entsprechende K_D Wert den Mittelwert dieser drei unabhängigen Messungen darstellt.

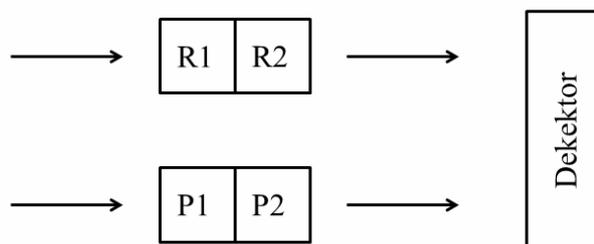


Abb. 2.1: Schema der zur Untersuchung eines Substrat-induzierten TypI-Shifts und zur Bestimmung des K_D Wertes eingesetzten Tandemküvetten.

2.2.6.5 Screening der Naturstoffbibliothek mit CYP106A1

Das Screening der aus 502 Substanzen bestehenden Naturstoffbibliothek (Biomol International, Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland) erfolgte nach der in unserem Institut etablierten Methode (Schmitz et al. 2012) mittels Differenzspektroskopie in transparenten 96-well-Platten aus Polystyrol an einem Plattenreader Tecan Sapphire II (Tecan Group Ltd, Maennedorf, Deutschland). Die Messungen wurden von 300 – 500 nm in 10 nm Schritten bei 25°C durchgeführt. Die Konzentrationen des Cytochroms P450 und der Substanzen wurden variiert, um optimale Bedingungen zur Detektion eines Typ I Shifts zu erhalten. Dabei erwies sich eine Konzentration von 10 µM sowohl für CYP106A1 als auch für die Substanzen als am besten geeignet. Jede Messreihe enthielt eine Positivkontrolle (Testosteron), eine Negativkontrolle (Cholestenon) und eine DMSO-Kontrolle. Die Platten, von denen jedes Well 250 µl CYP106A1-Lösung (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4) enthielt, wurden vor und nach der Zugabe der Substanzen vermessen. Durch Subtraktion der Werte vor der Substanzzugabe von denen nach der Substanzzugabe wurden die Differenzspektren erhalten und diese anhand der mitgeführten Kontrollen ausgewertet.

2.2.6.6 Cytochrom *c* Assay

Um zu untersuchen, ob der fehlende Elektronentransfer zwischen Arh1 und Fdx1 oder zwischen Fdx1 und CYP106A1 oder beides die Ursache für den nicht vorhandenen Substratumsatz darstellen, wurde ein Cytochrom *c* Assay durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Assay, anhand dessen zum Beispiel die Interaktion zwischen einer Ferredoxin Reduktase und einem Ferredoxin untersucht werden kann, da die meisten Ferredoxine sehr schnell und effizient Elektronen auf Cytochrom *c* übertragen (Schiffler et al., 2004). Dabei erfolgt eine Reduktion des Cytochrom *c*, welche anhand der Absorptionzunahme bei 550 nm spektroskopisch verfolgt und quantifiziert werden kann. Dafür wurden Cytochrom *c* (100 µM), Fdx1 (10 µM) und Arh1/AdR/Fpr (1 µM) in 500 µl 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µM NADPH gestartet und die Reduktion von Cytochrom *c* wurde bei 550 nm verfolgt.

2.2.6.7 NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren erfolgte durch Herrn Dr. Josef Zapp (Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken) an einem Bruker DRX 500 oder einem Bruker Avance 500 NMR Spektrometer bei 298 K. Die NMR-Spektren wurden in deuteriertem Chloroform (CDCl₃) oder Methanol (CD₃OD)

aufgenommen. Alle chemischen Verschiebungen wurden in parts per million (ppm) auf der δ -Skala relativ zu den Lösemittelpeaks von CDCl_3 bei δ 7.24 (^1H NMR) bzw. 77.00 (^{13}C NMR) oder CH_3OD bei δ 3,30 (^1H NMR) bzw. CD_3OD bei δ 49,00 (^{13}C NMR) angegeben. Die zweidimensionalen NMR Spektren wurden als gs-HH-COSY, gs-NOESY, gs-HSQCED und gs-HMBC aufgenommen.

2.2.7. Cytochrom P450 abhängige Substratumsätze

2.2.7.1 *In vitro* Substratumsätze

Die *in vitro* Substratumsätze wurden in einem Volumen von 250 μl bei 30°C und in Abhängigkeit des eingesetzten Cytochroms P450 bzw. Substrates für 30 bis 120 min durchgeführt. Als Puffersystem wurde 20 mM Kaliumphosphatpuffer, 20% Glycerin, pH 7,4 bzw. im Falle des CYP106A1 abhängigen KBA Umsatzes 50 mM HEPES-Puffer, 20% Glycerin, pH 7,4 eingesetzt. Ein Reaktionsansatz enthielt Arh1 (1,5 μM), Fdx/Fld (10 μM) und Cytochrom P450 (0,5 μM), ein NADPH-regenerierendes System (1 mM MgCl_2 , 5 mM Glukose-6-Phosphat, 1 U Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase) und 100 bis 200 μM Substrat. Mit Ausnahme von Vitamin D3, welches in einer 45%igen β -Hydroxypropyl-Cyclodextrin-Lösung solubilisiert wurde, wurden alle Substanzen in Ethanol gelöst. Vitamin D3 wurde den *in vitro* Substratumsätzen jeweils in einer 20-fachen Verdünnung zugegeben, so dass die Endkonzentration des β -Hydroxypropyl-Cyclodextrins 2,25% betrug. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von NADPH in einer Endkonzentration von 1 mM gestartet und durch 500 μl Ethylacetat gestoppt. Die Proben wurden bei 10000 UpM für 10 min zentrifugiert, um wässrige und organische Phase zu trennen. Die organische Phase wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und die wässrige Phase erneut mit 500 μl Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösemittel durch einen Vakuum-Zentrifugen-Konzentrator (Univapo 100 H von UniEquip) eingedampft und die Proben direkt mittels HPLC analysiert oder bei -20°C gelagert. Ein Vergleich der verschiedenen Redoxpartner erfolgte mittels *in vitro* Substratumsätzen unter den oben beschriebenen Bedingungen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Absorptionseigenschaften der Produkte mit denen des jeweiligen Substrates übereinstimmen und die Produktbildung wurde aus der Summe der Produkte im Vergleich zur Summe der Produkte und des Substrates berechnet. Die angegebenen Werte stellen den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Reaktionen dar.

2.2.7.2 Bestimmung der Enzymaktivität

Um die Enzymaktivität und kinetische Parameter der Cytochrom P450 abhängigen Substratumsetzung zu bestimmen, wurden Substratumsätze wie unter 2.2.7.1 beschrieben durchgeführt. Im Falle des CYP106A1 abhängigen KBA Umsatzes wurden die Reaktionen mit 1,5 μM Arh1, 10 μM Fdx2 und 0,5 μM CYP106A1 für 2 min durchgeführt. Die KBA Konzentrationen reichten von 0-100 μM . Die Bestimmung der Enzymaktivität der CYP109E1 abhängigen Vitamin D3 Umsetzung erfolgte mit 1,5 μM Arh1, 10 μM Fdx3 und 0,5 μM CYP109E1 für 3 min, wobei Vitamin D3 in Endkonzentrationen von 0-150 μM eingesetzt wurde. Im Falle des CYP109A2 abhängigen Vitamin D3 Umsatzes wurden die Reaktionen mit 1,5 μM Arh1, 10 μM Fdx3 und 0,5 μM CYP109A2 für 30 min durchgeführt. Die Vitamin D3 Konzentrationen reichten von 0-150 μM . Die V_{max} und K_{M} Werte wurden durch Auftragung der Produktbildungsraten gegen die Substratkonzentrationen berechnet. Die erhaltenen Daten wurden durch hyperbolische bzw. sigmoidale Regression mittels des Programms Origin (OriginLab Corporation, Massachusetts, USA) ausgewertet.

2.2.7.3 Ganzzellumsätze mit *B. megaterium* MS941 (*in vivo* Substratumsätze)

Die *B. megaterium* MS941 Stämme wurden anhand der Methode der Polyethylenglykol vermittelten Protoplastentransformation (Barg et al., 2005) mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transformiert. Für die Ganzzellumsätze wurde 50 ml Komplexmedium, das 10 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin enthielt, in einem 300 ml Schikanekolben mit einer einzelnen *B. megaterium* Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C und 180 UpM inkubiert. 50 ml Komplexmedium, das mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin supplementiert wurde, wurde mit 500 μl der Übernachtskultur angeimpft und weiter kultiviert. Sobald die OD_{578} einen Wert von 0,4 erreichte, wurde die Proteinexpression durch die Zugabe von 0,5% (w/v) Xylose induziert. 24 h nach der Induktion wurden die Kulturen durch Zentrifugation bei 10000 g und 4°C für 15 min geerntet, in 25 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 resuspendiert und die in Ethanol gelösten Substrate in Endkonzentrationen von 100 - 300 μM zugegeben. Alternativ wurden die Expressionskulturen direkt mit den Substraten versetzt. Das Substrat Vitamin D3 wurde statt in Ethanol in einer 45%igen β -Hydroxypropyl-Cyclodextrin-Lösung solubilisiert, welche 4 mM Saponin enthielt und in einer Endkonzentration von 200 μM zugegeben, wobei die Endkonzentration des β -Hydroxypropyl-Cyclodextrins 2,25% und die des Saponins 0,2% betrug. 500 μl Proben der Kulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Die Extraktion der Proben wurde wie unter 2.2.7.1 beschrieben durchgeführt und die Proben bis zur HPLC Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.7.4 Large scale Substratumsatz mit *B. megaterium* MS941

Um ausreichende Mengen der durch die Cytochrom P450 Systeme hergestellten Produkte zu erhalten, so dass eine Strukturaufklärung der Produkte mittels NMR-Spektroskopie ermöglicht wird, wurde der Kultivierungsmaßstab erhöht (Upscale). Das Kulturvolumen der Hauptkultur wurde auf ein Volumen von 750 ml erhöht, wobei eine Aufteilung zu je 250 ml auf einen 2 L Schikanekolben erfolgte. Die Inkubation und Induktion wurden wie unter 2.2.7.3 beschrieben durchgeführt. Nach einer Expressionszeit von 24 h wurden die Kulturen durch Zentrifugation geerntet, in 375 ml Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 resuspendiert und die entsprechenden Substrate in Endkonzentrationen von 100 - 300 μ M zugegeben. Nach individuellen Umsatzzeiten wurden die Kulturen für 20 min bei 4500 g zentrifugiert und der Überstand zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, an einem Rotationsverdampfer (Rotavapor R-114 von Büchi) eingedampft und bei -20°C gelagert. Die Reinigung und Isolierung der Produkte aus dem Extrakt erfolgte mittels semi-präparativer HPLC-Trennung (s. 2.2.8.2).

2.2.8. Chromatographische Methoden

2.2.8.1 Analytische HPLC-UV Messungen

Die HPLC Analysen wurden an einem 900er-System der Firma Jasco (eine Pu-980 HPLC Pumpe, ein AS-950 Sampler, ein UV-975 UV/visible Detektor und eine LG-980-02 Gradienteneinheit; Jasco, Gross-Umstadt, Germany) durchgeführt. Alle verwendeten Lösemittel waren von HPLC-Reinheit und das verwendete Wasser wurde zuvor mit einer Milli-Q Biocel (Millipore, Bedford, MA, USA) gereinigt. Alle Lösemittelgemische wurden vor Gebrauch entgast. Als Laufmittel dienten Gemische aus Acetonitril/Wasser im Verhältnis 40/60 bzw. 91/9 oder aus Methanol/Wasser im Verhältnis 75/25 (+0,1% TFA). Eine reversed-phase ec MN Nucleodur C₁₈ (3 μ m, 4.0 x 125 mm) Säule (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA, USA) wurde für alle Experimente mit einer Flussrate von 1 ml/min und bei einer Temperatur von 40°C eingesetzt. Die Detektion der Substrate und Produkte erfolgte bei 240 nm, 254 nm oder 265 nm.

2.2.8.2 Semi-präparative HPLC-UV zur Isolierung von Produkten

Für die Isolierung der Produkte aus dem *B. megaterium* Extrakt wurde eine Jasco HPLC-Anlage der 2000er Plus-Serie mit Hochdruckgradienten-System verwendet. Diese

unterscheidet sich von der unter 2.2.8.1 beschriebenen Jasco-Anlage durch das Vorhandensein eines Diodenarray Detektors (Jasco MD-2010 Plus) sowie eines Autosamplers mit einem maximalen Injektionsvolumen von 1 ml. Die Extrakte wurden in 10 ml des entsprechenden Laufmittels gelöst, mit Hilfe einer 20 ml Spritze mit Injektionsnadel aufgezogen und durch Acrodisc® PTFE Spritzenfilter ($d = 0,45 \mu\text{m}$, Firma PALL) filtriert. Die filtrierte Lösung wurde zu 1 ml Aliquots auf HPLC Vials verteilt und auf eine semi-präparative reversed-phase ec MN Nucleodur C₁₈ ($5 \mu\text{m}$, $8.0 \times 250 \text{ mm}$) Säule (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA, USA) injiziert. Der HPLC-Lauf erfolgte analog zu den Bedingungen der analytischen HPLC-UV, jedoch mit einer erhöhten Flussrate von 3 ml/min. Die Fraktionen wurden mit einem Advantec CHF122 SB Fraktionssammler gesammelt, vereinigt und das Lösemittelgemisch an einem Rotationsverdampfer (Rotavapor R-114 von Büchi) abgedampft.

2.2.9. Quantitative Real-Time Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)

Bei der quantitativen real-time PCR handelt es sich aktuell um eine der exaktesten Methoden zur Quantifizierung von mRNA. Sie zeichnet sich dabei im Vergleich zu bisherigen Methoden durch eine höhere Sensitivität aus, wodurch sogar ein einziges Molekül nachgewiesen werden kann. Da diese höhere Sensitivität jedoch auch höhere Anforderungen an den experimentellen Ablauf stellt, wurde die quantitative real-time PCR nach einem erweiterten, bewährten Protokoll (Klatte und Bauer 2009) durchgeführt.

2.2.9.1 Primerdesign

Das Design der RT-Primer für die real-time PCR erfolgte mit Hilfe des Programms Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Dabei wurden die Parameter derart festgelegt, dass die Primerlänge 17 - 27 bp, der GC-Gehalt 40 - 60%, und die Schmelztemperatur 60°C betrug. Die Länge des resultierenden PCR-Produktes wurde auf 150 - 200 bp festgelegt. Die Primer wurden anhand einer Blast Suche im gesamten *B. megaterium* DSM319 Genom (Primer-BLAST Funktion, NCBI) auf ihre Spezifität und Einzigartigkeit hin überprüft.

2.2.9.2 Herstellung von Massenstandards

Um die in der quantitativen real-time PCR erhaltenen Expressionswerte nicht nur relativ, sondern auch absolut und quantitativ miteinander vergleichen zu können, wurden für alle zu

untersuchenden Gene Massenstandards miteinbezogen. Bei diesen Massenstandards handelt es sich um etwa 1 kb große cDNA Sequenzen, welche die entsprechenden real-time PCR Zielsequenzen einschließen. Das Primerdesign erfolgte wie unter 2.2.9.1 beschrieben, jedoch mit einer Ziellänge der PCR-Produkte von 800 - 1500 bp. Zur Herstellung der Massenstandards wurden PCRs mit 30 - 35 Zyklen und genomischer bzw. Plasmid DNA als Matrize durchgeführt. Die erhaltenen PCR Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des Kits „NucleoSpin® Extract II“ (Macherey-Nagel) aus dem Agarosegel isoliert. Die Konzentration der isolierten PCR Produkte wurde in einem 1%igen Agarosegel anhand des DNA-Markers Smart Ladder (Eurogentech) bestimmt. Aus der so bestimmten Konzentration wurde die Kopienzahl der entsprechenden DNA-Fragmente mit Hilfe des Web basierenden Programms OligoAnalyzer berechnet (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/default.aspx>) und jeweils ein Stock von 10^9 Molekülen pro 10 μ l hergestellt. Für jeden Massenstandard wurden Verdünnungen von 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , und 10^2 Fragmenten pro 10 μ l hergestellt und zu 30 μ l Aliquots in PCR Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert.

2.2.9.3 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

B. megaterium MS941 Zellen wurden in mit Casaminsäuren supplementiertem M9 Minimalmedium, das entweder 25 μM Eisen (+Fe) oder kein Eisen (-Fe) enthielt, bei 30°C und 180 UpM in Schikanekolben kultiviert. Für jede Eisenbedingung wurden parallel drei voneinander unabhängige Kulturen verwendet, deren Mittelwerte die Grundlage der späteren Quantifizierung und Auswertung darstellten. 10 ml des M9 Mediums mit oder ohne Eisen wurden mit einer einzelnen *B. megaterium* Kolonie angeimpft und über Nacht inkubiert. 50 ml des jeweiligen M9 Mediums wurden mit 500 μ l der Übernachtskultur angeimpft und für 24 h kultiviert. Ein Volumen, das 1×10^9 Zellen entsprach, wurde aus den Kolben entnommen und durch Zentrifugation pelletiert. Die Gesamt RNA wurde mit dem innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena, Germany) gemäß den Herstellerangaben aus den Zellen isoliert. Die RNA Konzentration und Qualität wurde durch spektrophotometrische Analyse bei 260 nm und 280 nm und durch Visualisierung auf einem 1%igen Agarosegel bestimmt. Die Reverse Transkription der RNA mit Random Hexamer Primern wurde mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) bei Einsatz von 1 μg RNA durchgeführt. Die erhaltene cDNA wurde 1:10 mit dH_2O verdünnt und bei -20°C gelagert.

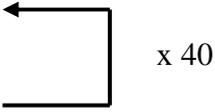
2.2.9.4 qPCR Messung

Vor Gebrauch wurde die cDNA wiederum 1:10 mit dH₂O verdünnt und aliquotiert. Für jede Messung wurde für die entsprechenden zu untersuchenden Gene ein Mastermix aus den Primern und dem Mastermix des DyNAmoTM ColorFlash qPCR Kits, welcher schon SYBR Green enthält, hergestellt:

Mastermix für qPCR

2x qPCR Premix	10 µl
Primer for (10 µM)	0,2 µl
Primer rev (10 µM)	0,2 µl
—————	
10,4 µl	

Mit einer Mehrkanalpipette wurde pro qPCR Reaktion 10 µl des Mastermix mit 10 µl cDNA bzw. 10 µl Massenstandard in einem Well einer 96 Well Platte gemischt und diese mit ICycler iQTM Optical Tape versiegelt. Jede qPCR Reaktion wurde in einem technischen Duplikat pipettiert. Die quantitative real-time PCR wurde an einem iCycler/MyIQ Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) nach folgendem Thermoprofil durchgeführt:

95°C	3 min	
95°C	10 s	
60°C	10 s	
72°C	10 s	
95°C	1 min	
55°C	1 min	
60-95°C	8 min 20 s	
12°C	forever	

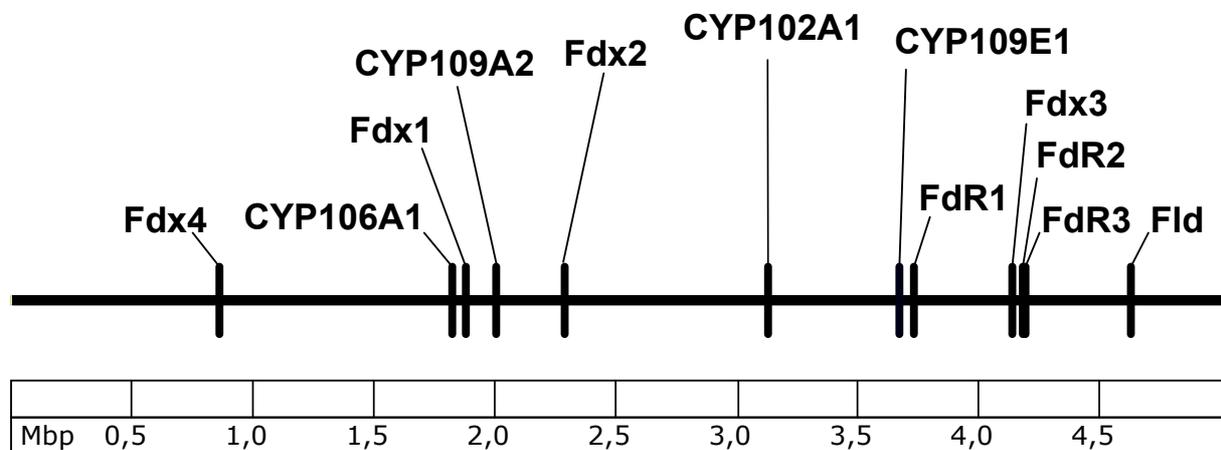
2.2.9.5 Datenanalyse

Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Software Bio-Rad iQ5-Standard Edition (Version 2.0). Dabei wurden die sogenannten Ct (threshold cycle) Werte der technischen Duplikate jeder Probe und jedes Standards auf Gleichförmigkeit untersucht, wobei Abweichungen bis maximal 1 Ct akzeptiert wurden. Proben mit höheren Abweichungen wurden von der weiteren Datenanalyse ausgeschlossen. Anhand der Standardkurve wurde die Effizienz der PCR berechnet, welche Werte zwischen 95-105% erreichen sollte. Geringere oder höhere Werte weisen auf das Vorhandensein von PCR Inhibitoren, suboptimales Primerdesign oder degradierte PCR Komponenten hin und machen eine Wiederholung der Messung bzw. eine weitere Optimierung der PCR notwendig. Die Spezifität der PCR wurde anhand der jeweiligen Schmelzkurven überprüft. Das Vorhandensein eines einzelnen Peaks zeigt die Bildung des korrekten PCR-Produktes mit genauer Schmelztemperatur an, während zusätzliche kleinere Peaks auf Artefakte und Zusatzamplifikate hindeuten, welche die Quantifizierung verfälschen. Die absoluten Expressionswerte (SQ mean) und die jeweiligen Probennamen wurden in Microsoft Excel exportiert. Von den absoluten Expressionswerten (SQ mean) jeder Probe wurde der Wert der Wasserkontrolle subtrahiert. Dann wurden die Normalisierungsfaktoren anhand der Analyse der absoluten Expressionswerte des internen Kontrollgens, hier des *B. megaterium* Gens *rpoB*, bestimmt. Dazu wurde der absolute Expressionswert der Kontrollprobe, hier M9 Medium ohne Eisen (-Fe), durch den absoluten Expressionswert jeder einzelnen Probe dividiert. Der so erhaltene Normalisierungsfaktor wurde nun mit den Expressionswerten aller zu untersuchenden Gene multipliziert. Aus den drei biologischen Replikaten wurden absolute Expressionsmittelwerte und Standardabweichungen berechnet und diese in einem Balkendiagramm dargestellt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mithilfe der online Software NIA Array Analysis (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/index.html>) (Sharov et al. 2005), die auf der ANalysis Of VAriance (ANOVA) basiert. Die statistische Signifikanz wurde nach der False Discovery Methode (FDR) unter Verwendung folgender Einstellungen ermittelt: Error model "max (average, actual)", proportion of highest variance values to be removed before variance averaging "0.01", degrees of freedom for the Bayesian error model "10", Benjamini and Hochberg False discovery rate (FDR) threshold "0.05", zero mutations.

3. Ergebnisse

3.1. Bioinformatische Analysen

Um potentielle Cytochrome P450 und potentielle Redoxpartner der Cytochrome P450 in *B. megaterium* DSM319 zu identifizieren, wurden bioinformatische Analysen der genomischen Sequenz von *B. megaterium* DSM319 durchgeführt. Die Suche nach Cytochromen P450 im Genom von *B. megaterium* DSM319 führte zur Identifizierung von vier Genen, die für potentielle Cytochrome P450 kodieren. Die Suche nach potentiellen Redoxpartnern der Cytochrome lieferte ein potentielles Flavodoxingen, vier potentielle Ferredoxingene und drei potentielle Ferredoxin Reduktasegene. Alle identifizierten Gene – die Cytochrom P450 Gene, das Flavodoxingen, die Ferredoxingene und die Ferredoxin Reduktasegene – sind über das komplette Genom von *B. megaterium* DSM319 verteilt (Abb 3.1). Damit befindet sich keines der für potentielle Redoxpartner der Cytochrome P450 kodierenden Gene in der Nachbarschaft der Cytochrome P450.



Bacillus megaterium DSM319

5097447 bp

Abb. 3.1: Schematische Darstellung des *Bacillus megaterium* DSM319 Chromosoms und Verteilung der Cytochrom P450, Flavodoxin, Ferredoxin und Ferredoxin Reduktase Gene.

3.1.1. Untersuchung der Cytochrome P450

Untersuchung der abgeleiteten Proteinprimärstruktur der *B. megaterium* DSM319 Cytochrome P450

Die vier identifizierten Cytochrom P450 Gene konnten als CYP102A1 (P450 BM3), CYP106A1 (P450 BM1) sowie zwei neue Cytochrome P450 (CYP109E1 und CYP109A2) identifiziert werden. Bei CYP102A1 (P450 BM3) handelt es sich um das bisher am besten charakterisierte bakterielle Cytochrom P450 (Whitehouse et al. 2012). Da das Ziel dieser Arbeit die Identifizierung und Charakterisierung neuer Cytochrom P450 Systeme war, wurde CYP102A1 aus weiteren Studien ausgeschlossen. Für alle folgenden Untersuchungen wurden ausschließlich die drei anderen Cytochrome P450 berücksichtigt. Alle drei identifizierten Cytochrome P450 besitzen das stark konservierte Threonin in der I-Helix, Glutaminsäure und Arginin in dem konservierten EXXR Motiv der K-Helix sowie die Signatur des Häm-Bindemotivs, FxxGxHxCxG. CYP106A1 weist eine Sequenzidentität von 39% zu CYP109E1 und eine Sequenzidentität von 31% zu CYP109A2 auf. CYP109E1 und CYP109A2 besitzen eine Sequenzidentität von 43%. CYP106A1 besitzt eine Sequenzidentität von 63% zu zwei CYP106 aus *B. mucilaginosus* sowie zu CYP106A2 aus *B. megaterium* ATCC 13368. CYP109E1 weist Sequenzidentitäten von 58% und 60% zu Cytochromen P450 aus *B. macauensis* und *Paenibacillus elgii* sowie von 47% zu CYP109B1 und von 43% zu CYP109A1 aus *B. subtilis* auf. CYP109A2 besitzt mit Sequenzidentitäten von 58% bzw. 47% die größte Ähnlichkeit zu CYP109A1 bzw. CYP109B1 aus *B. subtilis*. Mit theoretischen Molekulargewichten von 47,6 kDa, 46,9 kDa und 49,3 kDa besitzen CYP106A1, CYP109E1 und CYP109A2 für Cytochrome P450 typische Molekulargewichte. Die berechneten isoelektrischen Punkte (pI) der drei Cytochrome P450 liegen mit 5,23 für CYP106A1, 5,33 für CYP109E1 und 5,55 für CYP109A2 jeweils im sauren Bereich.

Umgebung der *B. megaterium* DSM319 Cytochrom P450 Gene

Eine Herangehensweise, um mögliche Substrate und Funktionen der Cytochrome P450 zu identifizieren, besteht in der Analyse der benachbarten Gene der Cytochrome P450. Zudem können durch Analyse der benachbarten Gene potentielle natürliche Redoxpartner identifiziert werden, sofern die Cytochrome P450 in einem Gencluster oder einem Operon zusammen mit

Redoxpartnern oder Genen, die am Sekundärmetabolismus beteiligte Proteine wie z. B. Polyketidsynthasen (PKS) kodieren, organisiert sind. In der genomischen Umgebung von CYP106A1 (BMD_1855) befinden sich gegenläufig in 177 bp Entfernung zwei Gene (BMD_1854 und BMD_1853), die hypothetische Proteine unbekannter Funktion kodieren. Zudem sind Gene, die für ein CBS-Domänen Protein (BMD_1852), ein hypothetisches Protein (BMD_1851) sowie eine Aldose 1-Epimerase (BMD_1850) kodieren, upstream des CYP106A1 Gens zu finden. Downstream des CYP106A1 Gens befindet sich in gegenläufiger Orientierung in einem Abstand von 267 bp ein für ein Transkriptionsregulatorprotein der TetR Familie kodierendes Gen (BMD_1856) sowie das Xylose Operon bestehend aus den für den Xylose Repressor R, die Xylose Isomerase Xyl A, die Xylose Kinase Xyl B und die Xylose Permease Xyl I kodierenden Genen (BMD_1857-1860).

In der unmittelbaren Nachbarschaft von CYP109E1 (BMD_3874) befindet sich gegenläufig in 109 bp Entfernung ein Gen (BMD_3873), das für einen Transporter der HPP Familie kodiert, ein für einen transkriptionellen Regulator mit Helix-Turn-Helix-Motiv kodierendes Gen (BMD_3871), ein Gen (BMD_3870), das für eine Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase kodiert sowie zwei für hypothetische Proteine unbekannter Funktion kodierende Gene (BMD_3872 und BMD_3869). Downstream von CYP109E1 sind in gleicher Orientierung mit einem Abstand von 168 bp Gene vorhanden, welche für ein Protein der DoxX Familie unbekannter Funktion (BMD_3875), für ein Glykosyl Transferase Domänen Protein (BMD_3876), für eine Nukleotid Zucker Dehydrogenase (BMD_3877) sowie für eine Glykosyl Transferase (BMD_3878) kodieren.

In der genomischen Umgebung von CYP109A2 (BMD_2035) befinden sich in gegenläufiger Orientierung und 288 bp Entfernung Gene, welche für ein putatives Membranprotein (BMD_2034), eine Acetyltransferase (BMD_2032), eine N-Acetylmuramoyl-L-Ala-Amidase (BMD_2031) sowie für zwei hypothetische Proteine unbekannter Funktion kodierende Gene (BMD_2033 und BMD_2030). Downstream von CYP109A2 sind in zwar kurzer Distanz von 29 bp, jedoch in gegenläufiger Leserichtung für eine Malat-Dehydrogenase (BMD_2037) sowie für eine D-Serin-Dehydratase (BMD_2040) kodierende Gene zu finden. Die übrigen benachbarten Gene (BMD_2036, BMD_2038 und BMD_2039) kodieren für hypothetische Proteine unbekannter Funktion.

Zusammengefasst lieferte die Untersuchung der direkten genomischen Umgebung der Cytochrome P450 kodierenden Gene keine Hinweise auf potentielle natürliche Redoxpartner oder Substrate.

3.1.2. Untersuchung des Flavodoxins

Untersuchung der abgeleiteten Proteinprimärstruktur des *B. megaterium* DSM319 Flavodoxins

Fld weist Sequenzidentitäten von 56% bzw. 44% zu den Flavodoxinen YkuP und YkuN aus *B. subtilis* sowie von 45% bis 57% zu Flavodoxinen aus verschiedenen *Bacillus* Spezies auf. Bei Flavodoxinen handelt es sich um kleine, stark saure Elektronentransferproteine, welche aus 140 bis 180 Aminosäuren bestehen, Molekulargewichte von 13 kDa bis 23 kDa aufweisen und in short-chain und long-chain Flavodoxine unterteilt werden können (Sancho 2006). Das aus 152 Aminosäuren bestehende Fld aus *B. megaterium* besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 16,5 kDa und kann aufgrund des Fehlens des aus 20 Aminosäuren bestehenden, für long-chain Fld charakteristischen, Loops den short-chain Flavodoxinen zugeordnet werden. Mit einem berechneten isoelektrischen Punkt (pI) von 4,22 besitzt Fld aus *B. megaterium* zudem einen für Flavodoxine typischen, sehr sauren pI.

Umgebung des *B. megaterium* DSM319 Flavodoxins

Upstream des Flavodoxingens (BMD_4866) befinden sich in gleicher Leserichtung in 30 bp Entfernung für die Untereinheiten I und II der Cytochrom d Ubiquinol Oxidase kodierende Gene (BMD_4864 und BMD_4865). Zudem sind Gene zu finden, welche für ein 50S ribosomales Protein (BMD_4863), ein periplasmatisches Solut Bindeprotein (BMD_4862) sowie ein Cobalamin Synthese Protein (BMD_4861) kodieren. Die vier ORFs, die sich unmittelbar downstream des Flavodoxingens befinden (BMD_4876-4870), sind zwar nur 15 bp entfernt und liegen zum Teil gleich orientiert vor, kodieren jedoch für hypothetische Proteine unbekannter Funktion. Darauf folgen zwei Gene (BMD_4872 und BMD_4871), die für die Alpha- und Beta-Untereinheit der Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase kodieren.

3.1.3. Untersuchung der Ferredoxine

Untersuchung der abgeleiteten Proteinprimärstruktur der *B. megaterium* DSM319 Ferredoxine

Um Hinweise auf den Eisen-Schwefel-Cluster Typ der Ferredoxine zu erhalten, wurden die abgeleiteten Proteinprimärstrukturen der Ferredoxine Fdx1-4 mit der Pfam-Datenbank abgeglichen. Dabei wurde für Fdx1 ein [2Fe-2S]-Cluster vorhergesagt. Die Ferredoxine Fdx2, Fdx3 und Fdx4 wurden als Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine eingeordnet, welche jeweils einen [4Fe-4S]-Cluster enthalten. Ferredoxine sind kleine, saure Elektronentransferproteine mit Molekulargewichten von 6-24 kDa (Lovenberg 2003). Die Ferredoxine Fdx1-4 wiesen mit theoretischen Molekulargewichten von 11,7 kDa, 9,1 kDa, 8,9 kDa und 8,8 kDa für Ferredoxine typische Werte auf. Auch die pI-Werte von Fdx2-4 liegen mit 3,72, 3,69 und 3,94 wie für Ferredoxine zu erwarten im sauren Bereich, während Fdx1 mit einem Wert von 5,93 einen nur schwach sauren pI-Wert aufweist.

Umgebung der *B. megaterium* DSM319 Ferredoxine

In der genomischen Umgebung von Fdx1 (BMD_1901) befinden sich in gleicher Leserichtung mit 74 bp Entfernung zwei Gene (BMD_1900 und BMD_1897), die für hypothetische Proteine unbekannter Funktion kodieren. Neben Genen, die für ein Transportprotein (BMD_1899) bzw. ein putatives Lipoprotein (BMD_1898) kodieren befinden sich upstream von Fdx1 für eine Kupfer-transportierende P-Typ ATPase und ein Kupfer Chaperon kodierende Gene (BMD_1996 und BMD_1995). Downstream Fdx1 sind in relativ großem Abstand von 224 bp Gene vorhanden, deren Genprodukte als putatives Peptidoglykan-bindendes Protein (BMD_1902), als hypothetisches Protein unbekannter Funktion (BMD_1903) sowie als YibE/F-ähnliches Protein (BMD_1904) annotiert sind. Des Weiteren befinden sind Gene, die für einen transkriptionellen Regulator der ArsR Familie (BMD_1905) sowie ein Arsen Pumpenprotein (BMD_1906) kodieren, in räumlicher Nähe zu Fdx1.

Upstream von Fdx2 (BMD_2329) sind in gleicher Orientierung in 37 bp Entfernung Gene vorhanden, die für ein Pyridoxin Biosynthese Protein (BMD_2328), eine Alkohol-Dehydrogenase (BMD_2327), eine Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase (BMD2326), ein Protein

der Kurzketten Dehydrogenase/Reduktase Familie (BMD_2325) und eine Acyl-CoA Dehydrogenase (BMD_2324) kodieren. Downstream von Fdx2 befinden sich in gleicher Leserichtung, jedoch mit 224 bp Entfernung, Gene, deren Genprodukte als hypothetisches Protein unbekannter Funktion (BMD_2330) sowie als die Untereinheiten A und B einer Succinyl-CoA:3-Ketosäuren-Coenzym A Transferase (BMD_2331 und BMD_2332) annotiert sind. Zudem befinden sich zwei Gene, die eine Acetyl-Coenzym A Acetyltransferase (BMD_2333) und eine Aminotransferase (BMD_2334) downstream von Fdx2.

Upstream von Fdx3 (BMD_4349) befindet sich gegenläufig ein Gen, das ein hypothetisches Protein unbekannter Funktion (BMD_4348) kodiert und mit einem Abstand von 262 bp sehr weit von Fdx3 entfernt ist. Die beiden folgenden, ebenfalls gegenläufig angeordneten Gene kodieren für eine ATP-abhängige DNA-Helikase (BMD_4347) und eine Protease (BMD_4346). Downstream von Fdx3 ist gegenläufig mit einem Abstand von 78 bp ein Gen vorhanden, das eine FMN-Permease (BMD_4350) kodiert. Zudem befinden sich Gene, deren Genprodukte als D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenase (BMD_4351) und Peptidase (BMD_4352) annotiert sind, gefolgt von einem Operon zur Cytochrom *c* Biogenese (BMD_4353-4357).

Die unmittelbar an Fdx4 (BMD_0889) angrenzenden Gene weisen die gleiche Leserichtung auf und kodieren ABC Transporterproteine (BMD_0888-0886). Downstream von Fdx4 befinden sich in gegenläufiger Orientierung mit einem Abstand von 405 bp Gene, die ein Protein mit 6-Phospho-3-Hexuloseisomerase Domäne (BMD_0890), eine 3-Hexulose-6-Phosphatase Synthase (BMD_0892) sowie einen transkriptionellen HTP-Typ Aktivator (BMD_0892) kodieren.

3.1.4. Untersuchung der Ferredoxin Reduktasen

Untersuchung der abgeleiteten Proteinprimärstruktur der *B. megaterium* DSM319 Ferredoxin Reduktasen

Die drei potentiellen Ferredoxin Reduktasen wurden als NADH-abhängige Flavin Oxidoreduktase bzw. FAD/FMN bindende Oxidoreduktase annotiert. Mittels der Pfam-Datenbank wurden die abgeleiteten Proteinprimärstrukturen der Ferredoxin Reduktasen auf

die Existenz konservierter Domänen untersucht. Alle drei Proteine weisen eine NAD(P)H-Bindedomäne sowie eine FAD/FMN-Bindedomäne auf, welche charakteristisch für Ferredoxin Reduktasen sind. Mit theoretischen Molekulargewichten von 43,1 kDa, 37,6 kDa und 55,1 kDa weisen FdR1, FdR2 und FdR3 für Ferredoxin Reduktasen typische Größen auf wie die der Ferredoxin Reduktasen aus Spinat (35,3 kD, (Karplus et al. 1984)), dem Rind (50,3 kD (Sagara et al. 1993)) oder *Mycobacterium tuberculosis* (49,3 kD, (McLean et al. 2003)). Auch die theoretischen isoelektrischen Punkte von 5,03, 5,56 und 5,41 sind ähnlich zu den Werten anderer Ferredoxin Reduktasen wie z. B. der Ferredoxin Reduktase FdRA aus *Sorangium cellulosum* So ce56 (6,01 (Ewen et al. 2009)).

Umgebung der *B. megaterium* DSM319 Ferredoxin Reduktasen

Die FdR1 (BMD_3933) umgebenden Gene weisen zwar die gleiche Leserichtung auf wie FdR1, sind mit 154 bp bzw. 156 bp jedoch relativ weit entfernt. Die Gene upstream von FdR1 kodieren für ein integrales Membranprotein (BMD_3932), ein Cupin-Domänen Protein (BMD_3931) sowie eine Sulfatase (BMD_3930). Die unmittelbar downstream an FdR-2493 angrenzenden Gene kodieren für hypothetische Proteine unbekannter Funktion (BMD_3934, BMD_3935 und BMD_3937) und eine GABA Permease (BMD_3936).

Upstream des FdR2 (BMD_4401) kodierenden Gens befindet sich in gleicher Orientierung mit einem Abstand von 140 bp ein Pyrrolin-5-Carboxylat Reduktase kodierendes Gen (BMD_4400) und Gene, die für ein Metallo-beta-Lactamase Protein (BMD_4399) und eine Oxidoreduktase (BMD_4398) kodieren. Unmittelbar downstream grenzt mit geringem Abstand von 34 bp, jedoch in gegenläufiger Leserichtung, ein für eine Ribonuklease kodierendes Gen (BMD_4402), gefolgt von einer Aminotransferase (BMD_4403) und einer Methylmalonat-Semialdehyd Dehydrogenase (BMD_4404).

In direkter Nachbarschaft von FdR3 (BMD_4410) sind in gleicher Orientierung und einer geringen Distanz von 24 bp Gene vorhanden, die eine Dihydroorotat Dehydrogenase (BMD_4409) und eine Dihydropyrimidinase (BMD_4408) kodieren. Des Weiteren befinden sich unmittelbar upstream in gleicher Orientierung mit einer Entfernung von 87 bp Gene, die eine Peptidase (BMD_4411), eine Carboxyl Transferase (BMD_4412) sowie eine Methylmalonyl-CoA Epimerase (BMD_4413) kodieren.

Insgesamt konnten durch Analyse der genomischen Umgebung der Gene, die für potentielle Redoxpartner (Flavodoxin, Ferredoxine, Ferredoxin Reduktasen) der Cytochrome P450 kodieren, keine Hinweise auf die physiologische Funktion der Redoxproteine erhalten werden.

3.2. Klonierung, Expression und Reinigung von Proteinen

In der unmittelbaren Nachbarschaft der für potentielle Cytochrome P450 kodierenden Gene konnten keine Gene identifiziert werden, die mögliche Redoxpartner der Cytochrome kodieren. Zudem sind alle Gene, die potentielle Redoxpartner der Cytochrome P450 kodieren, über das ganze Genom von *B. megaterium* DSM319 verteilt und keines davon befindet sich in räumlicher Nähe zu den Cytochrom P450 Genen. Daher war es nicht möglich, die an den Cytochrom P450 Systemen beteiligten Redoxproteine anhand des genomischen Kontextes vorherzusagen. Infolgedessen sollten alle Gene, die für Cytochrome P450 und deren putative Redoxpartner kodieren, kloniert und die jeweiligen Proteine überexprimiert und gereinigt werden.

Alle in *B. megaterium* DSM319 identifizierten Gene, welche für potentielle Cytochrome P450 (außer CYP102A1) und potentielle Redoxpartner der Cytochrome P450 kodieren, wurden aus genomischer DNA von *B. megaterium* MS941 amplifiziert und mit einem C-terminalen „His₆-tag“ in *E. coli* Expressionsvektoren kloniert. Die Cytochrome P450 CYP106A1, CYP109E1 und CYP109A2, das Flavodoxin Fld, die vier Ferredoxine Fdx1, Fdx2, Fdx3 und Fdx4 und die Ferredoxin Reduktasen FdR1 und FdR2 wurden in *E. coli* C43 (DE3) Zellen exprimiert. Die Expression der Ferredoxin Reduktase FdR3 erfolgte in *E. coli* BL21 Zellen. Alle Proteine wurden mittels Immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die Reinheit der heterolog exprimierten Proteine wurde mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.2 und Abb 3.3).

Die Cytochrome P450 wanderten in der SDS-PAGE minimal oberhalb der 45 kDa Bande des Markers, was sehr gut mit den theoretischen Molekulargewichten von 47,6 kDa, 46,9 kDa und 49,3 kDa (bzw. 48,4 kDa, 47,7 kDa und 50,1 kDa mit His₆-tag) übereinstimmt. Fld erscheint, entsprechend des theoretischen Molekulargewichts von 16,5 kDa (bzw. 17,4 kDa mit His₆-tag), in der SDS-PAGE zwischen den 15 kDa und 25 kDa Banden des Markers. Auch Fdx1 wanderte in guter Übereinstimmung mit dem berechneten Molekulargewicht von 11,7 kDa

(bzw. 12,5 kDa mit His₆-tag) zwischen den 10 kDa und 15 kDa Banden des Markers. Die tatsächlichen Größen von Fdx2, Fdx3 und Fdx4 wichen mit einer Wanderung zwischen den 15 und 25 kDa Banden des Markers jedoch stark von den theoretischen Molekulargewichten 9,1 kDa, 8,9 kDa und 8,8 kDa (bzw. 10,0 kDa, 9,7 kDa und 9,7 kDa mit His₆-tag) ab. Daraus lässt sich vermuten, dass Fdx2, Fdx3 und Fdx4 als Dimere vorliegen. FdR1 wanderte entsprechend des theoretischen Molekulargewichts von 43,1 kDa (bzw. 43,9 kDa mit His₆-tag) etwas unterhalb der 45 kDa Bande des Markers. Auch FdR2 erscheint, in Übereinstimmung mit dem theoretischen Molekulargewicht von 37,6 kDa (bzw. 38,4 kDa mit His₆-tag), in der SDS-PAGE minimal oberhalb der 35 kDa Bande des Markers. FdR3 befindet sich, abweichend zu einem berechneten Molekulargewicht von 55,1 kDa (bzw. 55,9 kDa mit His₆-tag), auf Höhe der 45 kDa Bande.

Somit konnten alle aus *B. megaterium* DSM319 stammenden Gene erfolgreich in löslicher Form gereinigt werden.

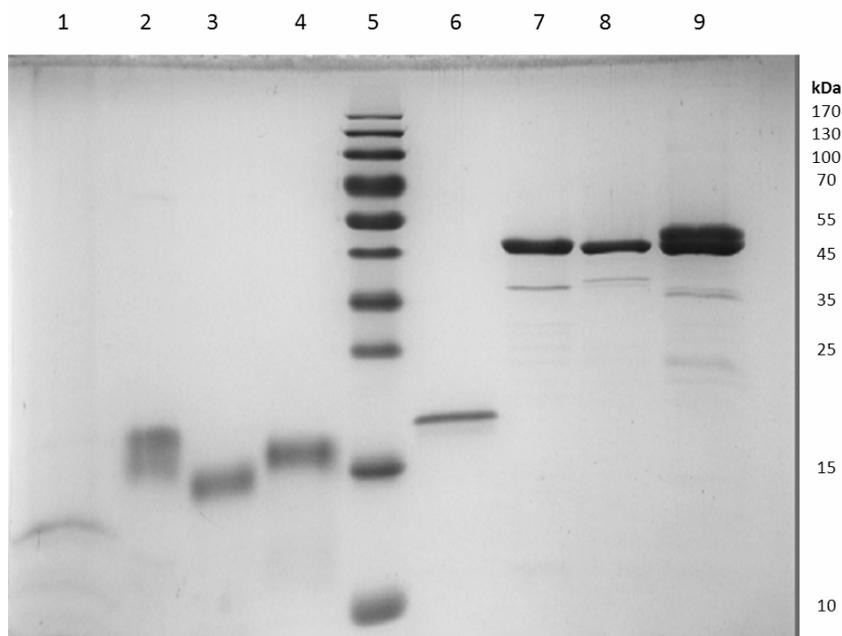


Abb. 3.2: SDS-PAGE (15%) der gereinigten *Bacillus megaterium* DSM319 Ferredoxine, des Flavodoxins und der Cytochrome P450. 1: Fdx1; 2: Fdx2; 3: Fdx3; 4: Fdx4; 5: peqGOLD Protein-Marker IV (peqLab); 6: Fld; 7: CYP106A1; 8: CYP109E1; 9: CYP109A2.

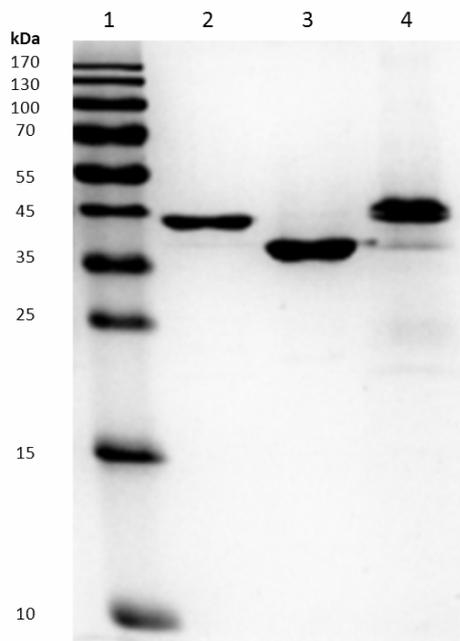


Abb. 3.3: SDS-PAGE (15%) der gereinigten *Bacillus megaterium* DSM319 Ferredoxin Reduktasen. 1: peqGOLD Protein-Marker IV (peqLab); 2: FdR1; 3: FdR2; 4: FdR3.

Die Bestimmung der Konzentrationen der gereinigten Cytochrome P450 erfolgte mittels CO-Differenzspektroskopie anhand $\Delta A (450\text{nm}-490\text{nm}) = 91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ nach der Methode von Omura und Sato (Omura and Sato 1964a). Um die Konzentrationen des Flavodoxins und der Ferredoxine zu bestimmen, mussten zuerst die molaren Extinktionskoeffizienten an den charakteristischen Maxima der entsprechenden Proteine ermittelt werden. Dazu wurde die Gesamteproteinkonzentration der gereinigten Proben mit Hilfe des BC Assays bestimmt. Unter der Annahme, dass die Gesamteproteinkonzentration der gereinigten Probe der Konzentration des jeweiligen *B. megaterium* Proteins entspricht, wurde mit Hilfe des theoretischen Molekulargewichtes der molare Extinktionskoeffizient für eine Wellenlänge bestimmt, bei der das jeweilige Protein ein charakteristisches Absorptionsmaximum besitzt. Zudem wurde der Reinheitsgrad der jeweiligen Proteine anhand des Q-Wertes, des Quotienten aus den Absorptionswerten an den charakteristischen Absorptionsmaxima und den die allgemeine Proteinabsorption reflektieren Absorptionswerten bei 276 nm, ermittelt. Im Falle der Ferredoxin Reduktasen wurde für das Maximum bei etwa 450 nm jeweils ein Extinktionskoeffizient ϵ von $10000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ angenommen. Die Ausbeuten der gereinigten Proteine, die molaren Extinktionskoeffizienten sowie die Q-Werte der jeweiligen Proteine sind in Tabelle 3.2.1 dargestellt.

Tab. 3.2.1: Überblick über die Ausbeute und die spektrale Charakterisierung der in *E. coli* heterolog exprimierten *B. megaterium* Proteine.

Protein	Ausbeute [nmol L ⁻¹]	Molarer Extinktionskoeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Q-Wert
CYP106A1	5350	91000 (Omura und Sato 1964)	$A_{417\text{nm}} / A_{276\text{nm}} = 1,6 - 1,8$
CYP109E1	4090	91000 (Omura und Sato 1964)	$A_{417\text{nm}} / A_{276\text{nm}} = 1,6 - 1,8$
CYP109A2	3482	91000 (Omura und Sato 1964)	$A_{417\text{nm}} / A_{276\text{nm}} = 1,6 - 1,8$
Fld	5733	$\epsilon_{460\text{nm}} = 6718$	$A_{460\text{nm}} / A_{276\text{nm}} = 0,25 - 0,30$
Fdx1	1519	$\epsilon_{414\text{nm}} = 4283$	$A_{414\text{nm}} / A_{276\text{nm}} = 0,45 - 0,55$
Fdx2	3052	$\epsilon_{390\text{nm}} = 6671$	$A_{390\text{nm}} / A_{276\text{nm}} = 0,55 - 0,65$
Fdx3	3592	$\epsilon_{390\text{nm}} = 7272$	$A_{390\text{nm}} / A_{276\text{nm}} = 0,55 - 0,65$
Fdx4	1392	$\epsilon_{390\text{nm}} = 6471$	$A_{390\text{nm}} / A_{276\text{nm}} = 0,40 - 0,55$
FdR1	4694	$\epsilon_{459\text{nm}} = 10000$	$A_{280\text{nm}} / A_{459\text{nm}} = 5,5 - 6,0$
FdR2	5088	$\epsilon_{458\text{nm}} = 10000$	$A_{280\text{nm}} / A_{458\text{nm}} = 5,5 - 6,0$
FdR3	1551	$\epsilon_{447\text{nm}} = 10000$	$A_{280\text{nm}} / A_{447\text{nm}} = 5,5 - 6,0$

3.3. Spektroskopische Charakterisierung

Wie unter 3.2 beschrieben wurde die UV/Vis-Spektroskopie zum einen dazu verwendet, die Reinheit der Proteinpräparationen zu überprüfen und die molaren Extinktionskoeffizienten der gereinigten Proteine für charakteristische Absorptionsmaxima zu bestimmen. Zum anderen können die gereinigten Proteine mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie hinsichtlich ihrer Absorptionsspektren untersucht und charakterisiert werden. Zudem ermöglicht es die UV/Vis-Spektroskopie, Hinweise bezüglich des Redoxstatus eines Proteins bzw. im Falle der Ferredoxine bezüglich der Art der inkorporierten Eisen-Schwefel-Cluster zu erhalten.

3.3.1. Cytochrome P450

Die gereinigten Proteine CYP106A1, CYP109E1 und CYP109A2 waren intensiv rot gefärbt. CYP106A1 wies dabei Maxima bei 356 nm, 417 nm, 534 und 568 nm auf (Abb. 3.4). CYP109E1 zeigte Maxima bei 361 nm, 417 nm, 534 nm und 569 nm, während CYP109A2 lokale Maxima bei 355 nm, 417 nm, 533 und 565 nm aufwies (Abb. 3.4). Damit besaßen alle gereinigten Proteine die für oxidierte Cytochrome P450 typische Soret-Bande (γ -Bande) bei 417 nm, die α -Bande bei 533-534 nm und die β -Bande bei 565-569 nm. Die reduzierten und CO-gebundenen Formen aller drei Cytochrome P450 zeigten einen charakteristischen Peak bei 450 nm (Abb. 3.5). Dabei konnte für keines der Cytochrome P450 ein Peak bei 420 nm beobachtet werden, so dass für keines der Cytochrome P450 Hinweise für die inaktive P420 Form vorlagen (Abb. 3.5).

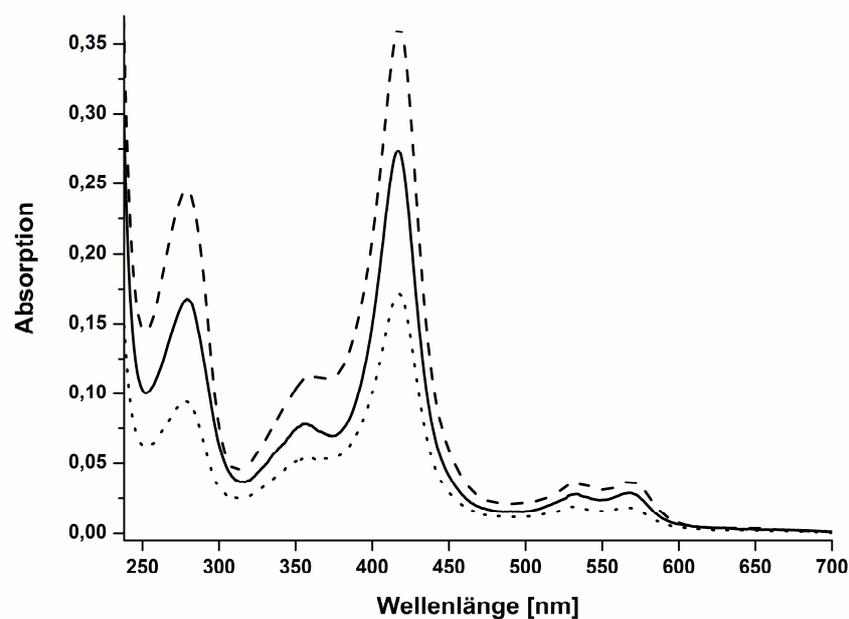


Abb. 3.4: UV/vis-spektroskopische Charakterisierung der Cytochrome P450. Die gereinigten Proteine CYP106A1 (kompakte Linie), CYP109E1 (gestrichelte Linie) und CYP109A2 (gepunktete Linie) wiesen die für oxidierte Cytochrome P450 typischen Peaks auf.

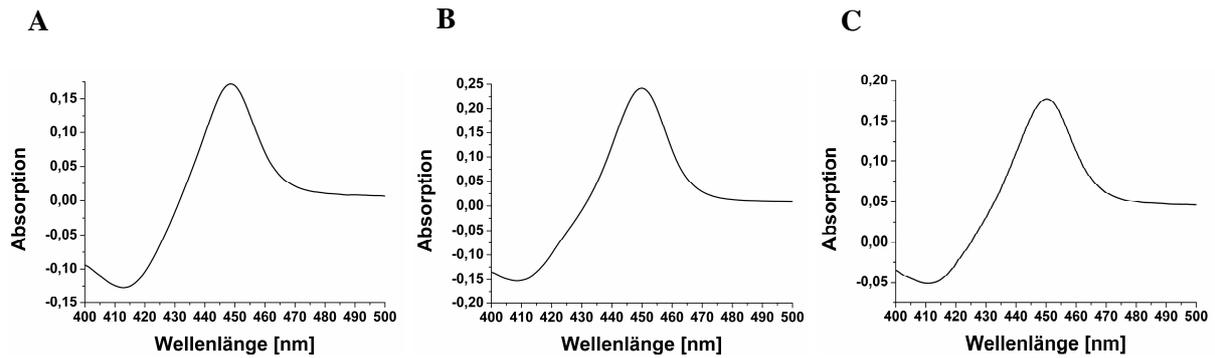


Abb. 3.5: CO-Differenzspektren der Cytochrome P450. Die reduzierten und CO-gebundenen Formen der Cytochrome P450 CYP106A1 (A), CYP109E1 (B) und CYP109A2 (C) zeigten einen charakteristischen Peak bei 450 nm, wobei keine Hinweise für die inaktive P420 Form vorlagen.

3.3.2. Flavodoxin

Die Expression von Fld resultierte in blauen Zellpellets sowie in einem blau-grauen Lysat, was andeutete, dass Fld in der Semichinonform vorlag (Abb. 3.6). Bei der Elution des Fld von der IMAC-Säule veränderte sich die Farbe des Fld zu grün, welche auch während der Größenausschlusschromatographie, der Konzentrierung und der Lagerung unverändert blieb. Das reine Protein zeigte Maxima bei 377 nm und 460 nm, eine Schulter bei 482 nm sowie eine breite Absorptionsbande von 550 nm bis 650 nm, welche charakteristisch für die Semichinonform ist (Abb. 3.6). Die Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat ($C_6FeK_4N_6$), gefolgt von der Konzentrierung zur Entfernung des Kaliumhexacyanoferrats aus der Fld Lösung, führte zu einem Verlust der Absorptionsbande von 550 nm bis 650 nm, wobei es sich um ein Anzeichen für die Oxidation des Fld Semichinons zu der vollständig oxidierten gelb gefärbten Chinonform handelt (Abb. 3.6). Diese Chinonform war notwendig, um den molaren Extinktionskoeffizienten des Fld an dem charakteristischen Maximum bei 460 nm zu bestimmen. Die Zugabe der Reduktase Arh1 aus *S. pombe* veränderte das UV/Vis-Spektrum des Fld Semichinons nicht und war deshalb geeignet, um die Reduktion des Flavin Chromophors zu verfolgen. Durch die Zugabe von NADPH konnte ein Abfall der Absorption bei 460 nm und ein Anstieg der Absorption bei 593 und 640 nm beobachtet werden. Diese Absorptionsänderungen zeigten die Reduktion des Flavin Semichinons zu der vollständig reduzierten Hydrochinonform an (Abb. 3.6).

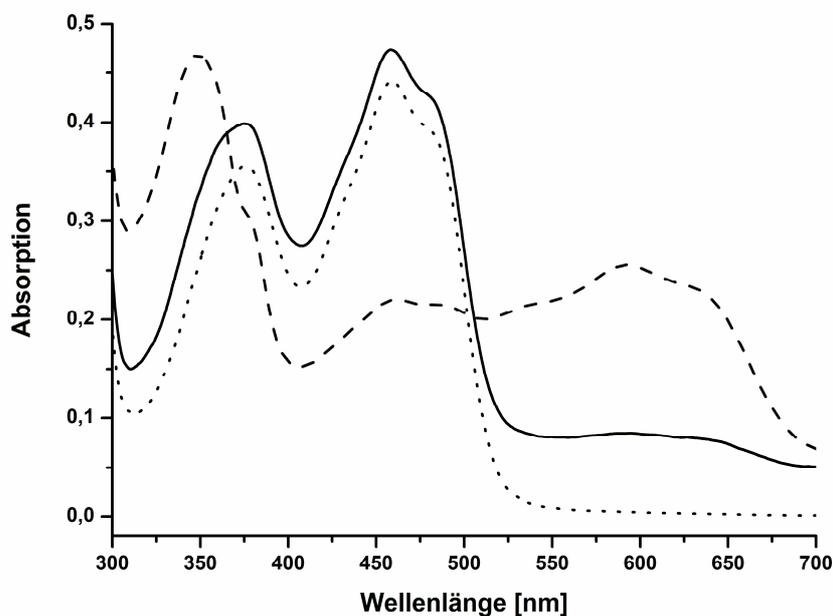


Abb. 3.6: UV/vis-Absorptionsspektren des Flavodoxins Fld. Fld wurde in der Semichinon-Form gereinigt (kompakte Linie) und konnte zur Hydrochinon-Form (gestrichelte Linie) reduziert und zur Chinon-Form (gepunktete Linie) oxidiert werden.

3.3.3. Ferredoxine

Das gereinigte Ferredoxin Fdx1 war rot-braun gefärbt und wies Maxima bei 317 nm, 414 nm und 456 nm auf (Abb. 3.7), welche charakteristisch für [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine sind (Grinberg et al. 2000). Fdx1 besitzt damit ein Absorptionsspektrum, das sehr ähnlich ist zu bekannten, an Cytochrom P450 Systemen beteiligten [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen wie Adx (Maxima 320 nm, 414 nm und 455 nm (Uhlmann und Bernhardt 1995)) und Pdx (Maxima bei 325 nm, 415 nm und 455 nm (Tyson et al. 1972)).

Die gereinigten Ferredoxine Fdx2, Fdx3 und Fdx4 waren grün-braun gefärbt und zeigten breite Absorptionsmaxima von 390 nm bis 400 nm (Abb. 3.8), woraus sich ableiten lässt, dass es sich bei Fdx2, Fdx3 und Fdx4 um Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine handelt. Jedoch kann anhand der UV/Vis-Spektren nicht zwischen [3Fe-4S]-Cluster, [4Fe-4S]-Cluster oder Dicluster Ferredoxinen (bestehend aus einem [3Fe-4S]- und einem [4Fe-4S]-Cluster oder zwei [4Fe-4S]-Clustern) unterschieden werden (Sticht und Rösch 1998).

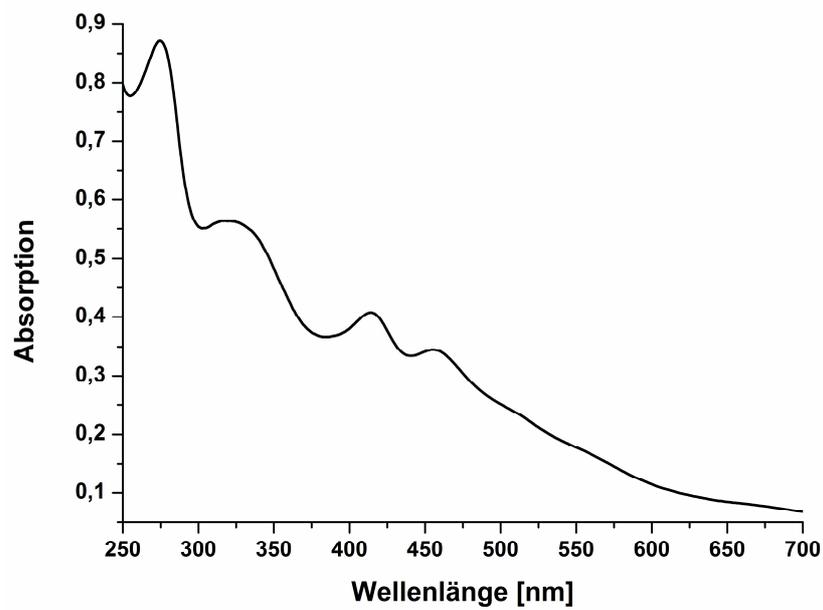


Abb. 3.7: UV/vis-Absorptionsspektrum des Ferredoxins Fdx1. Fdx1 wies Maxima bei 317 nm, 414 nm und 456 nm auf, welche typisch für [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine sind.

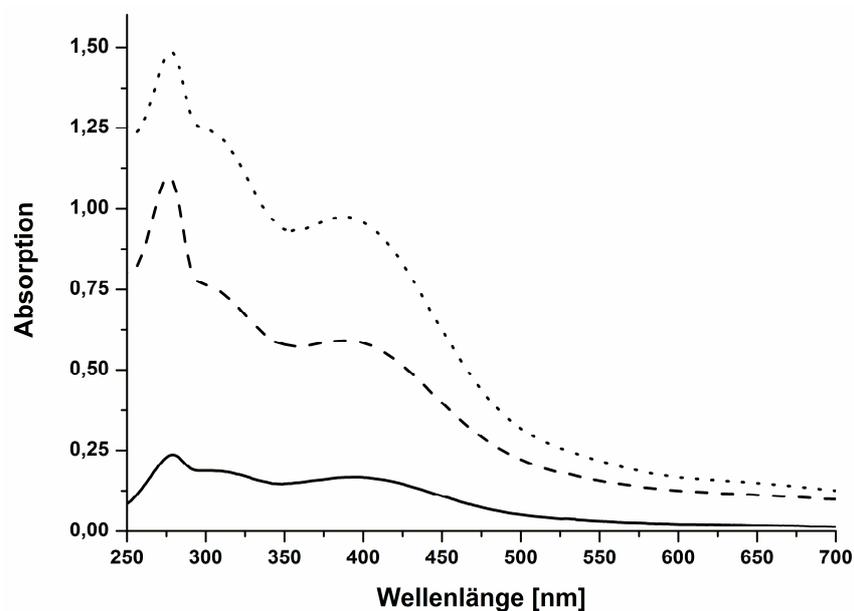


Abb. 3.8: UV/vis-Absorptionsspektren der Ferredoxine Fdx2, Fdx3 und Fdx4. Die drei [3Fe-4S]- oder [4Fe-4S]-Cluster Ferredoxine Fdx2 (gepunktete Linie), Fdx3 (kompakte Linie) und Fdx4 (gestrichelte Linie) zeigten breite Maxima von 390 nm bis 400 nm, die charakteristisch für diesen Typ von Ferredoxinen sind.

3.3.4. Ferredoxin Reduktasen

Die drei gereinigten Ferredoxin Reduktasen waren, wie für oxidierte Ferredoxin Reduktasen zu erwarten, gelb gefärbt. FdR1 (Abb. 3.9 A) und FdR2 (Abb. 3.9 B) wiesen mit lokalen Maxima bei 375 bzw. 373 nm und 459 bzw. 458 nm sowie einer Schulter bei 483 bzw. 484 nm große Ähnlichkeiten auf. FdR3 (Abb. 3.9 C) zeigte lokale Maxima bei 379 und 447 nm sowie eine Schulter bei 477 nm. Damit stimmten die UV/vis-Absorptionsspektren der *B. megaterium* Ferredoxin Reduktasen sehr gut mit bekannten, Cytochrom P450 assoziierten Ferredoxin Reduktasen wie der Putidaredoxin Reduktase (Maxima bei 379 und 455 nm, Schulter bei 480 nm (Sevrioukova und Poulos 2002)) oder der Adrenodoxin Reduktase (Maxima bei 376 und 450 nm, Schulter bei 475 nm (Sagara et al. 1993)) überein.

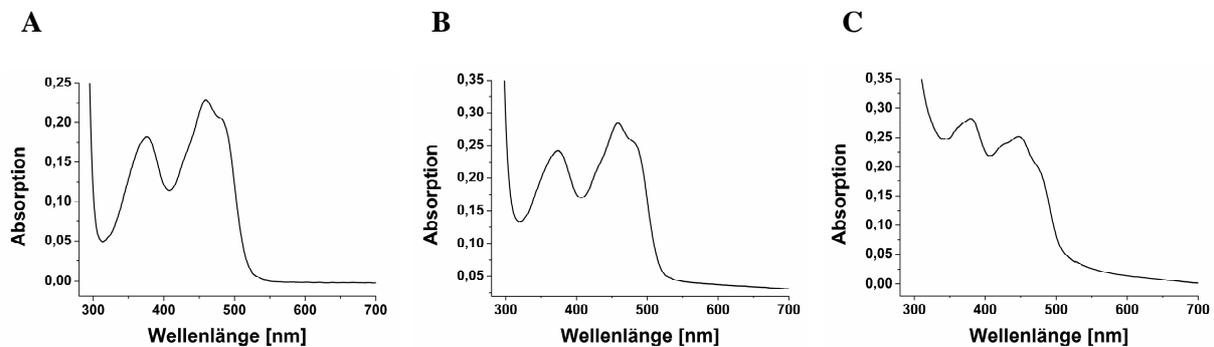


Abb. 3.9: UV/vis-spektroskopische Charakterisierung der Ferredoxin Reduktasen. Die gereinigten Proteine FdR1 (A), FdR2 (B) und FdR3 (C) wiesen die für Ferredoxin Reduktasen typischen Peaks auf.

3.4. Typ I-Differenzspektroskopie und Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D

Um potentielle Substrate der Cytochrome P450 zu identifizieren, wurden verschiedene Substanzen auf ihre Fähigkeit, im aktiven Zentrum der Cytochrome P450 zu binden, untersucht. Solch eine Bindung führt meist zu der Verdrängung des axialen Wassers von der sechsten Koordinationsstelle des Häm-Eisens, was wiederum in einem Übergang vom sechsfachkoordinierten low-spin Zustand zum fünffachkoordinierten high-spin Zustand

resultiert. Dieser high-spin Zustand ist durch ein Absorptionsmaximum bei etwa 390 nm und ein Absorptionsminimum bei etwa 420 nm gekennzeichnet und kann zur Identifizierung von potentiellen Substraten herangezogen werden. Als potentielle Substrate der Cytochrome P450s wurden zunächst Substanzen getestet, die schon für andere Cytochrome der CYP106 und CYP109 Familien bekannt sind sowie Strukturanaloga dieser Substanzen.

3.4.1. CYP106A1

Als potentielle Substrate von CYP106A1 wurden die Steroide Progesteron, Pregnenolon, Testosteron, Androstendion, 11-Desoxycorticosteron (DOC), Corticosteron (B), 11-Desoxycortisol (Reichenstein's Substanz S, RSS) und 4-Cholesten-3-on (Cholestenon) sowie die pentazyklische Triterpensäure 11-Keto- β -Boswelliasäure (KBA) und die Diterpensäure Abietinsäure getestet (Abb. 3.10), welche Substrate des nahe verwandten CYP106A2 darstellen. Unter den getesteten Steroiden induzierte Cholestenon keinen TypI-Shift, wohingegen durch Progesteron, Pregnenolon, Testosteron, Androstendion, DOC, Corticosteron und RSS die Induktion eines Typ I-Shifts in CYP106A1 hervorgerufen wurde (Abb. 3.11). Auch die Triterpensäure KBA induzierte einen high-spin Shift (Abb. 3.11), während durch die Diterpensäure Abietinsäure kein TypI-Shift induziert werden konnte.

Die Typ I-Differenzspektroskopie kann auch zur Berechnung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_D) herangezogen werden (Podust et al. 2007), welche als Maß für die Bindungsaffinität der Substanz zu dem Cytochrom P450 gilt. Durch Titration von CYP106A1 mit steigenden Mengen der entsprechenden Substanzen (Abb. 3.11) und nachfolgender Auftragung der Differenzen der Absorptionen ($\Delta A: A_{\max} - A_{\min}$) gegen die eingesetzten Substanz-Konzentrationen (Abb. 3.12) konnten diese K_D -Werte berechnet werden. Die durch Pregnenolon und Corticosteron induzierten Typ I-Shifts waren so schwach ausgeprägt, dass keine Titration und somit keine Bestimmung des K_D -Wertes möglich war. Die nach mathematischer Regression berechneten K_D -Werte und Regressionskoeffizienten sind Tabelle 3.4.1 zu entnehmen. Für Progesteron, Testosteron, Androstendion, DOC und RSS folgten die Daten einer hyperbolischen Regression (Abb. 3.12). Im Falle der KBA lag hingegen eine sigmoidale Regression gemäß der Hill-Gleichung mit einer Hill Konstanten (n) von $1,46 \pm 0,02$ vor (Abb. 3.12), woraus geschlossen werden kann, dass KBA ein positiv kooperatives Bindungsverhalten gegenüber CYP106A1 aufweist.

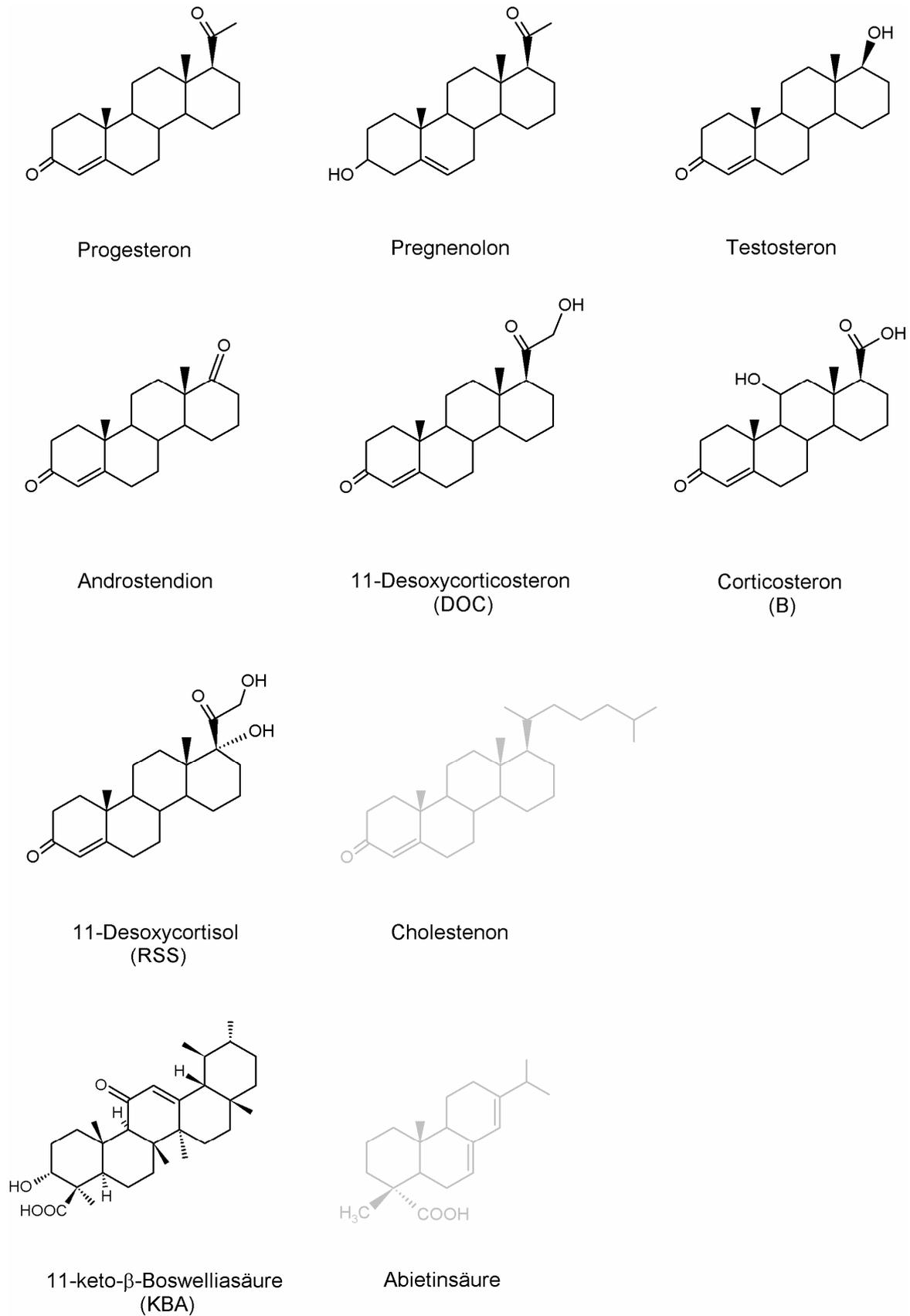


Abb. 3.10: Strukturformeln der Substanzen, die als potentielle Substrate von CYP106A1 getestet wurden. Die Substanzen, die einen TypI-Shift in CYP106A1 induzierten, sind in schwarz dargestellt. Die Substanzen, die keinen TypI-Shift induzierten, sind grau dargestellt.

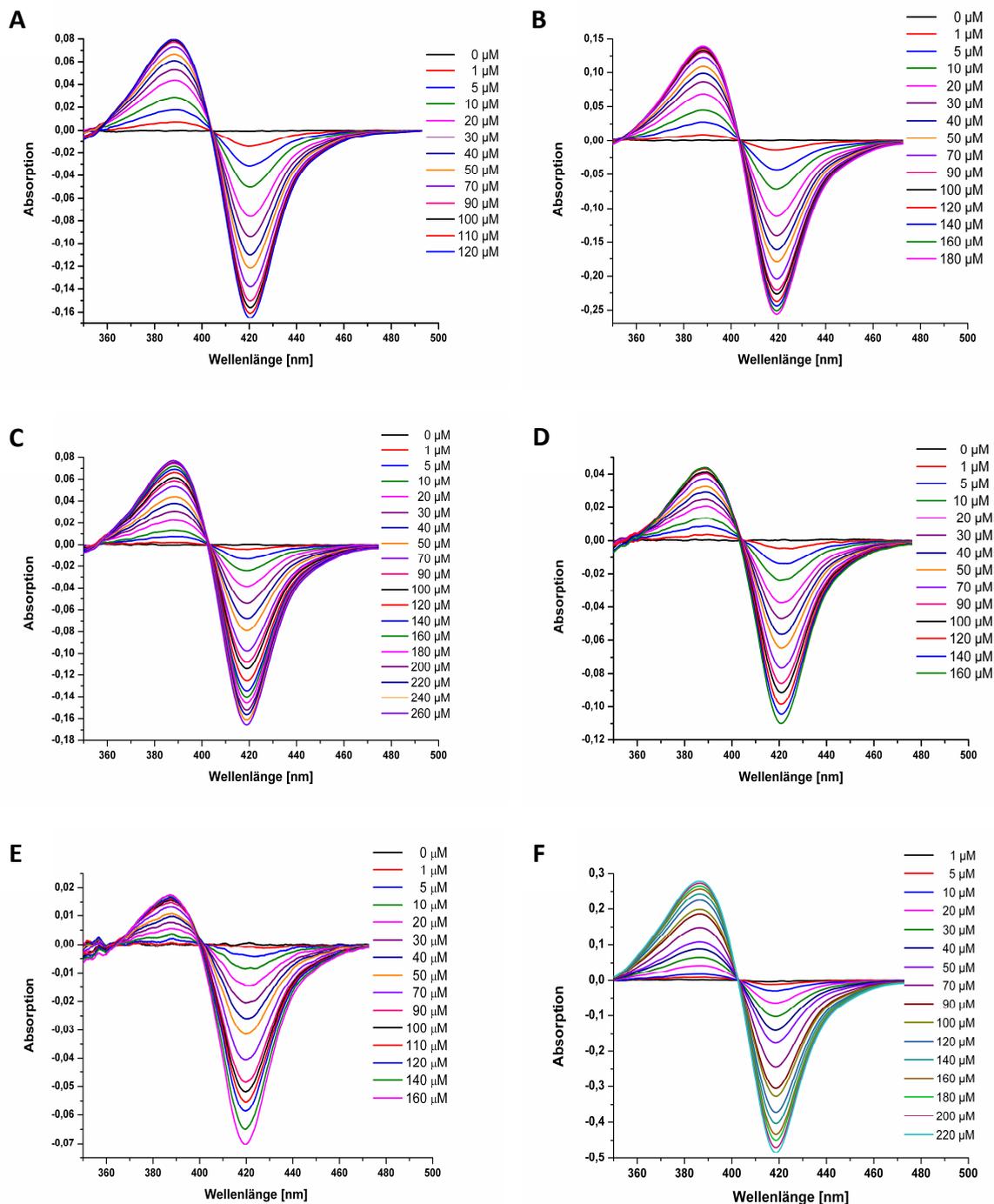


Abb. 3.11: Durch die Bindung von Progesteron (A), Testosteron (B), Androstendion (C), DOC (D), RSS (E) und KBA (F) an CYP106A1 wurde ein Typ I-Shift induziert. 10 μM CYP106A1 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 wurde mit steigenden Mengen an Progesteron (0-120 μM), Testosteron (0-180 μM), Androstendion (0-260 μM), DOC (0-160 μM), RSS (0-160 μM) und KBA (0-220 μM) titriert.

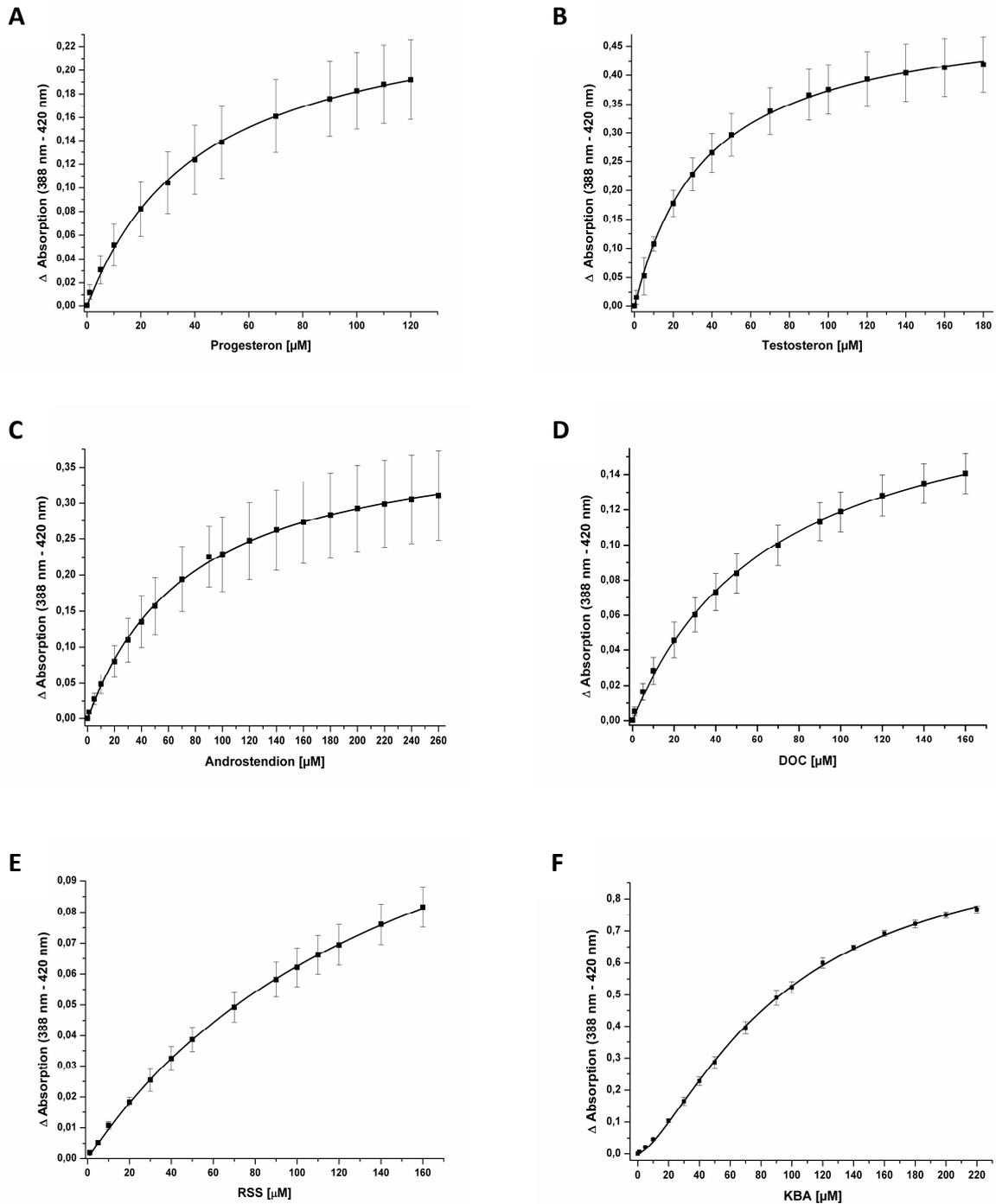


Abb. 3.12: Die Differenzen zwischen dem Maximum und dem Minimum wurden gegen die entsprechenden Progesteron- (A), Testosteron- (B), Androstendion- (C), DOC- (D), RSS- (E) und KBA-Konzentrationen (F) aufgetragen und die Daten durch hyperbolische (A-E) bzw. sigmoidale Regression (F) ausgewertet. Jede Titration wurde in Triplikaten durchgeführt und die jeweiligen Mittelwerte wurden bestimmt.

Tab. 3.4.1: Überblick über die K_D -Werte und Regressionskoeffizienten der Substanzen, die einen Typ I-Shift in CYP106A1 induzierten.

Substanz	K_D -Wert [μM]	Regressionskoeffizient R^2
Progesteron	$43,22 \pm 1,90$	0,998
Testosteron	$37,17 \pm 0,86$	0,999
Androstendion	$76,97 \pm 1,83$	0,999
DOC	$68,11 \pm 2,42$	0,999
RSS	$160,83 \pm 4,71$	0,999
KBA	$92,25 \pm 2,89$	0,999

3.4.2. CYP109E1

Als potentielle Substrate von CYP109E1 wurden Isolongifolen-9-on, Nootkaton, Testosteron und Vitamin D3 (Abb. 3.13) getestet. Unter den getesteten Substanzen induzierten Isolongifolen-9-on, Nootkaton und Testosteron einen TypI-Shift, gekennzeichnet durch ein Maximum bei etwa 380 bis 390 nm und ein Minimum bei etwa 420 nm (Abb. 3.14A-C). Im Falle von Vitamin D3 zeigte sich zwar auch ein Minimum bei etwa 420 nm, jedoch ein Maximum bei 468 nm (Abb. 3.14D). Dieses Spektrum konnte keinem der bisher bekannten Bindungsspektren zugeordnet werden. Es kann jedoch festgehalten werden, dass Vitamin D3 nicht in der Lage war, einen high-spin Shift in CYP109E1 hervorzurufen und daher an dieser Stelle nicht weiter spektroskopisch untersucht wurde.

Zur Bestimmung des K_D -Wertes wurde CYP109E1 mit steigenden Mengen an Nootkaton, Isolongifolen-9-on und Testosteron titriert und die Differenzen der Absorptionswerte (ΔA : $A_{\max} - A_{\min}$) gegen die eingesetzten Substanz-Konzentrationen (Abb. 3.15) aufgetragen. Die nach hyperbolischer Regression erhaltenen K_D -Werte und Regressionskoeffizienten sind in Tab. 3.4.2 aufgelistet.

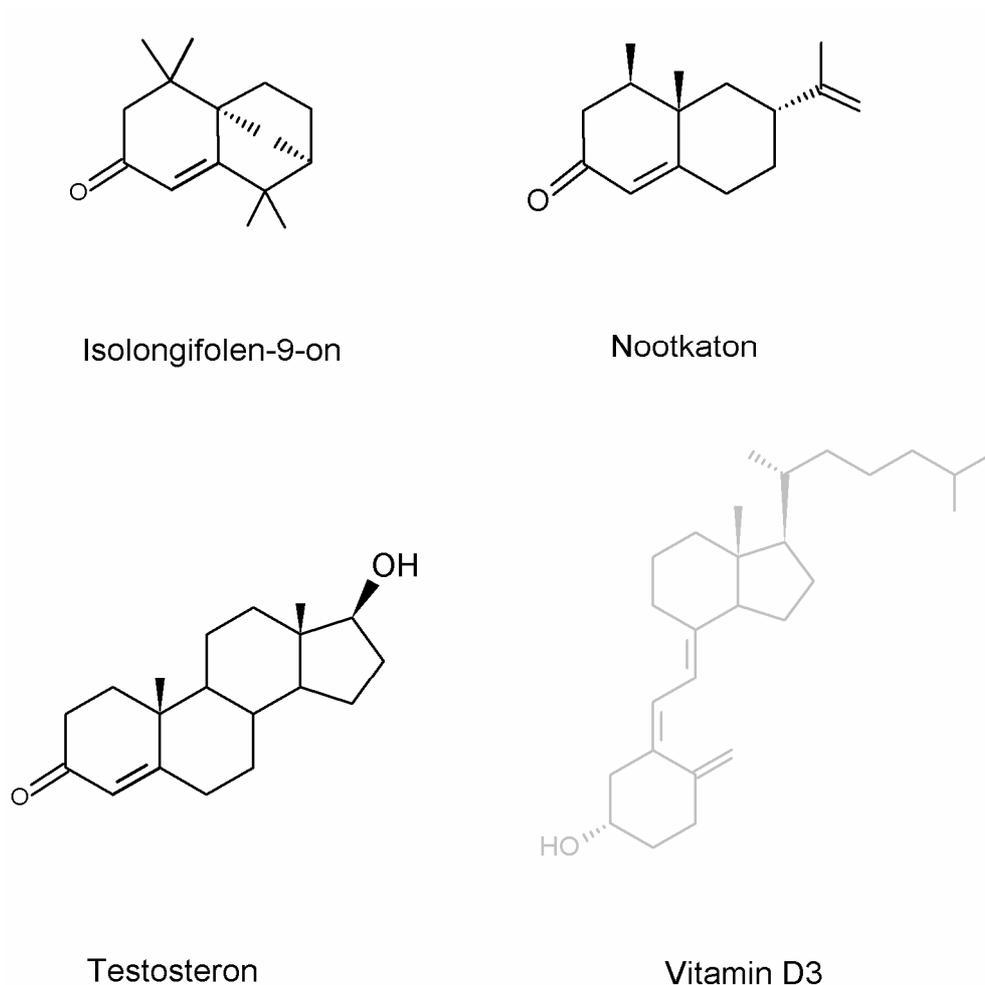


Abb. 3.13: Strukturformeln der Substanzen, die als potentielle Substrate von CYP109E1 getestet wurden. Die Substanzen, die einen TypI-Shift in CYP109E1 induzierten, sind in schwarz dargestellt. Die Substanz, die keinen TypI-Shift induzierte, ist grau dargestellt.

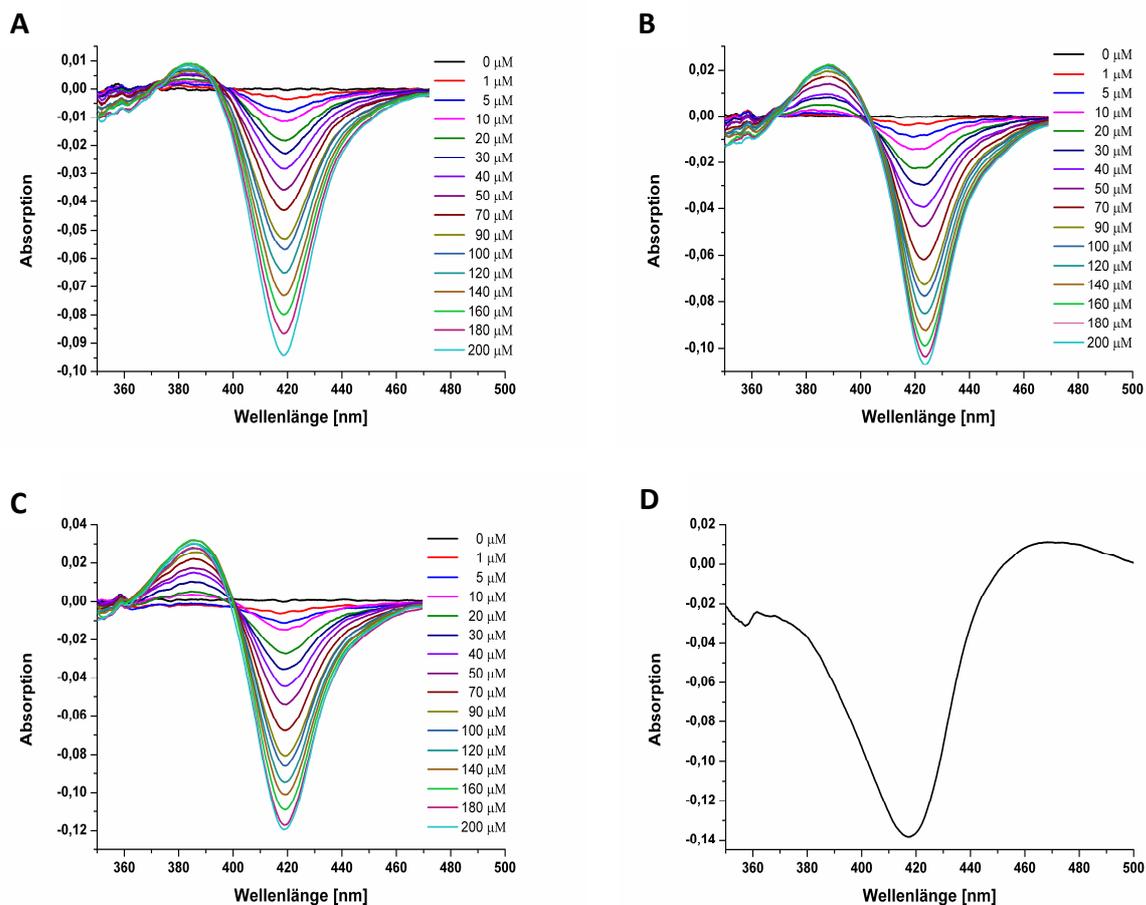


Abb. 3.14: Durch die Bindung von Isolongifolen-9-on (A), Nootkaton (B) und Testosteron (C) an CYP109E1 wurde ein Typ I-Shift induziert, wohingegen Vitamin D3 (D) keinen TypI-Shift induzieren konnte. 10 μM CYP109E1 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 wurde mit steigenden Mengen an Isolongifolen-9-on (0-200 μM), Nootkaton (0-200 μM) und Testosteron (0-200 μM) titriert.

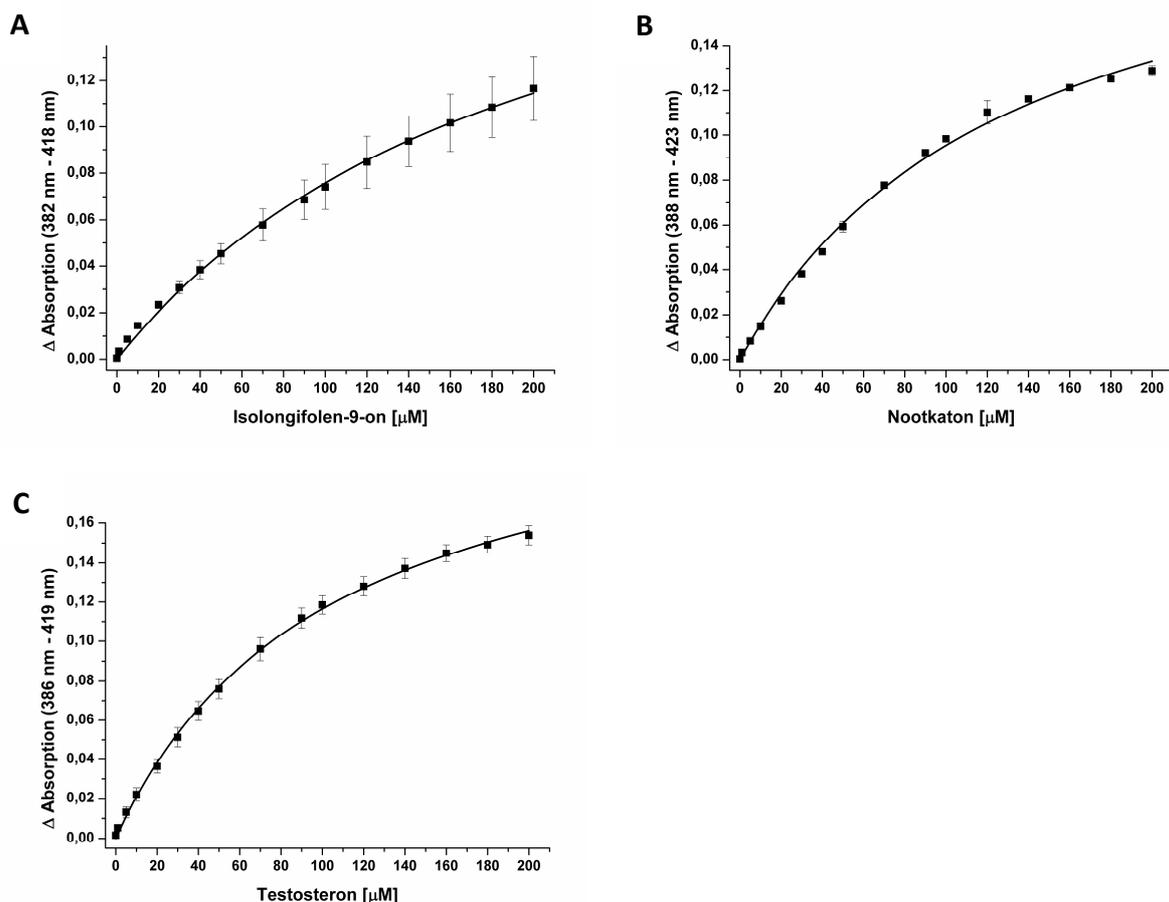


Abb. 3.15: Die Differenzen zwischen dem Maximum und dem Minimum wurden gegen die entsprechenden Isolongifolen-9-on (A), Nootkaton- (B) und Testosteron-Konzentrationen (C) aufgetragen und die Daten durch hyperbolische Regression ausgewertet. Jede Titration wurde in Triplikaten durchgeführt und die jeweiligen Mittelwerte wurden bestimmt.

Tab. 3.4.2: Überblick über die K_D -Werte und Regressionskoeffizienten der Substanzen, die einen Typ I-Shift in CYP109E1 induzierten.

Substanz	K_D -Wert [μ M]	Regressionskoeffizient R^2
Isolongifolen-9-on	$208,21 \pm 16,28$	0,998
Nootkaton	$131,79 \pm 10,03$	0,997
Testosteron	$103,53 \pm 4,03$	0,999

3.4.3. CYP109A2

Bei Zugabe von Vitamin D3 zu CYP109A2 und anschließender Untersuchung mittels Differenzspektroskopie konnte, ähnlich wie schon für CYP109E1, ein Minimum bei etwa 420 nm und ein Maximum bei 461 nm beobachtet werden (Abb. 3.16). Vitamin D induzierte demnach keinen TypI-Shift in CYP109A2, so dass auch die Bestimmung eines K_D -Wertes nicht möglich war.

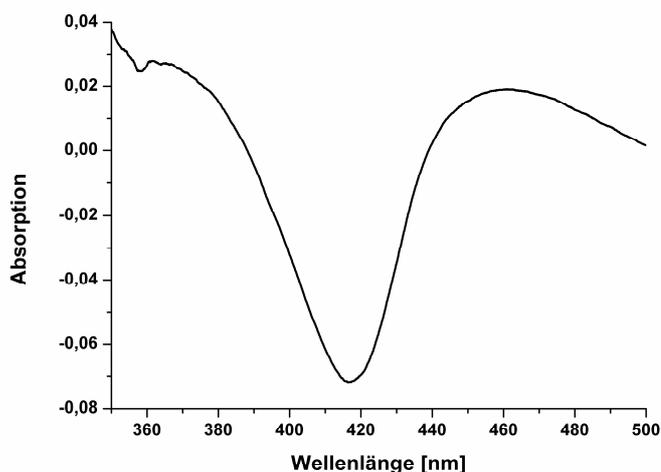


Abb. 3.16: Differenzspektrum, das durch die Zugabe von Vitamin D3 gemessen werden konnte. Das durch ein Minimum bei 420 nm und ein Maximum bei 461 nm charakterisierte Spektrum stellte kein Typ I-Spektrum dar, so dass kein K_D -Wert bestimmt werden konnte.

3.5. *In vitro* Substratumsatz

Bei der Bindung einer Substanz an ein Cytochrom P450 handelt es sich um eine zwingende, jedoch nicht ausreichende Voraussetzung für eine Substratumsetzung. So konnten zum Beispiel Substanzen, die in CYP106A2 einen TypI-Shift induzierten, von diesem Enzym nicht umgesetzt werden (Schmitz et al. 2012). Gleichzeitig sind verschiedene steroidale Substrate von CYP106A2 nicht in der Lage, einen TypI-Shift zu induzieren (Lisurek 2004). Aufgrund dessen wurden alle potentiellen Substrate auf eine Produktbildung untersucht. Cytochrome P450 benötigen Redoxpartner für ihre Aktivität (Bernhardt 2006) (Hannemann et al. 2007). Daher sollte anhand von *in vitro* Rekonstitutionsassays auch überprüft werden, ob die

Ferredoxin Reduktasen sowie das Flavodoxin bzw. die Ferredoxine in der Lage sind, einen Elektronentransfer von NAD(P)H auf die Cytochrome P450 zu gewährleisten. Ein solcher Rekonstitutionsassay enthielt das entsprechende Cytochrom P450, die potentiellen Redoxpartner, ein NADPH-regenerierendes System sowie die jeweilige Substanz und wurde anschließend mittels HPLC auf eine erfolgreiche Produktbildung untersucht.

3.5.1. *In vitro* Substratumsatz mit CYP106A1

Unter Verwendung der Ferredoxin Reduktasen in Kombination mit dem Flavodoxin bzw. den Ferredoxinen aus *B. megaterium* DSM319 konnte für keines der potentiellen Substrate eine effiziente Produktbildung beobachtet werden. Da für viele Cytochrome P450 die natürlichen Redoxpartner nicht bekannt sind, erfolgt die Rekonstitution der Cytochrom P450 Systeme oft mit heterologen Redoxpartnern (Ringle et al. 2012). Daher wurden in einem ersten Schritt die Reduktasen FdR1, FdR2 und FdR3 aus *B. megaterium* durch verschiedene heterologe Reduktasen wie Arh1 aus der Spaltheefe, bovine AdR und die *E. coli* Reduktase Fpr ersetzt. Mit diesen Redoxsystemen konnte exemplarisch Progesteron von CYP106A1 erfolgreich zu zwei Haupt- und mehreren Nebenprodukten umgesetzt werden (Abb. 3.17A). Dabei waren das Flavodoxin sowie die drei Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine Fdx2, Fdx3 und Fdx4 in Kombination mit allen drei heterologen Reduktasen in der Lage, die Aktivität von CYP106A1 zu unterstützen. Bei Einsatz des [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxins Fdx1 konnte hingegen keine Substratumsetzung beobachtet werden.

Um herauszufinden, ob ein fehlender Elektronentransfer zwischen den Ferredoxin Reduktasen und Fdx1 oder zwischen Fdx1 und CYP106A1 oder beides die Ursache für den nicht vorhandenen Substratumsatz ist, wurde ein Cytochrom *c* Assay durchgeführt. Dieser Assay ermöglicht eine Untersuchung der Wechselwirkung zwischen einer Ferredoxin Reduktase und einem Ferredoxin, wobei die Reduktion des Cytochroms *c* anhand der Absorptionzunahme bei 550 nm spektroskopisch verfolgt werden kann. Hierfür wurden die drei heterologen Reduktasen mit Fdx1, Cytochrom *c* und NADPH versetzt und die Reaktion über die Zeit verfolgt. Aus Abb. 3.18 geht hervor, dass für alle drei Reduktasen eine Reduktion des Cytochrom *c* und damit ein Elektronentransfer zwischen den heterologen Reduktasen, Fdx1 und Cytochrom *c* erfolgte, wobei die Reduktion vor allem bei Fpr sehr schnell ablief. Daraus lässt sich ableiten, dass Fdx1 in der Lage ist, mit den heterologen Ferredoxin Reduktasen Arh1, AdR und Fpr sowie Cytochrom *c* funktionell zu wechselwirken, wohingegen eine

Elektronenübertragung auf CYP106A1 nicht möglich war. Aus diesem Grund kann Fdx1 nicht als Redoxpartner für CYP106A1 fungieren und wurde nicht weiter untersucht.

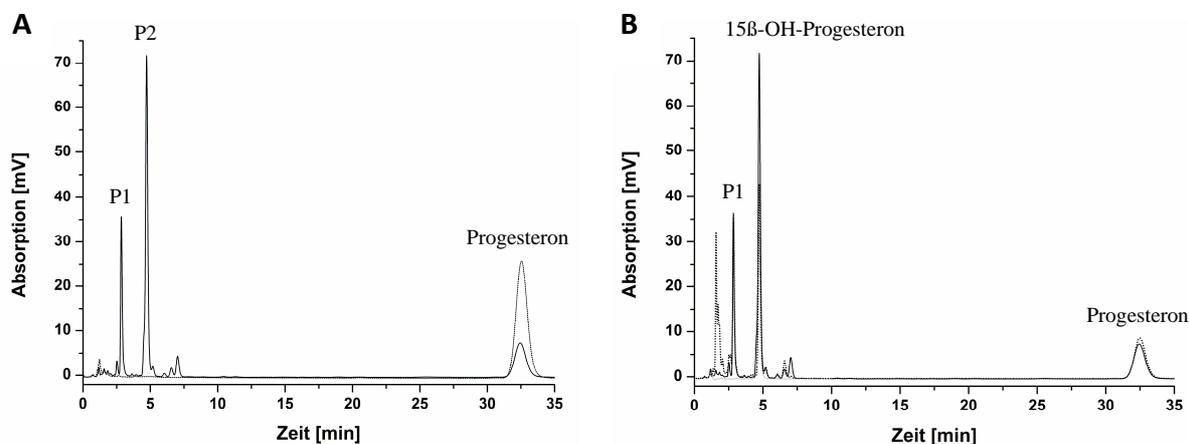


Abb. 3.17: **A** HPLC Chromatogramm des *in vitro* Umsatzes von Progesteron durch CYP106A1 bei Einsatz von Arh1 und Fdx2 als Redoxpartner. Die Reaktion wurde in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, 20% Glycerin bei 30°C für 30 min durchgeführt (schwarz). Die Negativkontrolle wurde ohne CYP106A1 durchgeführt (gepunktet). **B** HPLC Chromatogramme der *in vitro* Umsätze von Progesteron durch CYP106A1 (schwarz) und CYP106A2 (gepunktet). Beide Umsätze wurden, wie unter A beschrieben, unter identischen Bedingungen durchgeführt. Das Hauptprodukt beider Umsätze überlagerte mit dem Standard 15β-Hydroxy-Progesteron (grau).

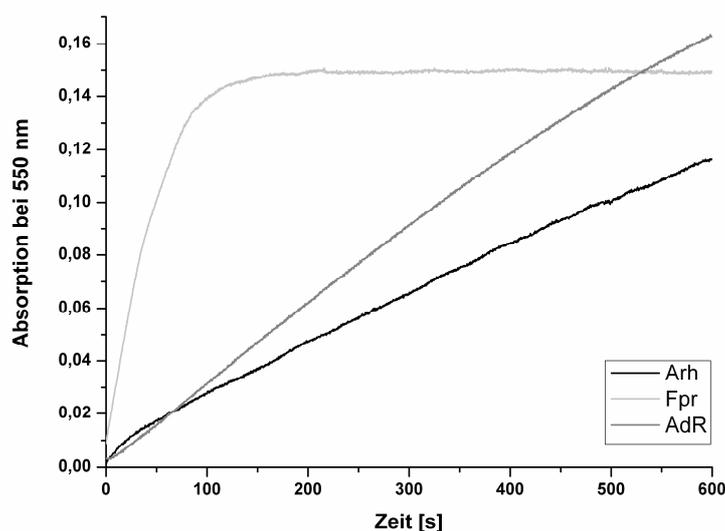
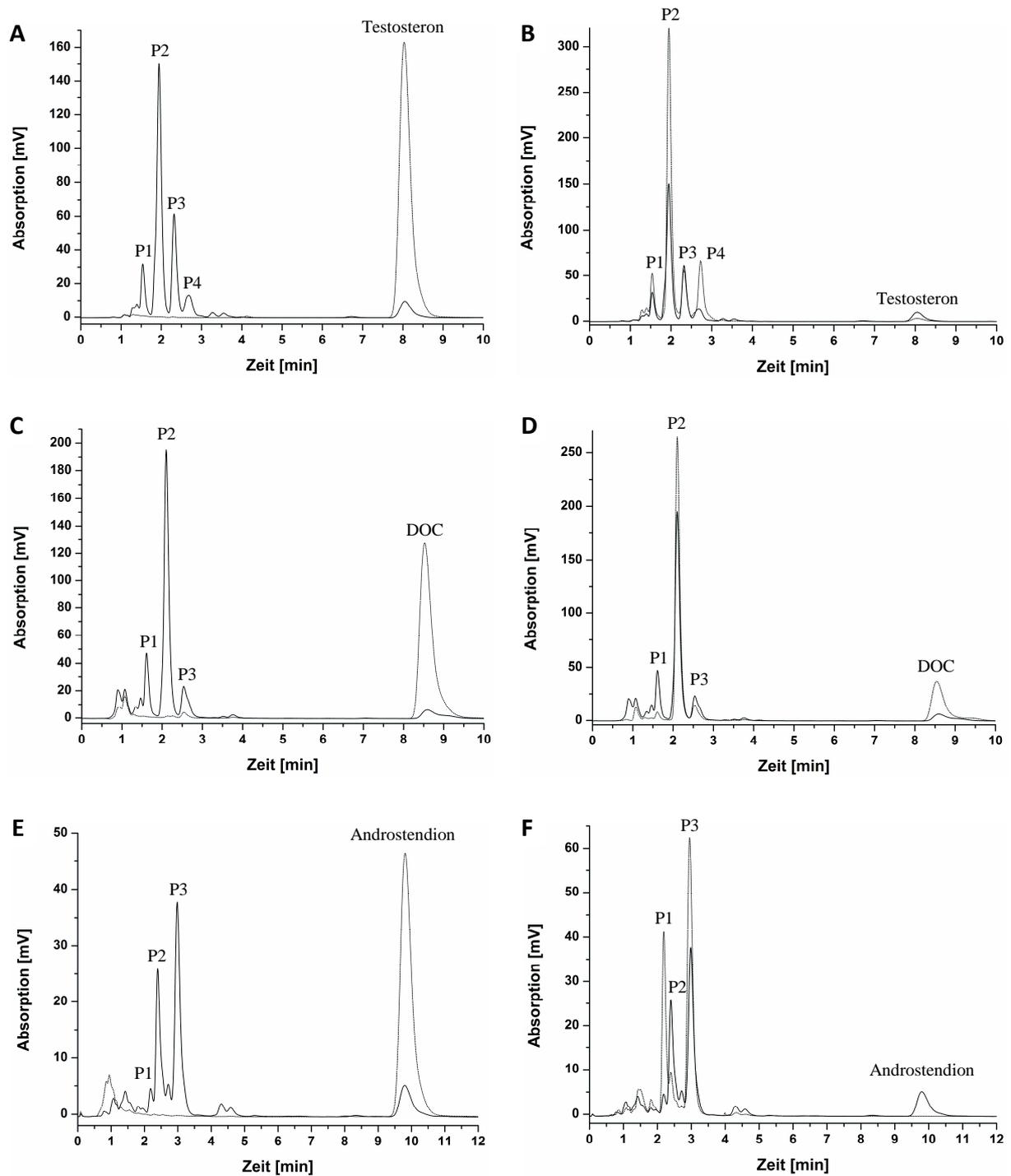


Abb. 3.18: Cytochrom *c* Assay zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den Ferredoxin Reduktasen Arh1 aus *S. pombe*, boviner AdR bzw. *E. coli* Fpr, Fdx1 aus *B. megaterium* DSM319 und Cytochrom *c*. Cytochrom *c* (100 μM), Fdx1 (10 μM) und Arh1/AdR/Fpr (1 μM) wurden in 500 μl 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μM NADPH gestartet und die Reduktion von Cytochrom *c* wurde bei 550 nm verfolgt.

Da Progesteron auch von CYP106A2 umgesetzt wird (Lisurek et al. 2004), wurde der *in vitro* Umsatz von Progesteron mit dem von CYP106A2 verglichen. Dabei zeigten beide Enzyme einen vergleichbar starken Umsatz und ein ähnliches Produktmuster (Abb. 3.17B). Zudem überlagerte das Produkt P2 des CYP106A1 Umsatzes mit dem Standard 15 β -Hydroxy-Progesteron, dem bekannten Hauptprodukt des CYP106A2-abhängigen Progesteron-Umsatzes (Lisurek et al. 2004). Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei P2 auch um 15 β -Hydroxy-Progesteron handelt und die anderen CYP106A1-Produkte mit denjenigen von CYP106A2 übereinstimmen.

Nachdem anhand des Umsatzes von Progesteron erfolgreich Redoxpartner für CYP106A1 identifiziert wurden, konnten auch die übrigen Substanzen auf eine Produktbildung untersucht werden. Testosteron wurde von CYP106A1 zu vier Produkten umgesetzt (Abb. 3.19A). Dieses Produktmuster liegt auch bei dem CYP106A2-abhängigen Testosteron Umsatz vor, wobei die Produkte jedoch zum Teil in anderen Verhältnissen gebildet werden (Abb. 3.19B). Ebenso wurde DOC von CYP106A1 erfolgreich zu drei Produkten umgesetzt (Abb. 3.19C), welche auch die Produkte des CYP106A2-abhängigen DOC Umsatzes darstellen (Abb. 3.19D). Androstendion konnte von CYP106A1 zu dem Nebenprodukt P1 und den zwei Hauptprodukten P2 und P3 umgesetzt werden (Abb. 3.19E). P3 stellt auch das Hauptprodukt des durch CYP106A2 katalysierten Umsatzes dar, wohingegen P2 von CYP106A2 in stärkerem Maße und P1 in schwächerem Maße gebildet werden als von CYP106A1 (Abb. 3.19F). Abgesehen von dieser Verschiebung in den relativen Verhältnissen der Produkte ist CYP106A1 im Vergleich zu CYP106A2 jedoch nicht in der Lage, Androstendion zu anderen, neuen Produkten umzusetzen. Des Weiteren setzte CYP106A1 RSS zu zwei Produkten um (Abb. 3.19G), welche mit den Produkten des CYP106A2-abhängigen RSS Umsatzes überlagerten (Abb. 3.19H). Auch KBA wurde von CYP106A2 als Substrat akzeptiert und zu dem Hauptprodukt P2 (82%) und dem Nebenprodukt P1 (18%) umgesetzt (Abb. 3.19I). Damit wies der CYP106A1-abhängige KBA Umsatz ein anderes Produktmuster auf als derjenige durch CYP106A2 (Abb. 3.19J). CYP106A2 setzt KBA zu einem Hauptprodukt um, welches mit P1 des CYP106A1 Umsatzes überlagert und als 15 α -Hydroxy-KBA identifiziert werden konnte (Bleif et al. 2012). P2 weist die gleiche Retentionszeit auf wie ein Nebenprodukt des CYP106A2-abgängigen Umsatzes, während die beiden übrigen, von CYP106A2 gebildeten Produkte von CYP106A1 nicht gebildet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Hauptprodukt des durch CYP106A1 katalysierten KBA Umsatzes nicht um 15 α -Hydroxy-KBA handelt. Da KBA das

einzige Substrat darstellte, das von CYP106A1 zu einem anderen Produktmuster als von CYP106A2 umgesetzt wurde, wurden alle weiteren Untersuchungen mit KBA als Substrat durchgeführt. Im Gegensatz zu der pentazyklischen Triterpensäure KBA wurde die Diterpensäure Abietinsäure, die ein Substrat von CYP106A2 darstellt (Bleif et al. 2011), von CYP106A1 jedoch nicht umgesetzt (Daten nicht gezeigt).



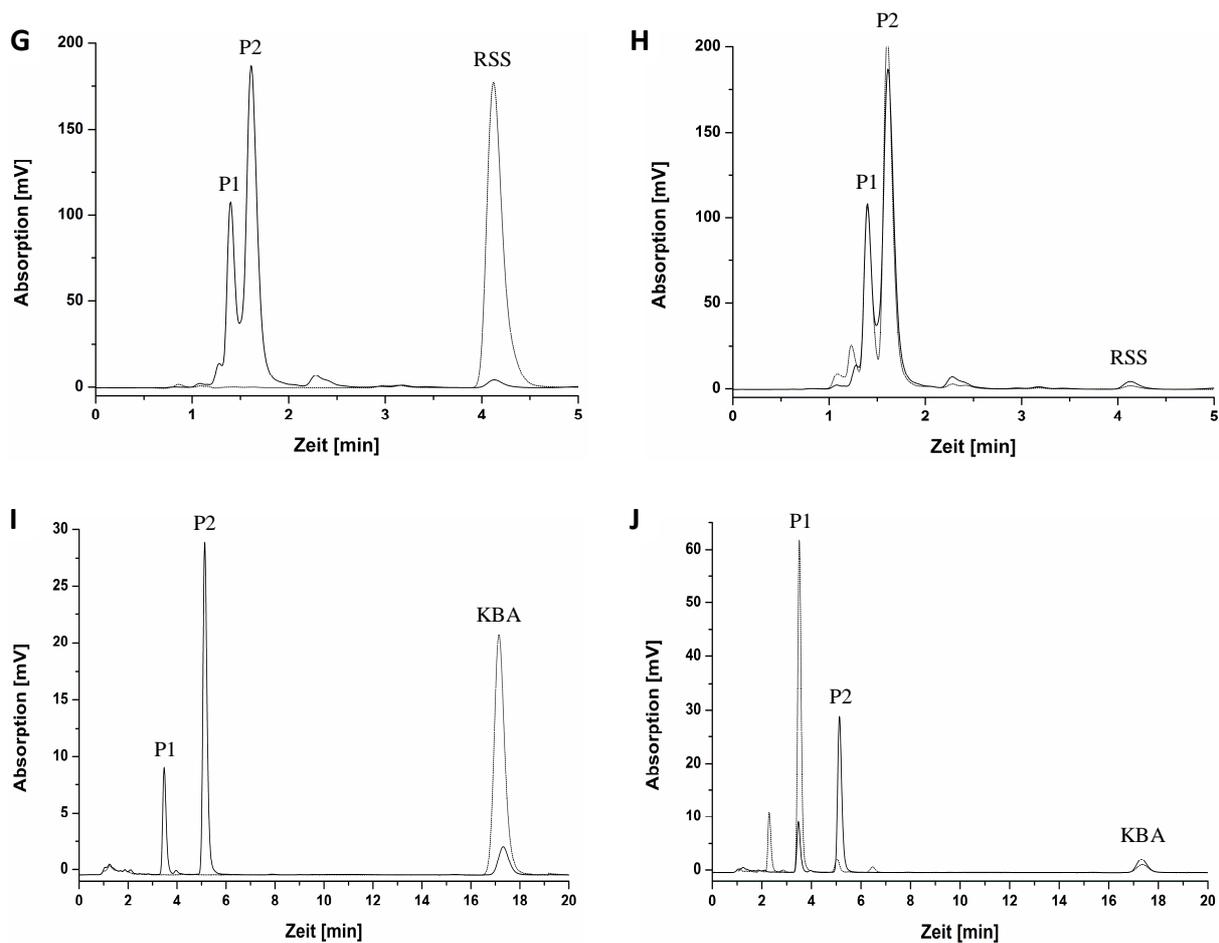


Abb. 3.19: HPLC Chromatogramme der CYP106A1-abhängigen *in vitro* Umsätze und Vergleich dieser Umsätze mit den CYP106A2-abhängigen *in vitro* Umsätzen. HPLC Chromatogramme der *in vitro* Umsätze von Testosteron (A), DOC (C), Androstendion (E), RSS (G) und KBA (I) durch CYP106A1. Die Reaktionen wurden in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 (A-H) bzw. 50 mM HEPES-Puffer, pH 7,4 (I, J), 20% Glycerin bei 30°C für 30 min durchgeführt (schwarz). Die Negativkontrollen wurden ohne CYP106A1 durchgeführt (gepunktet). HPLC Chromatogramme der *in vitro* Umsätze von Testosteron (B), DOC (D), Androstendion (F), RSS (H) und KBA (J) durch CYP106A1 (schwarz) im Vergleich zu den *in vitro* Umsätzen durch CYP106A2 (gepunktet). Für alle Umsätze wurden exemplarisch die Chromatogramme bei Einsatz von Arh1 und Fdx2 als Redoxpartner dargestellt. Alle Umsätze wurden, wie oben beschrieben, unter identischen Bedingungen durchgeführt.

Alle verwendeten Redoxketten – bestehend aus Arh1, AdR bzw. Fpr und Fld, Fdx2, Fdx3 bzw. Fdx4 – führten in den *in vitro* Umsätzen zu den gleichen Produktmustern. Daher sollten diese Redoxketten bezüglich ihrer Effizienz, Elektronen auf CYP106A1 zu übertragen, verglichen werden. Um zu untersuchen, welche der heterologen Reduktasen die beste Wechselwirkung mit Fld bzw. den Ferredoxinen aufweist, wurden CYP106A1-abhängige *in vitro* Umsätze mit 100 μ M KBA durchgeführt. Mit $27,2 \pm 2,6\%$ Umsatz in 30 min zeigte Arh1 im Vergleich zu AdR und Fpr ($16,4 \pm 1,7\%$ bzw. $24,0 \pm 1,3\%$ Umsatz in 30 min) die beste Elektronenübertragung auf Fld (Tab. 3.5.1). Auch für die drei Ferredoxine Fdx2, Fdx3 und Fdx4 stellte Arh1 den effizientesten Redoxpartner dar: Während Fpr nur zu $23,5 \pm 1,4\%$, $14,2 \pm 1,0\%$ bzw. $15,1 \pm 1,3\%$ Produktbildung in 30 min in Kombination mit Fdx2, Fdx3 bzw. Fdx4 führte (Tab. 3.5.1), wies Arh1 mit $79,6 \pm 6,9\%$, $79,3 \pm 6,4\%$ und $60,6 \pm 3,3\%$ Produktbildung in 30 min deutlich höhere Werte auf (Tab. 3.5.1). Für AdR konnte eine Gesamtproduktbildung von $60,0 \pm 2,1\%$, $54,9 \pm 1,3\%$ und $16,1 \pm 1,4\%$ mit Fdx2, Fdx3 und Fdx4 in 30 min gemessen werden (Tab. 3.5.1). Die vorliegenden Daten der *in vitro* Umsätze mit allen vier Redoxpartnern aus *B. megaterium* – jeweils in Kombination mit der effizientesten Reduktase Arh1 – ermöglichten einen Vergleich dieser vier Proteine bezüglich ihrer Effizienz, Elektronen auf CYP106A1 zu übertragen: Mit $79,6 \pm 6,9\%$ und $79,3 \pm 6,4\%$ Umsatz in 30 min zeigten Fdx2 und Fdx3 annähernd die gleichen Produktbildungsraten (Tab. 3.5.1, Abb. 3.20). Im Gegensatz dazu war die Gesamtproduktbildung in 30 min bei Einsatz von Fdx4 mit $60,6 \pm 3,3\%$ leicht, bei Einsatz von Fld mit $27,2 \pm 2,6\%$ deutlich verringert.

Tab. 3.5.1: Produktbildung im Test des CYP106A1-abhängigen KBA Umsatzes mit verschiedenen Kombinationen der heterologen Ferredoxin Reduktasen Arh1, AdR bzw. Fpr und dem Flavodoxin bzw. den Ferredoxinen aus *B. megaterium* DSM319. Die in Abb. 3.20 dargestellten Werte der Kombinationen mit der besten Reduktase Arh1 sind fett markiert. Angegeben ist die Gesamtproduktbildung (in Prozent) nach 30 min der Reaktionsansätze mit verschiedenen FdR-Fld/Fdx Kombinationen. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen dar.

Elektronentransferkette	Produktbildung [%]	Elektronentransferkette	Produktbildung [%]
-	0		
Arh + Fld	27,2 ± 2,6	Arh + Fdx3	79,3 ± 6,4
AdR + Fld	16,4 ± 1,7	AdR + Fdx3	54,9 ± 1,3
Fpr + Fld	24,0 ± 1,3	Fpr + Fdx3	14,2 ± 1,0
Arh + Fdx2	79,6 ± 6,9	Arh + Fdx4	60,6 ± 3,3
AdR + Fdx2	60,0 ± 2,1	AdR + Fdx4	16,1 ± 1,4
Fpr + Fdx2	23,5 ± 1,4	Fpr + Fdx4	15,1 ± 1,3

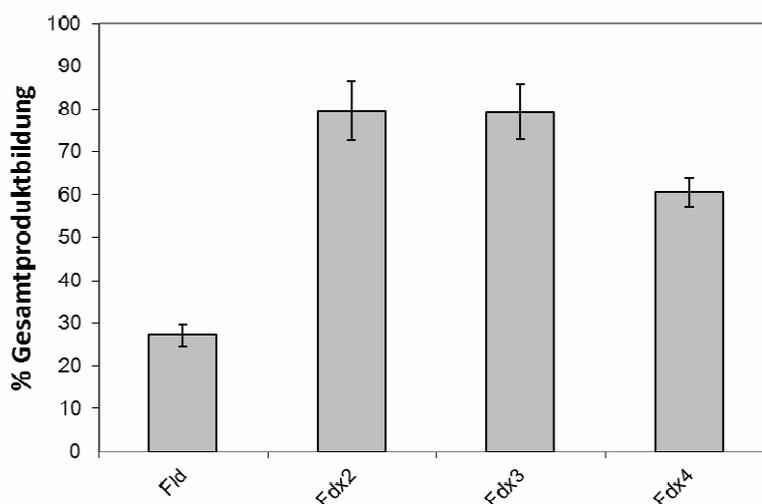


Abb. 3.20: Vergleich der Produktbildung des CYP106A1-abhängigen KBA Umsatzes mit unterschiedlichen Kombinationen der heterologen Ferredoxin Reduktase Arh1 und dem Flavodoxin Fld bzw. den Ferredoxinen Fdx2, Fdx3, Fdx4 aus *B. megaterium* DSM319. Dargestellt sind die in Tab. 3.5.1 fett markierten Werte.

3.5.2. *In vitro* Substratumsatz mit CYP109E1

Nach der erfolgreichen Identifizierung von Redoxpartnern und Substraten für CYP106A1 wurde überprüft, ob die entsprechenden autologen und heterologen Proteine auch als Elektronenüberträger auf CYP109A1 fungieren können und die TypI-Shift induzierenden Substanzen Substrate für CYP109A1 darstellen. Dazu wurden, wie schon für CYP106A1 beschrieben, *in vitro* Umsätze durchgeführt. Da für CYP106A1 bereits nachgewiesen wurde, dass die aus *B. megaterium* DSM319 stammenden Ferredoxin Reduktasen nicht mit Fld und den Ferredoxinen wechselwirken können (s. 3.5.1), wurden für die *in vitro* Umsätze die heterologen Reduktasen herangezogen. Dabei waren Fld, Fdx2, Fdx3 und Fdx4 in der Lage, die katalytische Aktivität von CYP109A1 zu unterstützen, was anhand der erfolgreichen Umsetzung von Isolongifolen-9-on zu einem Hauptprodukt P1 (80%) und drei Nebenprodukten P2-4 (20%) belegt werden konnte wie in Abb. 3.21 beispielhaft für Arh1 und Fdx2 als Redoxpartner dargestellt. Im Gegensatz dazu erfolgte bei Verwendung von Fdx1 kein Umsatz von Isolongifolen-9-on. Da eine Elektronenübertragung von Arh1, AdR und Fpr auf Fdx1 möglich ist (Abb. 3.18), stellt die Unfähigkeit von Fdx1, Elektronen auf CYP109E1 zu übertragen, die Ursache für den fehlenden Substratumsatz dar. Bei Fdx1 handelt es sich demnach, im Gegensatz zu Fld, Fdx2, Fdx3 und Fdx4, nicht um einen potentiellen natürlichen Redoxpartner für CYP109E1.

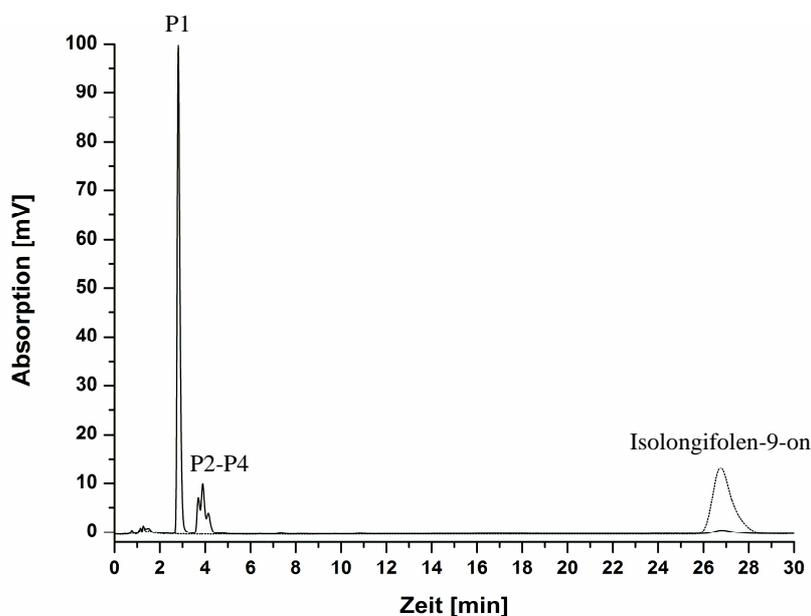


Abb. 3.21: HPLC Chromatogramm des *in vitro* Umsatzes von Isolongifolen-9-on durch CYP109E1 bei Verwendung von Arh1 und Fdx2 als Redoxpartner. Die Reaktion wurde in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20% Glycerin bei 30°C für 30 min durchgeführt (schwarz). Die Negativkontrolle wurde ohne CYP109E1 durchgeführt (gepunktet).

Mit Fld, Fdx2, Fdx3 und Fdx4 in Kombination mit Arh1, AdR bzw. Fpr konnten mehrere Redoxsysteme für CYP109E1 etabliert werden, die die Identifizierung weiterer Substrate ermöglichten. Nootkaton wurde von CYP109E1 zu einem Nebenprodukt P1 (7%) und einem Hauptprodukt P2 (93%) umgesetzt (Abb. 3.22). Auch für Testosteron erfolgte eine Produktbildung, wobei das Hauptprodukt P1 (85%) eine geringere und das Nebenprodukt P2 (15%) eine höhere Retentionszeit als das Substrat Testosteron aufwiesen (Abb. 3.23). Vitamin D3 wurde von CYP109E1 zu fünf Produkten umgesetzt (Abb. 3.24A), von denen das Nebenprodukt P1 mit dem Standard 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D3 überlagerte und das Hauptprodukt P4 die gleiche Retentionszeit wie der Standard 25-Hydroxy-Vitamin D3 aufwies (Abb. 3.24B). Die fünf Produkte P1-P5 wurden in Anteilen von etwa 4%, 21%, 12%, 54% und 9% gebildet. Für alle CYP109E1-abhängigen Umsätze wurde beispielhaft jeweils das Chromatogramm dargestellt, das bei Einsatz von Arh1 und Fdx2 als Redoxpartner aufgenommen wurde.

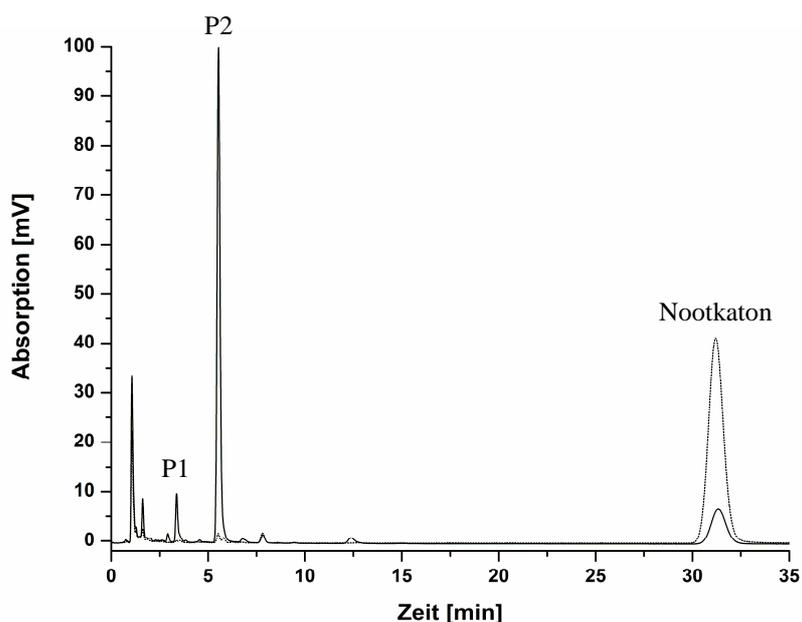


Abb. 3.22: HPLC Chromatogramm des *in vitro* Umsatzes von Nootkaton durch CYP109E1 bei Verwendung von Arh1 und Fdx2 als Redoxpartner. Die Reaktion wurde in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20% Glycerin bei 30°C für 30 min durchgeführt (schwarz). Die Negativkontrolle wurde ohne CYP109E1 durchgeführt (gepunktet).

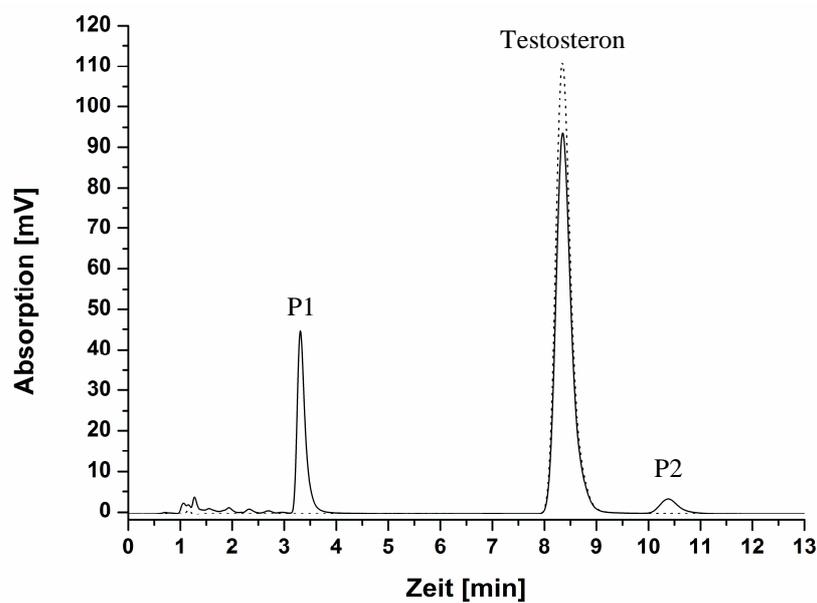


Abb. 3.23: HPLC Chromatogramm des *in vitro* Umsatzes von Testosteron durch CYP109E1 bei Verwendung von Arh1 und Fdx2 als Redoxpartner. Die Reaktion wurde in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20% Glycerin bei 30°C für 30 min durchgeführt (schwarz). Die Negativkontrolle wurde ohne CYP109E1 durchgeführt (gepunktet).

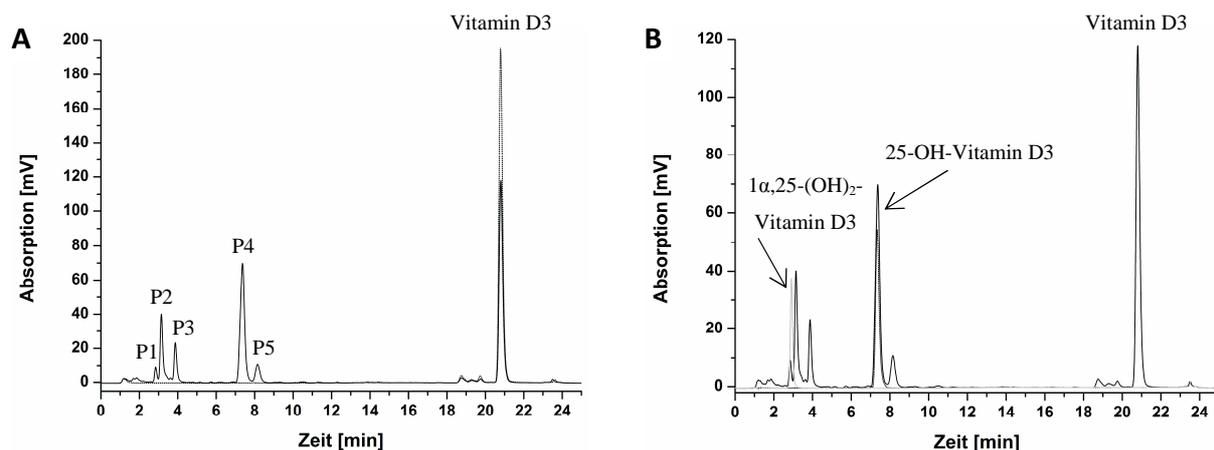


Abb. 3.24: **A** HPLC Chromatogramm des *in vitro* Umsatzes von Vitamin D3 durch CYP109E1 bei Verwendung von Arh1 und Fdx2 als Redoxpartner. Die Reaktion wurde in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20% Glycerin bei 30°C für 30 min durchgeführt (schwarz). Die Negativkontrolle wurde ohne CYP109E1 durchgeführt (gepunktet). **B** HPLC Chromatogramm des *in vitro* Umsatzes von Vitamin D3 im Vergleich zu Vitamin D3 Standards. P1 überlagerte mit dem Standard 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D3 (grau) und P4 mit dem Standard 25-Hydroxy-Vitamin D3 (gepunktet).

Nachdem auch für CYP109E1 erfolgreich Redoxpartner identifiziert werden konnten, sollten diese in ihrer Effizienz, als Elektronenüberträger auf CYP109E1 zu fungieren, miteinander verglichen werden. Anhand des CYP106A1-abhängigen Substratumsatzes konnte schon gezeigt werden, dass Arh1 unter den zur Verfügung stehenden Reduktasen den effizientesten Elektronentransfer sowohl auf Fld als auch auf die Ferredoxine gewährleistet (Tab. 3.5.1). Daher musste an diesem Punkt lediglich untersucht werden, wie sich Fld und die Ferredoxine hinsichtlich der Elektronenübertragung auf CYP109A1 unterscheiden. Dazu wurden mit CYP109E1 *in vitro*-Umsätze des Substrates Isolongifolen-9-on (200 μ M) unter Verwendung der vier Redoxproteine in Kombination mit Arh1 durchgeführt. Hierbei wiesen Fdx2 und Fdx3 mit $88,0 \pm 0,5\%$ und $89,0 \pm 2,9\%$ Produktbildung in 15 min die höchsten Werte auf (Tab. 3.5.2, Abb. 3.22), während Fld und Fdx4 eine geringere Effizienz in der Elektronenübertragung auf CYP109E1 zeigten ($75,4 \pm 8,0\%$ und $76,7 \pm 1,4\%$ Gesamtproduktbildung in 15 min) (Tab. 3.5.2, Abb. 3.25).

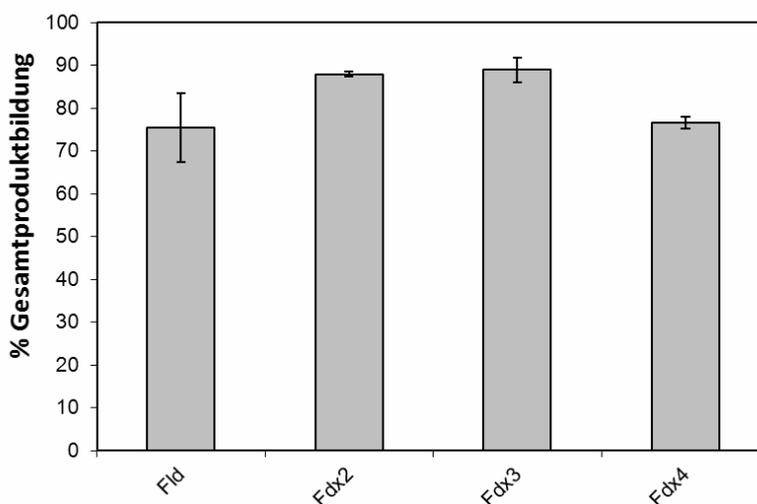


Abb. 3.25: Vergleich der Produktbildung des CYP109E1-abhängigen Isolongifolen-9-on Umsatzes mit unterschiedlichen Kombinationen der heterologen Ferredoxin Reduktase Arh1 und dem Flavodoxin Fld bzw. den Ferredoxinen Fdx2, Fdx3, Fdx4 aus *B. megaterium* DSM319.

Tab. 3.5.2: Produktbildung im Test des CYP109E1-abhängigen Isolongifolen-9-on Umsatzes mit unterschiedlichen Kombinationen von Arh1 und dem Flavodoxin bzw. den Ferredoxinen aus *B. megaterium* DSM319.

Angegeben ist die Gesamtproduktbildung (in Prozent) nach 15 min der Reaktionsansätze mit verschiedenen Arh1-Fld/Fdx-Kombinationen. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen dar.

Elektronentransferkette	Produktbildung [%]
-	0
Arh + Fld	75,4 ± 8,0
Arh + Fdx2	88,0 ± 0,5
Arh + Fdx3	89,0 ± 2,9
Arh + Fdx4	76,7 ± 1,4

3.5.3. *In vitro* Substratumsatz mit CYP109A2

Nach der erfolgreichen Identifizierung von Redoxpartnern und Substraten für CYP106A1 und CYP109E1 mittels *in vitro* Umsätzen wurden diese auch für CYP109A2 durchgeführt. Vitamin D3 wurde von CYP109A2 erfolgreich zu einem Produkt konvertiert wie in Abb. 3.26A exemplarisch bei Verwendung von Arh1 und Fdx2 als Redoxpartner dargestellt. Dieses Produkt überlagerte mit dem Standard 25-Hydroxy-Vitamin D3 (Abb. 3.26B). Auch für CYP109A2 war ein Substratumsatz mit Fld, Fdx2, Fdx3 und Fdx4 in Kombination mit den heterologen Reduktasen Arh1, AdR bzw. Fpr möglich, wohingegen Fdx1 nicht in der Lage war, Elektronen auf CYP109A2 zu übertragen. Demzufolge stellen Fld, Fdx2, Fdx3 und Fdx4 potentielle natürliche Redoxpartner für CYP109A2 dar, welche in einem nächsten Schritt hinsichtlich ihrer Effizienz, Elektronen auf CYP109A2 zu übertragen, untersucht werden sollten. Dabei zeigten Fdx2 und Fdx3 mit $5,06 \pm 2,04\%$ und $5,09 \pm 1,87\%$ Produktbildung in 2 h den effizientesten Elektronentransfer auf CYP109A2, gefolgt von Fld und Fdx4 mit $2,96 \pm 1,50\%$ und $2,46 \pm 1,15\%$ Produktbildung (Tab. 3.5.3, Abb. 3.27).

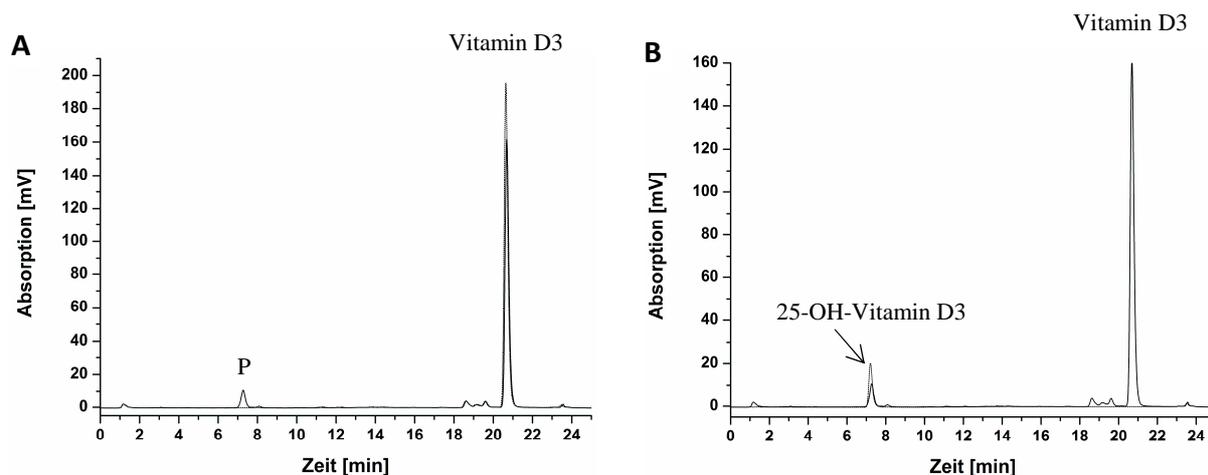


Abb. 3.26: **A** HPLC Chromatogramm des *in vitro* Umsatzes von Vitamin D3 durch CYP109A2 bei Verwendung von Arh1 und Fdx2 als Redoxpartner. Die Reaktion wurde in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20% Glycerin bei 30°C für 2 h durchgeführt (schwarz). Die Negativkontrolle wurde ohne CYP109A2 durchgeführt (gepunktet). **B** HPLC Chromatogramm des *in vitro* Umsatzes von Vitamin D3 im Vergleich zu dem Standard 25-Hydroxy-Vitamin D3. Das Produkt überlagerte mit dem Standard 25-Hydroxy-Vitamin D3 (gepunktet).

Tab. 3.5.3: Produktbildung im Test des CYP109A2-abhängigen Vitamin D3 Umsatzes mit unterschiedlichen Kombinationen von Arh1 und dem Flavodoxin bzw. den Ferredoxinen aus *B. megaterium* DSM319.

Angegeben ist die Gesamtproduktbildung (in Prozent) nach 2 h der Reaktionsansätze mit verschiedenen Arh1-Fld/Fdx- Kombinationen. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen dar.

Elektronentransferkette	Produktbildung [%]
-	0
Arh + Fld	2,96 ± 1,50
Arh + Fdx2	5,06 ± 2,04
Arh + Fdx3	5,09 ± 1,87
Arh + Fdx4	2,46 ± 1,15

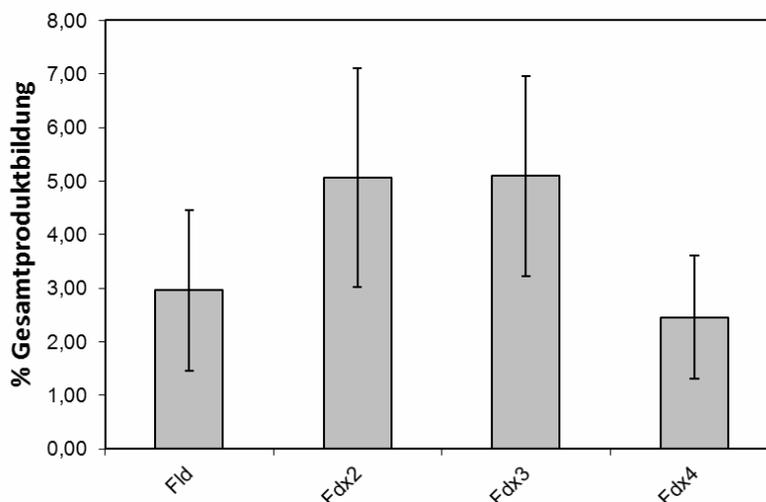


Abb. 3.27: Vergleich der Produktbildung des CYP109A2-abhängigen VitaminD3 Umsatzes mit unterschiedlichen Kombinationen der heterologen Ferredoxin Reduktase Arh1 und dem Flavodoxin Fld bzw. den Ferredoxinen Fdx2, Fdx3, Fdx4 aus *B. megaterium* DSM319.

3.6. Screening der Naturstoffbibliothek mit CYP106A1

Für CYP106A2 konnten durch Screening einer aus 502 Substanzen bestehenden Naturstoffbibliothek auf der Basis von TypI-Shifts in Mikrotiterplatten erfolgreich neue Substrate identifiziert und charakterisiert werden (Schmitz et al. 2012). Aufgrund der hohen Sequenzidentitäten zwischen CYP106A2 und CYP106A1 und der erfolgreichen Identifizierung von TypI-Shift induzierenden Substraten für CYP106A1 im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch CYP106A1 mit dem Ziel, bisher unbekannte Substrate zu finden, mit dieser Naturstoffbibliothek getestet.

Hierfür mussten die für CYP106A2 bestimmten Parameter wie die Konzentrationen von Cytochrom P450 und Substanz sowie geeignete Positiv- und Negativkontrollen für CYP106A1 angepasst werden. Dabei wurden zunächst die für CYP106A2 etablierten Konzentrationen von 5 μ M CYP106A2 und 5 μ M Substanz (Schmitz et al. 2012) auch für CYP106A1 übernommen. Da unter diesen Bedingungen jedoch für die bekannten TypI-Shift induzierenden Substrate DOC und Testosteron in der Mikrotiterplatte keine deutlichen Signale im Vergleich zur Negativkontrolle (nur DMSO) erzielt wurden, wurden weitere

Konzentrationen und Verhältnisse von CYP und Substanz getestet. Zudem wurden insgesamt acht Steroide auf ihre Eignung als Positiv- bzw. Negativkontrolle untersucht. Wie aus Abb. 3.28 hervorgeht, erwiesen sich Konzentrationen von 10 μM Substanz und 10 μM CYP106A1 als am besten geeignet, da hierbei Testosteron, Androstendion und Progesteron einen deutlichen TypI-Shift induzierten und eine klare Abgrenzung zu Substanzen, die keinen TypI-Shift induzierten, und DMSO erfolgte. Anhand dieser Ergebnisse wurden für das Screening Konzentrationen von 10 μM Substanz und 10 μM CYP106A1 sowie Testosteron als Positivkontrolle und Cholestenon als Negativkontrolle ausgewählt. Von den Substanzen wurden 2 mM Stocks in DMSO hergestellt, so dass bei Zugabe von 1,25 μl Substanz zu 250 μl Enzymlösung die DMSO-Menge unter 1% blieb.

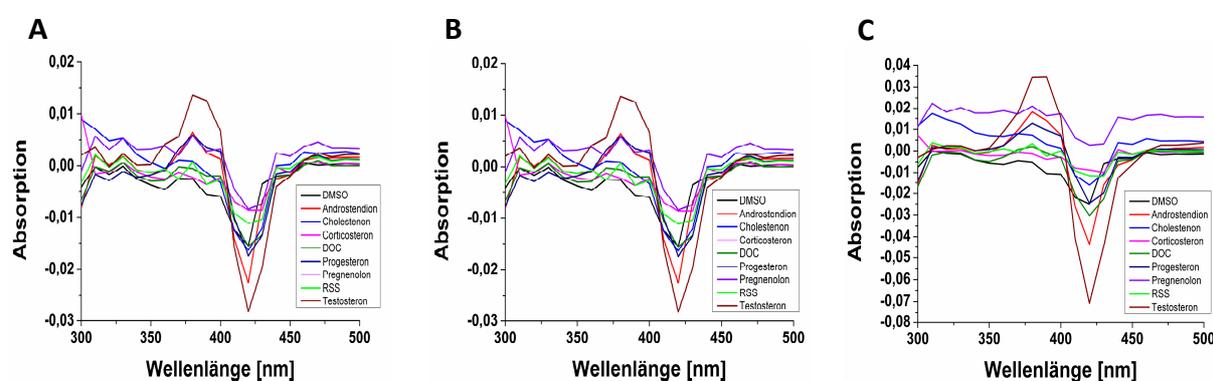


Abb. 3.28: Um geeignete Bedingungen für das Screening der Naturstoffbibliothek mit CYP106A1 zu bestimmen, wurden acht verschiedene, in DMSO gelöste, Steroide sowie DMSO alleine in den Konzentrationen (μM) Substanz:CYP106A1 5:7,5 (A), 5:10 (B) und 10:10 (C) getestet.

Im Rahmen des Screenings in Mikrotiterplatten induzierten folgende Substanzen einen TypI-Shift in CYP106A1 und stellten damit potentielle Substrate für CYP106A1 dar: Betulinsäure, Ursolsäure, Dipterocarpol, Vinblastin Sulfat, Homobutein, Kaempferol-7-Neohesperidosid, Rhamnetin, Ochratoxin A, Indol-3-butylsäure, Vitexin, 18 β -Glycyrrhetinsäure, Oleanolsäure, Solanidin, Solasodin, Dehydro-Andrographolid, Spiraeosid, Panaxadiol, Rutaecarpin, Salsodin und Betulin.

Um die potentiellen Substrate weiter einzugrenzen, wurde untersucht, ob die Induktion der TypI-Shifts auch im Zweistrahl-Photometer bestätigt werden kann, was für die folgenden zwölf Substanzen erfolgreich war: Betulinsäure, Ursolsäure, Dipterocarpol, 18 β -Glycyrrhetinsäure, Oleanolsäure, Ochratoxin A, Rutaecarpin, Solanidin, Solasodin, Dehydro-Andrographolid, Panaxadiol und Betulin (Abb. 3.29).

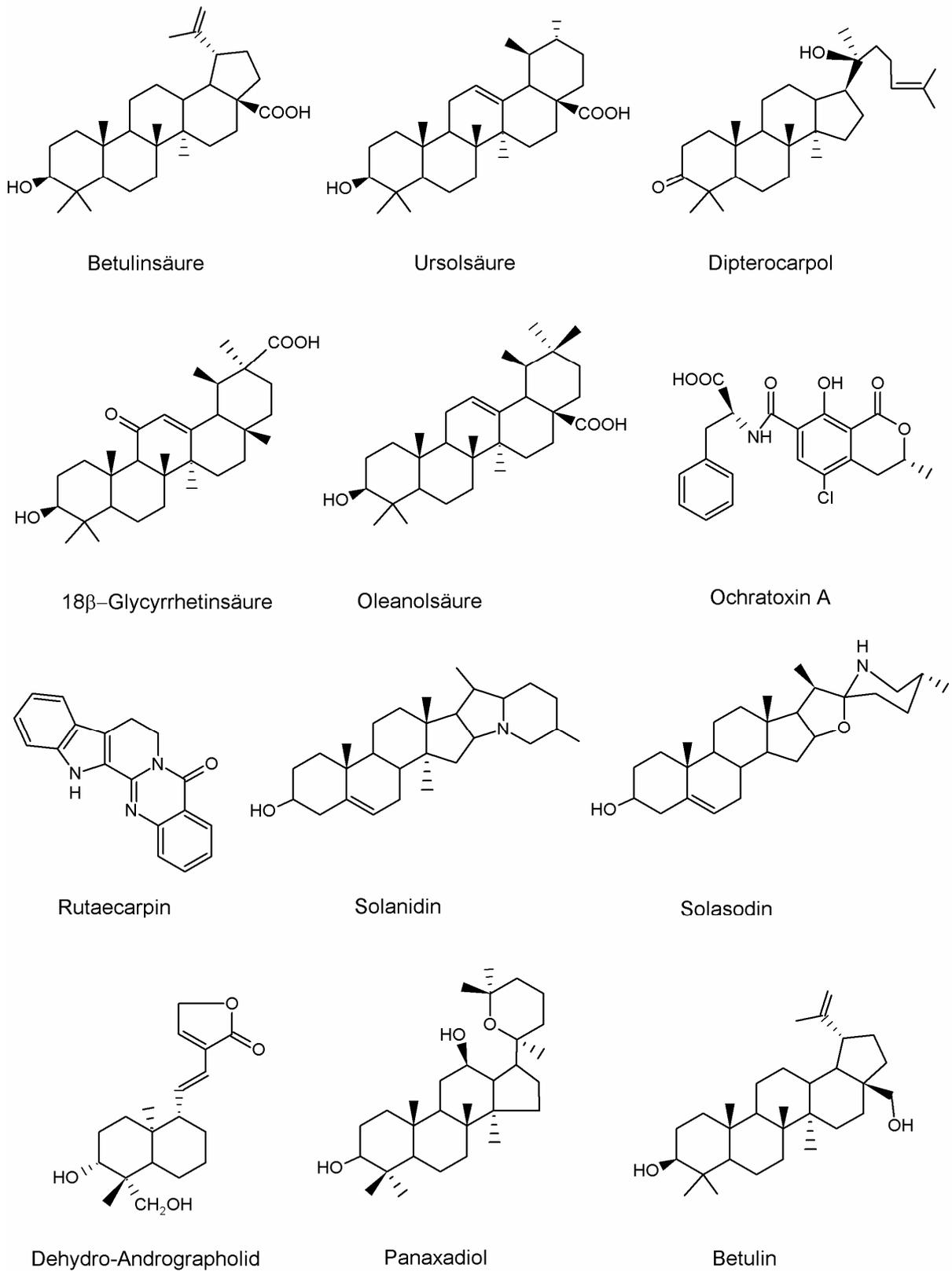


Abb. 3.29: Strukturformeln der Substanzen, die beim Screening der Naturstoffbibliothek einen TypI-Shift in CYP106A1 induzierten und damit potentielle Substrate von CYP106A1 darstellen.

Diese zwölf Substanzen wurden auf einen Umsatz mit CYP106A1 getestet, wobei nur für Ochratoxin A, 18 β -Glycyrrhetinsäure, Dehydro-Andrographolid und Rutaecarpin eine Analyse mittels HPLC möglich war und der Umsatz der übrigen Substanzen mit DC untersucht wurde. Unter diesen Substanzen wurden Betulinsäure, Ursolsäure, Dipterocarpol, 18 β -Glycyrrhetinsäure, Oleanolsäure und Betulin von CYP106A1 umgesetzt. Bei Betulinsäure und Ursolsäure traten jeweils zwei Produkte auf. Dipterocarpol wurde zu fünf Produkten umgesetzt, Oleanolsäure und Betulin jeweils zu einem (Daten nicht gezeigt). Auch 18- β -Glycyrrhetinsäure wurde von CYP106A1 zu einem Produkt umgesetzt (Abb. 3.30A), das auch beim CYP106A2-abhängigen Umsatz der 18 β -Glycyrrhetinsäure entstand (Abb. 3.30B).

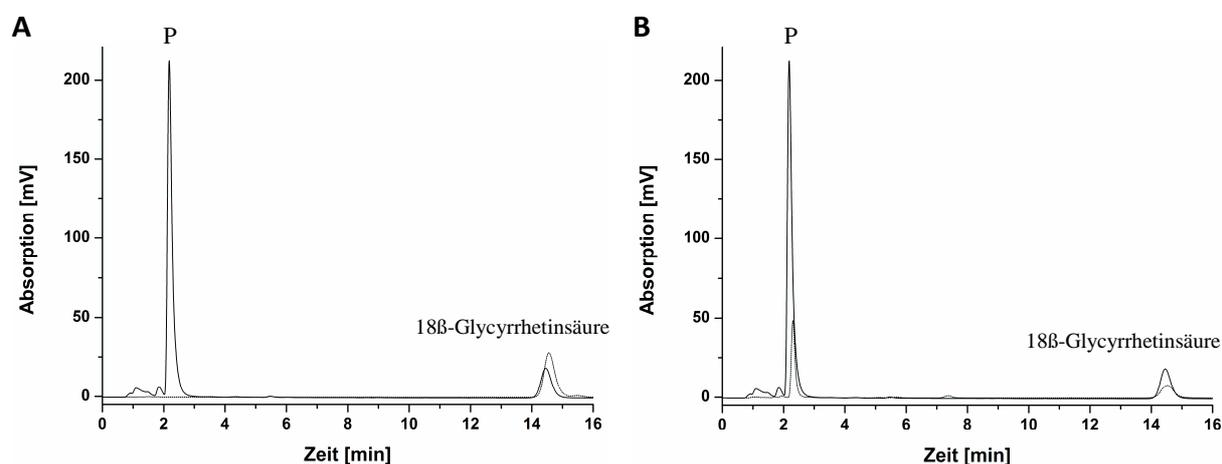


Abb. 3.30: **A** HPLC Chromatogramm des *in vitro* Umsatzes von 18 β -Glycyrrhetinsäure durch CYP106A1. Die Reaktion wurde in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20% Glycerin bei 30°C für 30 min durchgeführt (schwarz). Die Negativkontrolle wurde ohne CYP106A1 durchgeführt (gepunktet). **B** HPLC Chromatogramme des *in vitro* Umsatzes von 18 β -Glycyrrhetinsäure durch CYP106A1 (schwarz) in Vergleich zum *in vitro* Umsatz von 18 β -Glycyrrhetinsäure durch CYP106A2 (gepunktet). Beide Umsätze wurden, wie unter A beschrieben, unter identischen Bedingungen bei Verwendung von Arh1 und Fdx2 als Redoxpartner durchgeführt.

Zudem wurden die Substanzen, für die nur in der Mikrotiterplatte, jedoch nicht in der Küvette am Zweistrahlphotometer, ein TypI-Shift beobachtet werden konnte, auf Umsatz getestet (Vinblastin Sulfat, Homobutein, Kaempferol-7-Neohesperidosid, Rhamnetin, Indol-3-butylsäure, Vitexin, Spiraeosid, und Salsodin). Die Analyse der Umsätze mittels HPLC bzw. DC zeigte jedoch, dass es sich bei diesen Substanzen nicht um Substrate von CYP106A1 handelt.

Mit Betulinsäure, Ursolsäure, Oleanolsäure, 18 β -Glycyrrhetinsäure, Dipterocarpol und Betulin wurden sechs neue Substrate für CYP106A1 identifiziert. Die gleichen Substanzen wurden auch beim Screening der Naturstoffbibliothek als Substrate für CYP106A2 gefunden (Schmitz et al. 2012). Die einzige mittels HPLC analysierbare Substanz 18 β -Glycyrrhetinsäure zeigte für CYP106A1 und CYP106A2 das gleiche Produktmuster, wobei das durch CYP106A2 hergestellte Produkt als 7 β -Hydroxy-18 β -Glycyrrhetinsäure bestimmt werden konnte (Bleif 2012). Da bei allen anderen Substraten nur eine Analyse mittels DC möglich war und diese Substrate auch schon für CYP106A2 bekannt waren, wurde hier auf eine weitergehende Analyse der durch Screening der Naturstoffbibliothek identifizierten Substanzen verzichtet.

3.7. Kinetische Analysen

Anhand von *in vitro* Umsätzen wurde zuvor ermittelt, welche Redoxpartner die beste Wechselwirkung mit den Cytochromen P450 aufweisen. Dabei handelte es sich für CYP106A1 um Arh1 und Fdx2, für CYP109E1 und CYP109A2 jeweils um Arh1 und Fdx3. Deshalb wurden diese Redoxpartner ausgewählt, um die Cytochrom P450-abhängigen Substratumsätze mittels kinetischer Analysen zu untersuchen. Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) wurden *in vitro* Substratumsätze mit konstanten Konzentrationen des Cytochroms P450 und der Redoxpartner durchgeführt. Die Substratkonzentrationen wurden erhöht, bis eine Sättigung des Cytochroms P450 mit dem Substrat erreicht wurde.

3.7.1. Kinetische Analyse des CYP106A1-abhängigen KBA Umsatzes

Zur Bestimmung der Enzymaktivität von CYP106A1 wurde das Substrat KBA in Konzentrationen von 0 bis 100 μM zugegeben. Die erhaltenen Daten wurden mittels hyperbolischer Regression ausgewertet. Für die katalytische Aktivität der CYP106A1-abhängigen KBA Umsetzung ergab sich dabei ein V_{max} von $5,4 \pm 0,1$ nmol Produkte pro nmol CYP106A1 pro Minute und ein K_{M} von $16,5 \pm 1,2$ μM (Abb. 3.31).

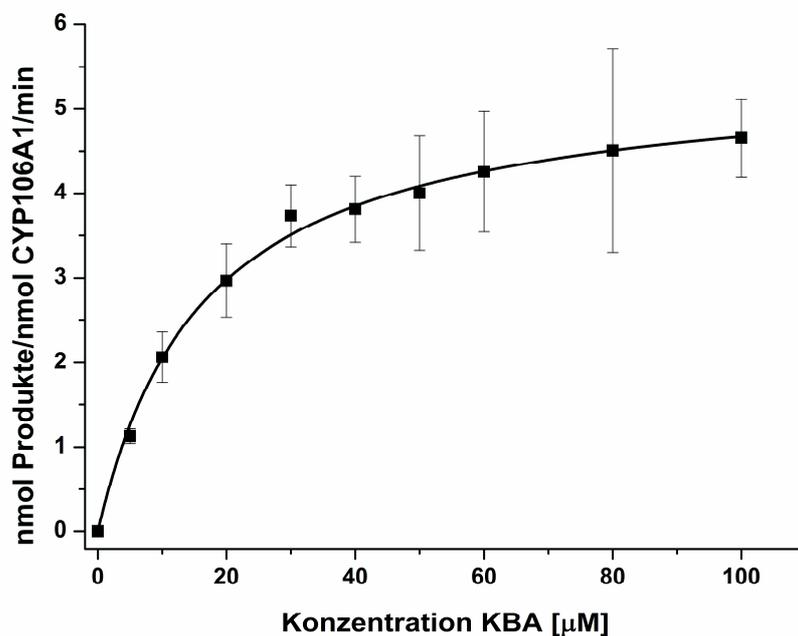


Abb. 3.31: Bestimmung kinetischer Parameter für den durch CYP106A1 katalysierten Umsatz von KBA. Die Reaktionen wurden in 50 mM HEPES-Puffer, pH 7,4, 20% Glycerin bei 30°C für 2 min mit 1,5 μM Arh1, 10 μM Fdx2 und 0,5 μM CYP106A1 durchgeführt. Die KBA-Konzentrationen reichten von 0-100 μM . Jede Reaktion wurde in Triplikaten durchgeführt und die jeweiligen Mittelwerte wurden berechnet. Die erhaltenen Daten wurden mittels hyperbolischer Regression ausgewertet.

3.7.2. Kinetische Analyse des CYP109E1-abhängigen Vitamin D3 Umsatzes

Zur kinetischen Analyse der CYP109E1-abhängigen Vitamin D3 Umsetzung wurde das Substrat Vitamin D3 in Konzentrationen von 0 bis 150 μM zugegeben. Die erhaltenen Daten wurden mittels sigmoidaler Regression ausgewertet. Für die katalytische Aktivität der CYP109E1-abhängigen Vitamin D3 Umsetzung wurden ein V_{max} von $23,9 \pm 2,1$ nmol Produkte pro nmol CYP109E1 pro Minute, ein K_{M} von $44,9 \pm 6,0$ μM und eine Hill Konstante (n) von $1,83 \pm 0,30$ (Abb. 3.32) berechnet, welche auf positiv kooperative Effekte hindeuteten. Für $V_{\text{max}}/K_{\text{M}}$ wurde ein Wert von $8872 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ berechnet.

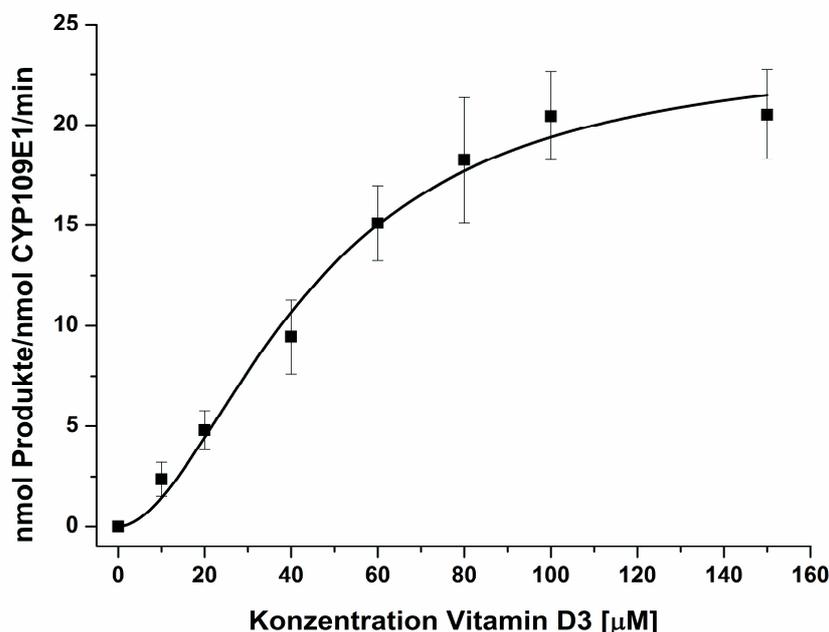


Abb. 3.32: Bestimmung kinetischer Parameter für den durch CYP109E1 katalysierten Umsatz von Vitamin D3. Die Reaktionen wurden in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20% Glycerin bei 30°C für 3 min mit 1,5 μM Arh1, 10 μM Fdx3 und 0,5 μM CYP109E1 durchgeführt. Die Vitamin D3-Konzentrationen reichten von 0-150 μM . Jede Reaktion wurde in Triplikaten durchgeführt und die jeweiligen Mittelwerte wurden berechnet. Die erhaltenen Daten wurden mittels sigmoidaler Regression ausgewertet.

Bei alleiniger Betrachtung der kinetischen Analyse der Bildung des Hauptproduktes P4, das mit dem einzigen Produkt des CYP109A2-abhängigen Vitamin D3 Umsatzes überlagerte, zeigte sich ein nahezu identischer Kurvenverlauf (Daten nicht gezeigt). Daraus ergaben sich Werte, die sehr ähnlich zu den Werten der Gesamtproduktbildung waren: Es wurde ein apparenter V_{max} -Wert von $23,7 \pm 2,1$ nmol P4/nmol CYP109E1/min, ein apparenter K_{M} -Wert von $45,3 \pm 6,0$ μM und eine Hill Konstante (n) von $1,82 \pm 0,3$ berechnet.

3.7.3. Kinetische Analyse des CYP109A2-abhängigen Vitamin D3 Umsatzes

Zur Bestimmung der Enzymaktivität von CYP109A2 wurde das Substrat Vitamin D3 in Konzentrationen von 0 bis 150 μM zugegeben und die Daten mittels sigmoidaler Regression ausgewertet. Für die katalytische Aktivität der CYP109A2-abhängigen Vitamin D3 Umsetzung wurde ein V_{max} von $263,8 \pm 17,9$ pmol Produkte pro nmol CYP109A2 pro Minute, ein K_{M} von $32,8 \pm 4,1$ μM und eine Hill Konstante (n) von $1,80 \pm 0,33$ berechnet (Abb. 3.33). Für $V_{\text{max}}/K_{\text{M}}$ ergab sich ein Wert von $134 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

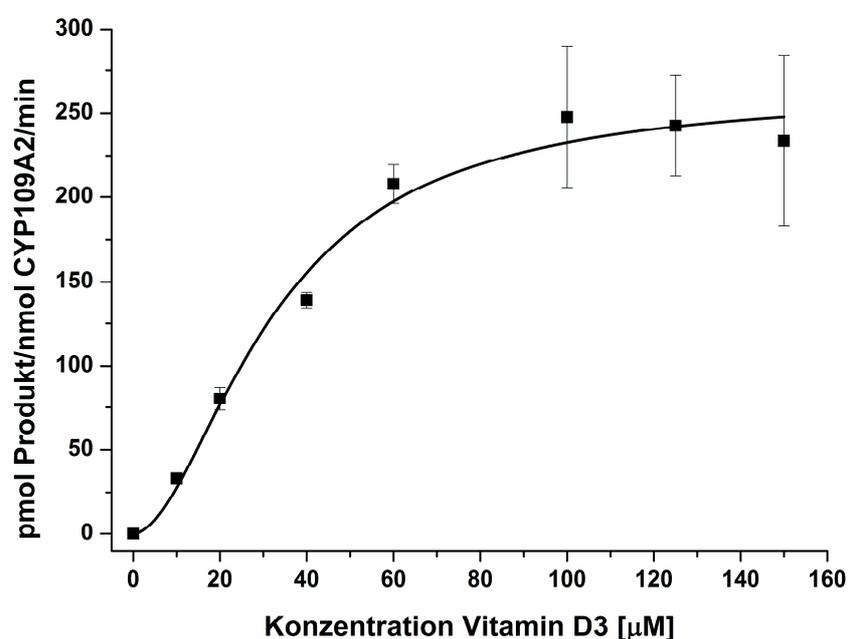


Abb. 3.33: Bestimmung kinetischer Parameter für den durch CYP109A2 katalysierten Umsatz von Vitamin D3. Die Reaktionen wurden in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20% Glycerin bei 30°C für 30 min mit 1,5 μM Arh1, 10 μM Fdx3 und 0,5 μM CYP109A2 durchgeführt. Die Vitamin D3-Konzentrationen reichten von 0-150 μM . Jede Reaktion wurde in Triplikaten durchgeführt und die jeweiligen Mittelwerte wurden berechnet. Die erhaltenen Daten wurden mittels sigmoidaler Regression ausgewertet.

3.8. Quantitative Real-Time Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)

Anhand von *in vitro* Rekonstitutionsassays konnte gezeigt werden, dass Fld, Fdx2, Fdx3 und Fdx4 in der Lage waren, *in vitro* die Aktivität der Cytochrome P450 zu unterstützen und es sich bei diesen Proteinen damit um potentielle natürliche Redoxpartner der Cytochrome handelt. Das nächste Ziel bestand daher darin, weitere Einblicke in die mutmaßliche physiologische Relevanz dieser beobachteten Wechselwirkung zu erhalten. Dazu sollte die Expression der Cytochrome P450 und die der autologen Redoxpartner mittels quantitativer real-time Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR) auf mRNA-Ebene untersucht werden. Hierfür wurden *B. megaterium* MS941 Zellen unter ausreichender Eisenversorgung (+Fe) und unter Eisenmangel Bedingungen (-Fe) kultiviert. Nach Extraktion der Gesamt-RNA und cDNA-Synthese wurde die qRT-PCR durchgeführt, um die Expression der sieben Gene in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration vergleichen zu können.

CYP106A1 zeigte bei Eisenmangel das gleiche Expressionslevel wie bei ausreichender Eisenversorgung, während CYP109E1 bei Fehlen von Eisen eine deutlich höhere Expression aufwies als beim Vorhandensein von Eisen. Im Gegensatz dazu wurde CYP109A2 unter Eisenmangel schwächer exprimiert als unter ausreichender Eisenversorgung. Auch bei Betrachtung der Redoxpartner zeigten sich Unterschiede: Fld wurde bei 0 μM Fe im Vergleich zu 25 μM Fe hochreguliert. Fdx4 wurde hingegen nur bei ausreichender Eisenversorgung exprimiert, während bei Eisenmangel keine Fdx4-Expression detektiert werden konnte. Bei den in diesem Experiment gewählten Bedingungen konnten für Fdx2 und Fdx3 keine Signale erhalten werden; weder bei Eisenmangel noch bei einer höheren Eisenkonzentration. Die Expressionswerte aller Gene sind zum besseren Vergleich in Tab. 3.8.1 und Abb. 3.34 zusammengefasst. Da der CYP109E1-Wert bei Eisenmangel wesentlich höher ist als alle übrigen Werte, wurden in Abb. 3.34 zwei unterschiedliche Skalierungen der y-Achse gewählt, so dass die kleineren Werte besser unterschieden werden können.

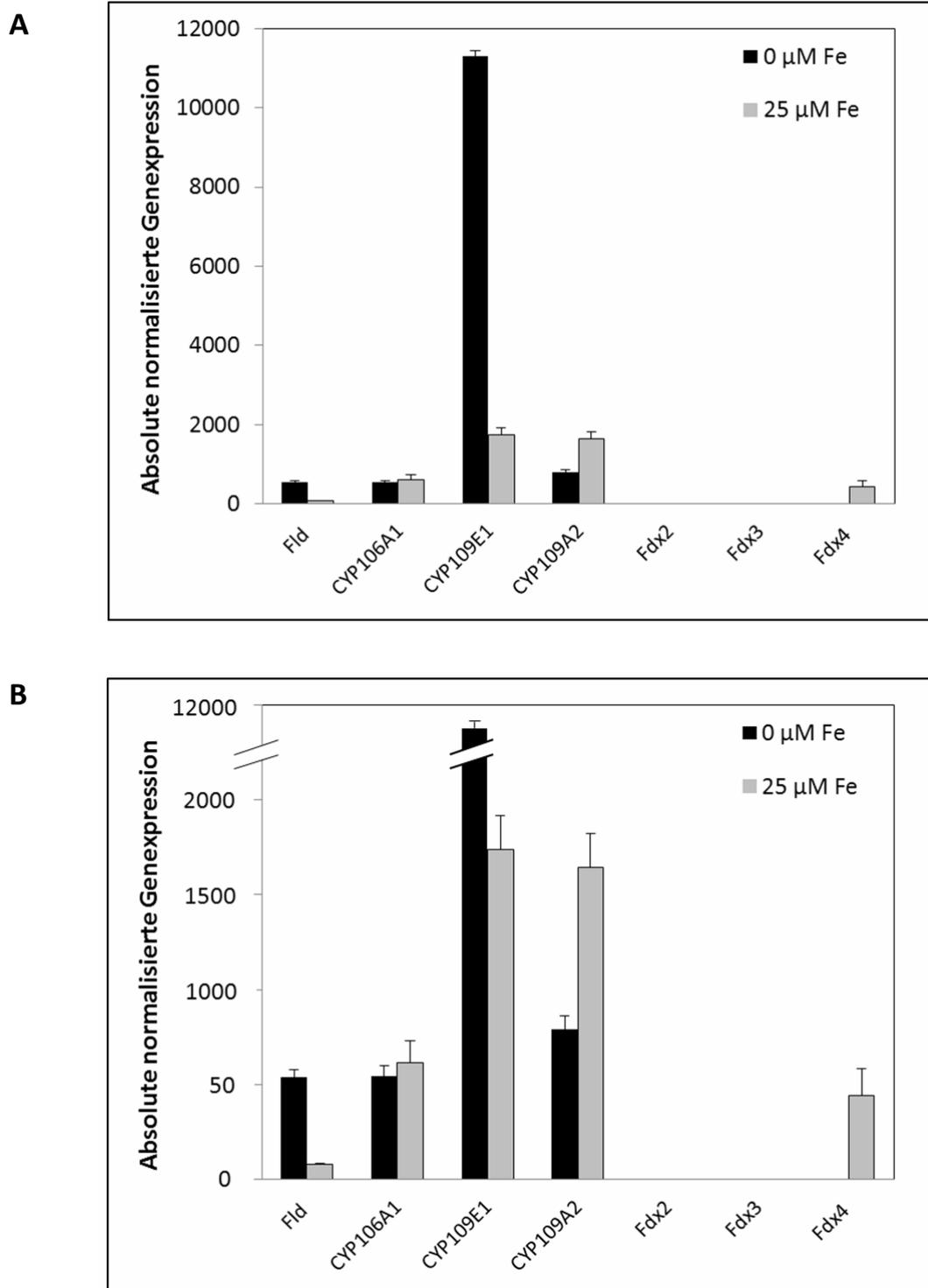


Abb. 3.34: Expressionsanalyse der Gene, die Fld, CYP106A1, CYP109E1, CYP109A2, Fdx2, Fdx3 und Fdx4 aus *B. megaterium* DSM319 kodieren, mittels quantitativer real-time Reverse Transkriptase PCR. Die *B. megaterium* Zellen wurden unter Eisenmangel (0 $\mu\text{M Fe}$) und unter ausreichender Eisenversorgung (25 $\mu\text{M Fe}$) kultiviert. Nach Extraktion der Gesamt-RNA und cDNA-Synthese wurde die Expression der Gene mittels qRT-PCR untersucht. Die Kultivierung und alle weiteren Schritten erfolgten für jede Eisenkonzentration in Triplikaten. Fld, CYP109E1, CYP109A2 und Fdx4 zeigten zwischen den beiden Eisenkonzentrationen statistisch signifikante Unterschiede in den Expressionslevels. Zur besseren Darstellung der kleineren Werte wurde in B die Skalierung der y-Achse geändert.

Tab. 3.8.1: Expressionsanalyse mittels quantitativer real-time Reverse Transkriptase PCR zum Vergleich der Expression der sieben angegebenen Gene bei Eisenmangel (0 μM Fe) und bei ausreichender Eisenversorgung (25 μM Fe).

Angegeben ist die absolute initiale Startmenge des jeweiligen Transkriptes. Für jede Eisenkonzentration wurden drei voneinander unabhängige Kulturen verwendet und die jeweiligen Mittelwerte wurden bestimmt.

Gen	0 μM Fe	25 μM Fe
Fld	538 \pm 41	78 \pm 6
CYP106A1	545 \pm 54	613 \pm 120
CYP109E1	11300 \pm 143	1736 \pm 183
CYP109A2	793 \pm 71	1643 \pm 180
Fdx2	0 \pm 0	0 \pm 0
Fdx3	0 \pm 0	0 \pm 0
Fdx4	0 \pm 0	443 \pm 142

3.9. *Bacillus megaterium* MS941 Ganzzellsystem

Nach der erfolgreichen Identifizierung von Substraten für alle drei Cytochrome P450 war das nächste Ziel, ausreichende Mengen der Reaktionsprodukte zur Verfügung zu stellen, um die Produkte mittels NMR Spektroskopie strukturell zu charakterisieren. Kürzlich wurde in unserem Arbeitskreis ein durch Xylose induzierbares, rekombinantes Ganzzell-System für die Expression von Cytochrom P450 Systemen in *B. megaterium* MS941 entwickelt (Bleif et al. 2012). Um dieses Ganzzell-System auch in dieser Arbeit einsetzen zu können, wurden für jedes Cytochrom verschiedene Plasmide konstruiert: Zum einen wurden Plasmide hergestellt, die nur das jeweilige Cytochrom P450 unter Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors

enthalten (pSMF2.1B, pSMF2.1E bzw. pSMF2.1A). Zum anderen wurden tricistronische Vektoren konstruiert, die das jeweilige Cytochrom P450 sowie die Redoxpartner Arh1 und Fld, Fdx2, Fdx3 oder Fdx4 beinhaltenen, so dass für jedes Cytochrom fünf verschiedene Ganzzell-Vektoren zur Verfügung standen.

3.9.1. Expression der Cytochrome P450 und der Redoxproteine in *Bacillus megaterium* MS941

Die konstruierten Vektoren wurden mittels Protoplastentransformation in *B. megaterium* MS941 eingebracht und die Proteinexpression durch die Zugabe von Xylose induziert. Nach einer 24-stündigen Expressionszeit wurden die Kulturen geerntet und die Zellen aufgeschlossen, um die Expression aller Proteine mittels Western Blot bzw. SDS-PAGE überprüfen zu können. Eine Western Blot-Analyse mit einem polyklonalen, gegen CYP106A1 gerichteten Antikörper zeigte, dass CYP106A1 in allen Stämmen erfolgreich exprimiert werden konnte (Abb. 3.35A). Da für CYP109E1 und CYP109A2 keine Antikörper zur Verfügung standen, erfolgte der Nachweis der Expression mittels SDS-PAGE: In allen transformierten Stämmen trat eine Proteinbande auf, die in der Negativkontrolle (*B. megaterium* MS941 transformiert mit pSMF2.1) nicht vorhanden war (Abb. 3.35BC). Anhand eines polyklonalen, gegen Arh1 gerichteten Antikörpers konnte auch die Überexpression von Arh1 in allen Stämmen bewiesen werden (Abb. 3.36ABC). Der Nachweis der erfolgreichen Expression der drei Ferredoxine erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen, gegen His₆ gerichteten Antikörpers (Abb. 3.37ABC). Darüber hinaus war auch die Überexpression des Flavodoxins in allen drei Stämmen erfolgreich (Abb. 3.38).

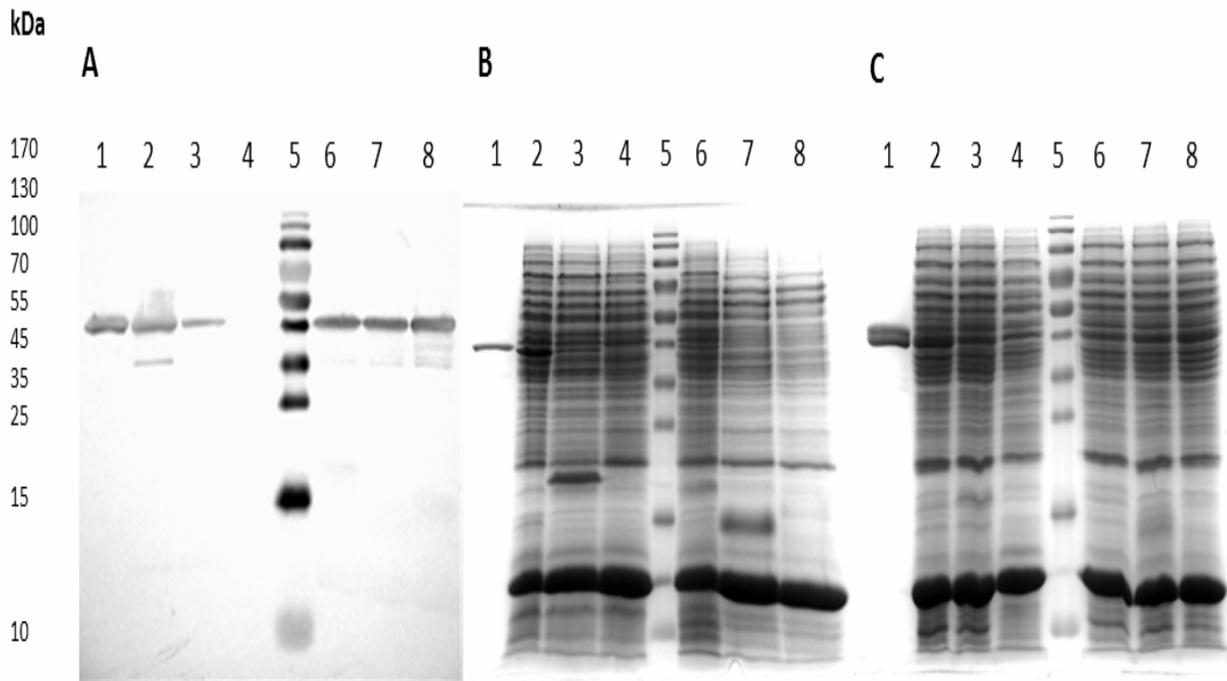


Abb. 3.35: Western Blot Analyse mit einem polyklonalen, gegen CYP106A1 gerichteten Antikörper (A) und SDS-Gele zum Nachweis der Expression von CYP109E1 (B) und CYP109A2 (C). Spur 1: Probe des gereinigten Proteins (Positivkontrolle). Spur 2: Lysat des *B. megaterium* Stammes, der nur das Cytochrom P450 exprimiert, 24 h nach Induktion. Spur 3: Lysat des *B. megaterium* Stammes, der das jeweilige Cytochrom P450, Arh1 und Fld exprimiert, 24 h nach Induktion. Spur 4: Lysat von *B. megaterium*, transformiert mit pSMF2.1 (Negativkontrolle). Spur 5: Proteinmarker. Spur 6: Lysat des *B. megaterium* Stammes, der das jeweilige Cytochrom P450, Arh1 und Fdx2 exprimiert, 24 h nach Induktion. Spur 7: Lysat des *B. megaterium* Stammes, der das jeweilige Cytochrom P450, Arh1 und Fdx3 exprimiert, 24 h nach Induktion. Spur 8: Lysat des *B. megaterium* Stammes, der das jeweilige Cytochrom P450, Arh1 und Fdx4 exprimiert, 24 h nach Induktion.

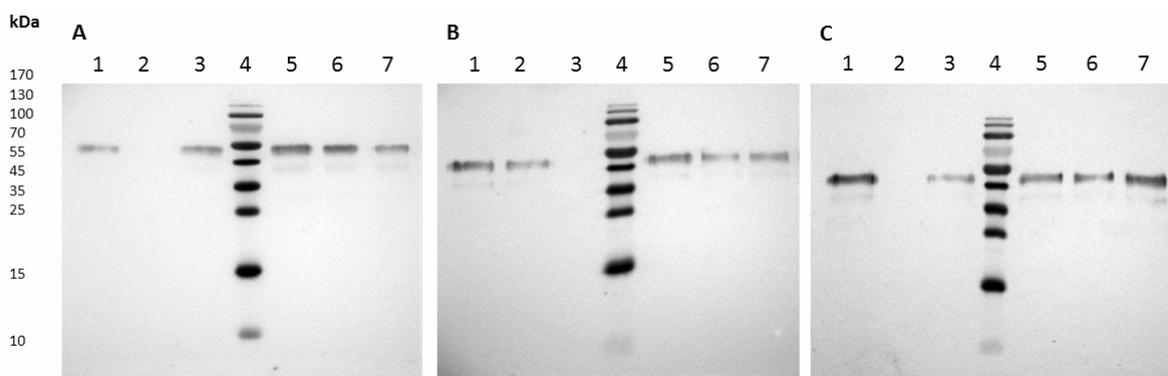


Abb. 3.36: Western Blot Analyse mit einem polyklonalen, gegen Arh1 gerichteten Antikörper in den *B. megaterium* Stämmen, die Cytochrom P450-Systeme des CYP106A1- (A), CYP109E1- (B) und CYP109A2-Typs (C) überexprimieren. Spur 1: Probe des gereinigten Proteins Arh1 (Positivkontrolle). Spur 2: Lysat von *B. megaterium*, transformiert mit pSMF2.1 (Negativkontrolle) in (A) und (C); Lysat des *B. megaterium* Stammes, der CYP109E1, Arh1 und Fld exprimiert, 24 h nach Induktion, in (B). Spur 3: Lysat des *B. megaterium* Stammes, der das jeweilige Cytochrom P450, Arh1 und Fld exprimiert, 24 h nach Induktion in (A) und (C); Lysat von *B. megaterium*, transformiert mit pSMF2.1 (Negativkontrolle) in (B). Spur 4: Proteinmarker. Spur 5: Lysat des *B. megaterium* Stammes, der das jeweilige Cytochrom P450, Arh1 und Fdx2 exprimiert, 24 h nach Induktion. Spur 6: Lysat des *B. megaterium* Stammes, der das jeweilige Cytochrom P450, Arh1 und Fdx3 exprimiert, 24 h nach Induktion. Spur 7: Lysat des *B. megaterium* Stammes, der das jeweilige Cytochrom P450, Arh1 und Fdx4 exprimiert, 24 h nach Induktion.

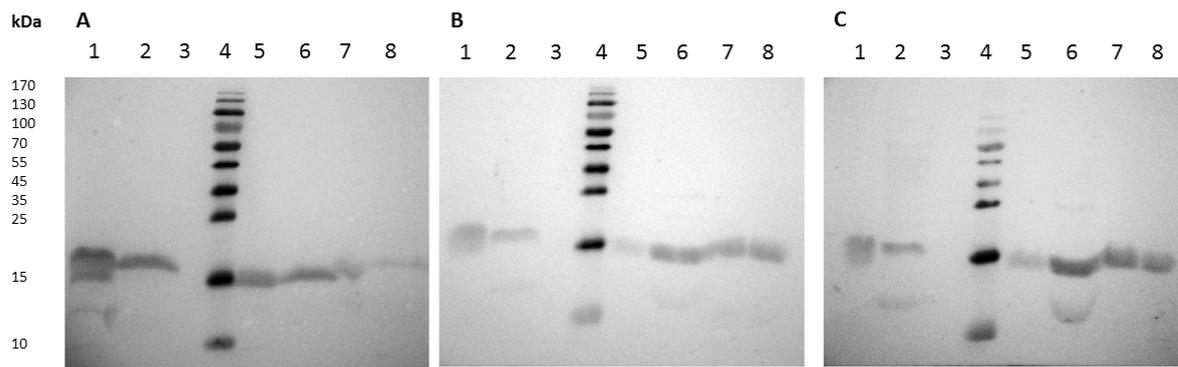


Abb. 3.37: Western Blot Analyse mit einem monoklonalen, gegen His₆ gerichteten Antikörper in den *B. megaterium* Stämmen, die Cytochrom P450-Systeme des CYP106A1- (A), CYP109E1- (B) und CYP109A2- Typs (C) überexprimieren. Spur 1: Probe des gereinigten Proteins Fdx2. Spur 2: Lysat des *B. megaterium* Stammes, der das jeweilige Cytochrom P450, Arh1 und Fdx2 exprimiert, 24 h nach Induktion. Spur 3: Lysat von *B. megaterium*, transformiert mit pSMF2.1 (Negativkontrolle). Spur 4: Proteinmarker. Spur 5: Probe des gereinigten Proteins Fdx3. Spur 6: Lysat des *B. megaterium* Stammes, der das jeweilige Cytochrom P450, Arh1 und Fdx3 exprimiert, 24 h nach Induktion. Spur 7: Probe des gereinigten Proteins Fdx4. Spur 8: Lysat des *B. megaterium* Stammes, der das jeweilige Cytochrom P450, Arh1 und Fdx4 exprimiert, 24 h nach Induktion.

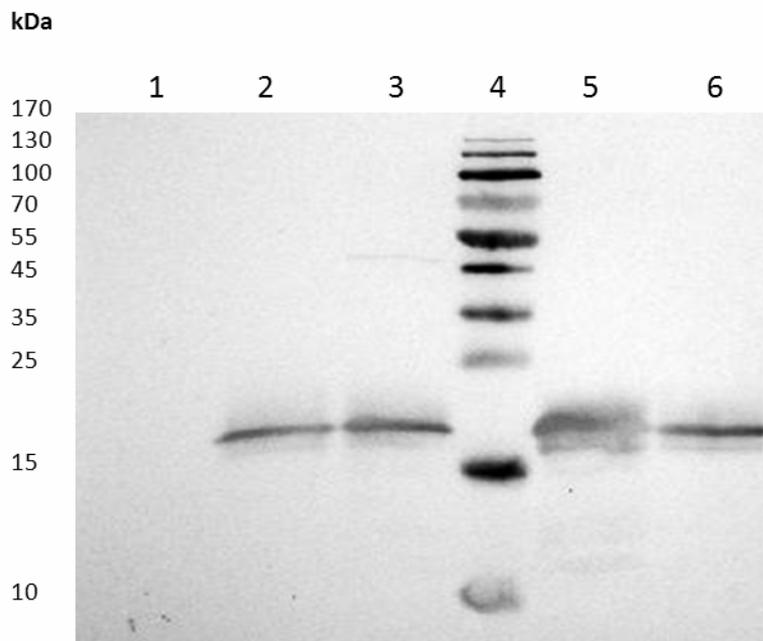


Abb. 3.38: Western Blot Analyse mit einem polyklonalen, gegen Fld gerichteten Antikörper. Spur 1: Lysat von *B. megaterium*, transformiert mit pSMF2.1 (Negativkontrolle). Spur 2: Probe des gereinigten Proteins Fld (Positivkontrolle). Spur 3: Lysat von *B. megaterium*, transformiert mit pSMF2.1BAFId, 24 h nach Induktion. Spur 4: Proteinmarker. Spur 5: Lysat von *B. megaterium*, transformiert mit pSMF2.1EAFId, 24 h nach Induktion. Spur 6: Lysat von *B. megaterium*, transformiert mit pSMF2.1AAFId, 24 h nach Induktion.

3.9.2. Ganzzellumsätze in *Bacillus megaterium* MS941

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass alle Cytochrome P450 und deren Redoxpartner in *B. megaterium* MS941 exprimiert werden, wurde als nächstes untersucht, ob die rekombinanten Ganzzell Biokatalysatoren in der Lage sind, die identifizierten Substrate umzusetzen. Dazu wurden die *B. megaterium* Kulturen 24 h nach Induktion mit den jeweiligen Substraten versetzt und der Substratumsatz mittels HPLC analysiert. Ein Stamm, der nur den Vektor pSMF2.1 enthielt, wurde für alle Umsätze als Negativkontrolle eingesetzt.

3.9.2.1 CYP106A1-basierte Ganzzellumsätze

Da es sich bei KBA um das einzige Substrat handelte, das von CYP106A1 zu neuen, bisher unbekanntem Produkten umgesetzt wurde, wurden die CYP106A1-basierten Ganzzell-Umsätze ausschließlich mit dem Substrat KBA durchgeführt. KBA wurde in einer Endkonzentration von 100 μM zugegeben und nach 3 h wurden Proben entnommen, extrahiert und mittels HPLC analysiert. Die *B. megaterium* Stämme, die nur CYP106A1 bzw. CYP106A1 zusammen mit den Redoxpartnern exprimierten, setzten KBA zu dem gleichen HPLC Produktmuster um wie in dem *in vitro* Assay unter Verwendung gereinigter Proteine (Abb. 3.38, vgl. Abb. 3.19). Die Negativkontrolle, *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1 enthielten, zeigten keinen Umsatz von KBA (Abb. 3.39).

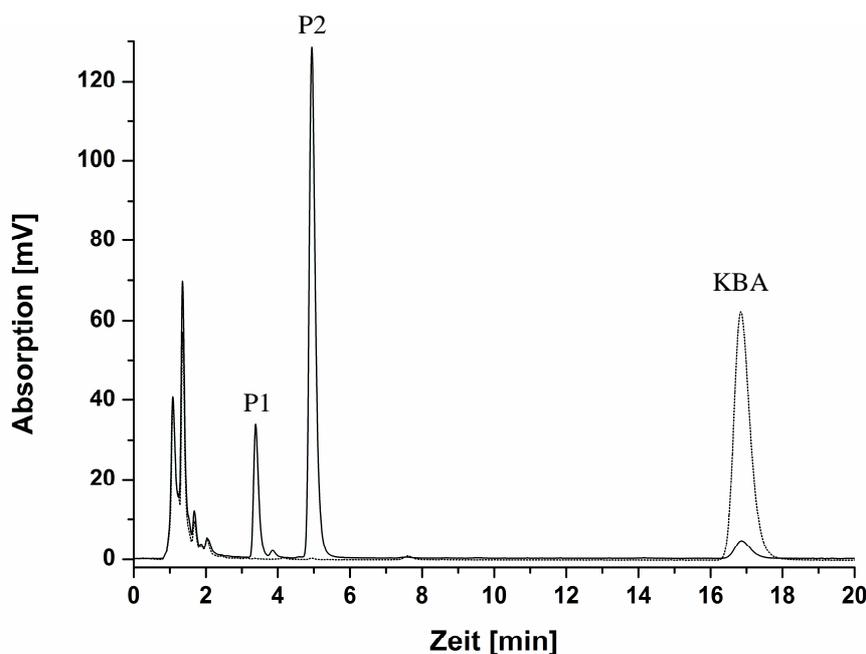


Abb. 3.39: HPLC Chromatogramme des *in vivo* Umsatzes von KBA mit rekombinanten *B. megaterium* MS941 Stämmen. *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1B enthielten (kompakt), setzten KBA zu dem Nebenprodukt P1 und dem Hauptprodukt P2 um. Die Negativkontrolle, *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1 enthielten (gepunktet), zeigten keinen Umsatz von KBA. Die Reaktionen wurden in 25 ml Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 bei 30°C für 3 h mit 100 μ M KBA durchgeführt.

3.9.2.2 CYP109E1-basierte Ganzzellumsätze

Bei CYP109E1 handelt es sich um ein neues, bislang unbekanntes Cytochrom P450, das in dieser Arbeit zum ersten Mal kloniert und charakterisiert wurde. Zudem waren für den Großteil der Substrate von CYP109E1 keine Produktstandards vorhanden. Deshalb wurden alle identifizierten Substrate *in vivo* umgesetzt, um eine Produktcharakterisierung mittels NMR zu ermöglichen. 300 μ M Isolongifolen-9-on konnten *in vivo* von einem CYP109E1-überexprimierenden *B. megaterium* Stamm (pSMF2.1E) innerhalb von 4 h fast vollständig zu dem Hauptprodukt P1 und den Nebenprodukten P2-4 konvertiert werden (Abb. 3.40), wobei dieses Produktmuster auch *in vitro* beobachtet wurde (Abb. 3.21). Auch für Nootkaton (300 μ M) war die Umsetzung durch einen *B. megaterium* Stamm, der das Plasmid pSMF2.1E enthält, erfolgreich (Abb. 3.41) und bezüglich des Produktmusters mit dem Hauptprodukt P1 und den Nebenprodukten P2-4 mit den *in vitro* Umsätzen übereinstimmend (Abb. 3.22). Dieser *B. megaterium* Stamm war auch in der Lage, 300 μ M Testosteron innerhalb von 6 h

nahezu vollständig zu dem hydrophileren Hauptprodukt P1 und dem hydrophoberen Nebenprodukt P2 umzusetzen (Abb. 3.42). Dieses Produktmuster lag auch bei einem *in vitro* Umsatz von Testosteron durch CYP109E2 mit gereinigten Enzymen vor (Abb. 3.23). Im Falle von Vitamin D3 war eine Solubilisierung dieser sehr hydrophoben Substanz mit Cyclodextrin und eine Erhöhung der Membrandurchlässigkeit durch Saponin notwendig, um den Eintritt des Substrates in die *B. megaterium* Zellen und damit den Substratumsatz zu verbessern (Kleser 2011). Mit Hilfe dieser Substanzen war die Umsetzung von 200 μ M Vitamin D3 innerhalb von 6 h durch einen CYP109E1-überexprimierenden *B. megaterium* Stamm (pSMF2.1E) erfolgreich: Wie schon *in vitro* (Abb. 3.24) wurden *in vivo* fünf Vitamin D3-Produkte gebildet (Abb. 3.43), wobei P1 und P4 mit den Standards 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D3 bzw. 25-Hydroxy-Vitamin D3 überlagerten (Abb. 3.24). Für alle vier Substrate zeigte die Negativkontrolle, *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1 enthielten, unter den untersuchten Bedingungen keinen bzw. nur einen sehr schwachen Umsatz der jeweiligen Substrate. Zudem zeigten alle fünf konstruierten *B. megaterium* Ganzzell Biokatalysatoren, die entweder nur CYP109E1 oder CYP109E1 und die Redoxpartner (Arh1 und Fld, Fdx2, Fdx3 oder Fdx4) exprimierten, für alle Substrate das gleiche Produktmuster. Aus diesem Grund wurde für jeden Ganzzell Umsatz exemplarisch nur das HPLC-Chromatogramm des CYP109E1-überexprimierenden *B. megaterium* Stammes gezeigt.

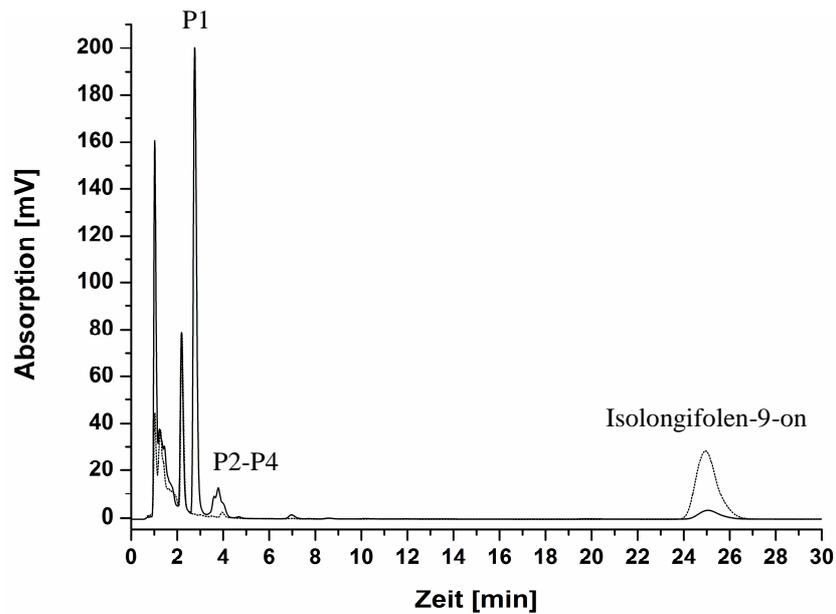


Abb. 3.40: HPLC Chromatogramme des *in vivo* Umsatzes von Isolongifolen-9-on mit rekombinanten *B. megaterium* MS941 Stämmen. *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1E enthielten (kompakt), setzten Isolongifolen-9-on zu dem Hauptprodukt P1 und den Nebenprodukten P2-4 um. Die Negativkontrolle, *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1 enthielten (gepunktet), zeigten keinen Umsatz von Isolongifolen-9-on. Die Reaktionen wurden in 25 ml Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 bei 30°C für 4 h mit 300 μ M Isolongifolen-9-on durchgeführt.

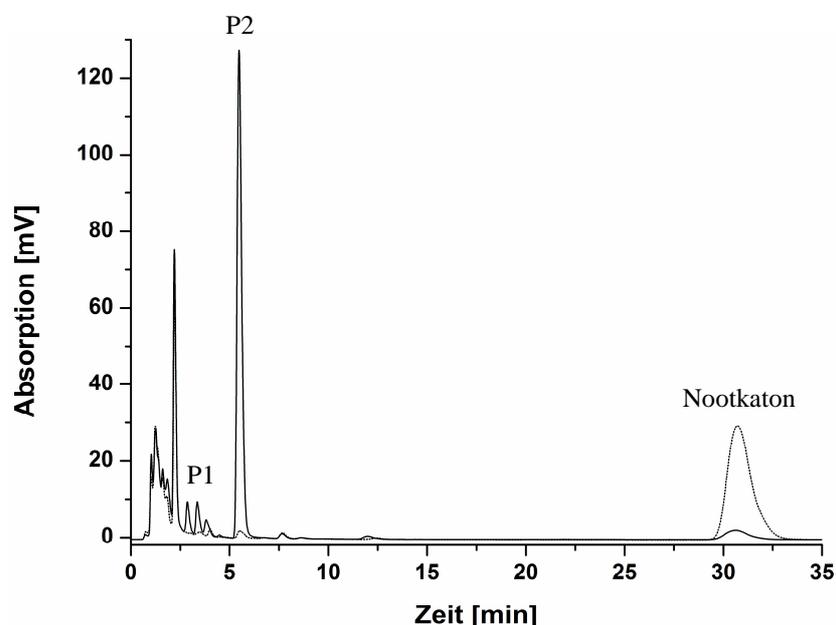


Abb. 3.41: HPLC Chromatogramme des *in vivo* Umsatzes von Nootkaton mit rekombinanten *B. megaterium* MS941 Stämmen. *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1E enthielten (kompakt), setzten Nootkaton zu dem Nebenprodukt P1 und dem Hauptprodukt P2 um. Die Negativkontrolle, *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1 enthielten (gepunktet), zeigten keinen Umsatz von Nootkaton. Die Reaktionen wurden in 25 ml Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 bei 30°C für 4 h mit 300 μ M Nootkaton durchgeführt.

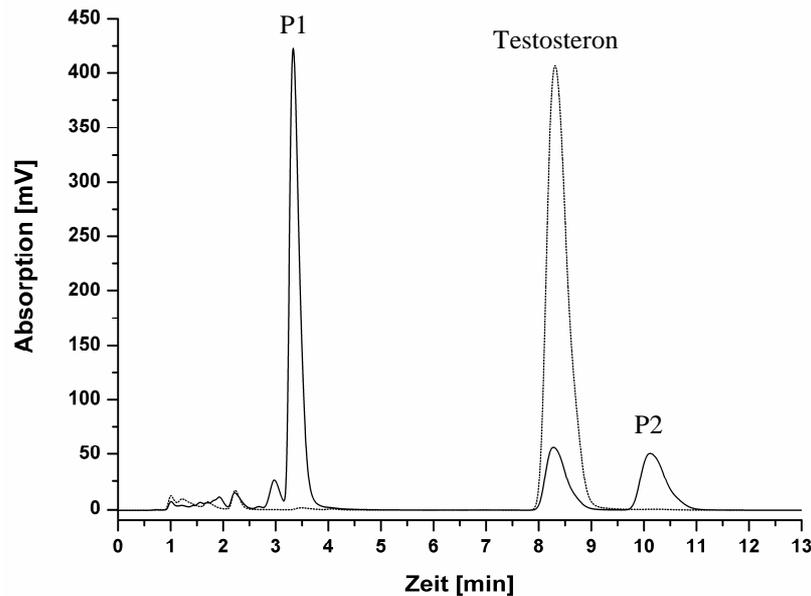


Abb. 3.42: HPLC Chromatogramme des *in vivo* Umsatzes von Testosteron mit rekombinanten *B. megaterium* MS941 Stämmen. *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1E enthielten (kompakt), setzten Testosteron zu dem Hauptprodukt P1 und dem Nebenprodukt P2 um. Die Negativkontrolle, *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1 enthielten (gepunktet), zeigten keinen Umsatz von Testosteron. Die Reaktionen wurden in 25 ml Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 bei 30°C für 6 h mit 300 μ M Testosteron durchgeführt.

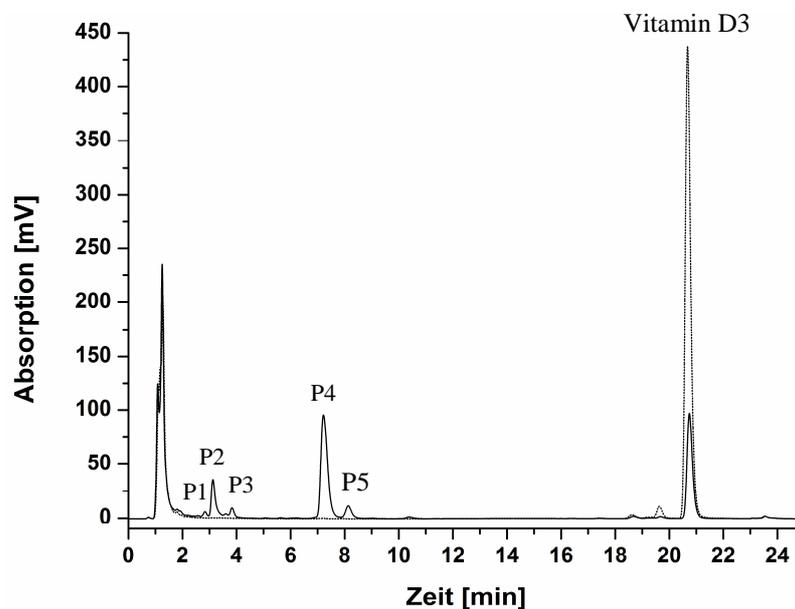


Abb. 3.43: HPLC Chromatogramme des *in vivo* Umsatzes von Vitamin D3 mit rekombinanten *B. megaterium* MS941 Stämmen. *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1E enthielten (kompakt), setzten Vitamin D3 zu dem Hauptprodukt P4 und den Nebenprodukten P1-P3 und P5 um. Die Negativkontrolle, *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1 enthielten (gepunktet), zeigten keinen Umsatz von Vitamin D3. Die Reaktionen wurden in TB-Medium bei 30°C für 6 h mit 200 μ M Vitamin D3 durchgeführt.

3.9.2.3 CYP109A2-basierte Ganzzellumsätze

Nach der erfolgreichen Umsetzung von Vitamin D3 durch einen CYP109E1-exprimierenden Stamm, wurde untersucht, ob dies *in vivo* ebenso mit CYP109A2 möglich ist. 200 μ M Vitamin D3 wurde von allen fünf Stämmen, die CYP109A2 überexprimierten, in 24 h zu einem Produkt umgesetzt wie in Abb. 3.44 exemplarisch für den pSMF2.1A enthaltenden Stamm dargestellt. Dieses Produkt trat auch *in vitro* auf und überlagerte mit dem Standard 25-Hydroxy-Vitamin D3 (Abb. 3.26). Wie schon in Abb. 3.43 erkennbar, trat bei der Negativkontrolle kein Umsatz von Vitamin D3 auf.

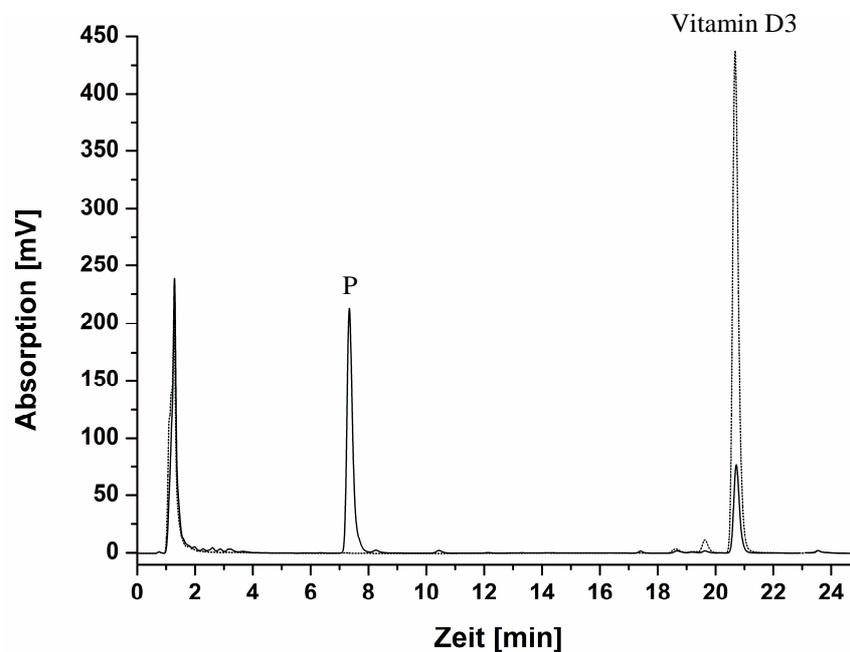


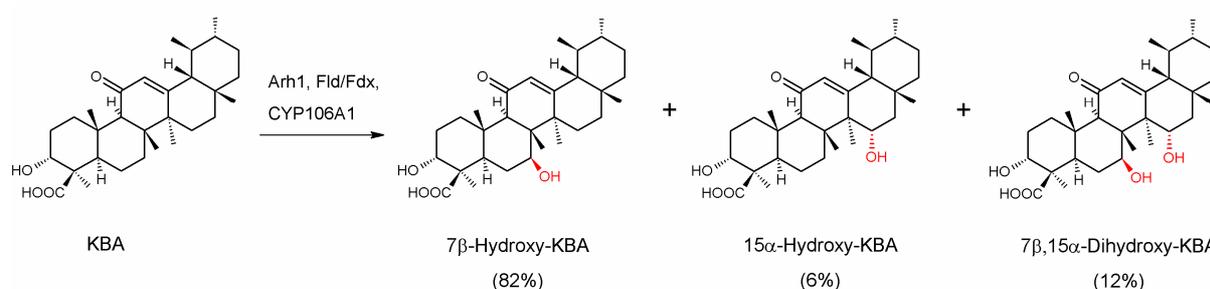
Abb. 3.44: HPLC Chromatogramme des *in vivo* Umsatzes von Vitamin D3 mit rekombinanten *B. megaterium* MS941 Stämmen. *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1A enthielten (kompakt), setzten Vitamin D3 zu dem Produkt P um. Die Negativkontrolle, *B. megaterium* MS941 Zellen, die das Plasmid pSMF2.1 enthielten (gepunktet), zeigten keinen Umsatz von Vitamin D3. Die Reaktionen wurden in TB-Medium bei 30°C für 24 h mit 200 μ M Vitamin D3 durchgeführt.

3.10. NMR Charakterisierung der Umsatzprodukte

Nachdem alle Substrate durch die Cytochrom P450 Ganzzellsysteme erfolgreich umgesetzt werden konnten, sollten in einem nächsten Schritt durch Erhöhung des Kultivierungsmaßstabs (Upscale) ausreichende Mengen der Reaktionsprodukte für eine Strukturaufklärung mittels NMR Spektroskopie zur Verfügung gestellt werden. Die Inkubation und Induktion erfolgten wie zuvor für die Ganzzellumsätze beschrieben, wobei der Substratumsatz jeweils in Kaliumphosphatpuffer durchgeführt wurde. Nach individuellen Umsatzzeiten wurden die Kulturen mit Ethylacetat extrahiert und die Extrakte anschließend mittels HPLC gereinigt. Die NMR-Daten der jeweiligen Produkte sind dem Anhang zu entnehmen.

3.10.1. Produktcharakterisierung des CYP106A1-abhängigen KBA Umsatzes

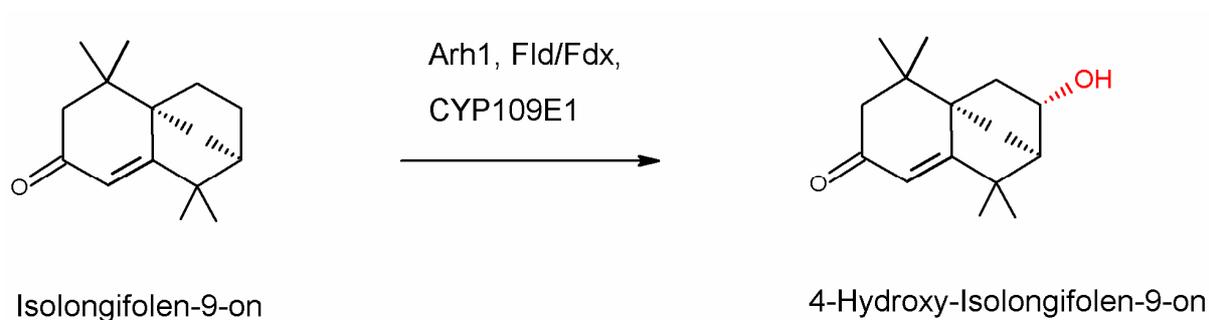
Der Ganzzellumsatz von 100 μM KBA (18 mg) wurde für 3 h mit dem CYP106A1 exprimierenden *B. megaterium* Stamm (pSMF2.1B) durchgeführt. Die anschließende Reinigung des Extraktes mittels HPLC führte zu zwei Fraktionen P1 (4 mg) und P2 (12 mg), die den beiden Produkten des CYP106A1-abhängigen *in vitro* KBA Umsatzes entsprachen. Bei P2 handelte es sich um eine reine Substanz, deren Struktur als 7 β -Hydroxy-KBA bestimmt werden konnte (Brill et al. 2013). P1 stellte eine 2:1 Mischung aus zwei ähnlichen Substanzen dar, wobei das Nebenprodukt dieses Gemisches als 15 α -Hydroxy-KBA identifiziert werden konnte, welche kürzlich von unserer Gruppe zum ersten Mal beschrieben wurde (Bleif et al. 2012). Die NMR Analyse des Hauptproduktes des Gemisches ergab die Substanz 7 β ,15 α -Dihydroxy-KBA (Brill et al. 2013). Die Ergebnisse der CYP106A1-abhängigen KBA Umsetzung sind in Schema 1 zusammengefasst.



Schema 1: Reaktionsgleichung der CYP106A1-abhängigen KBA Umsetzung. Die durch die Reaktion eingeführten Hydroxy-Gruppen sind rot markiert.

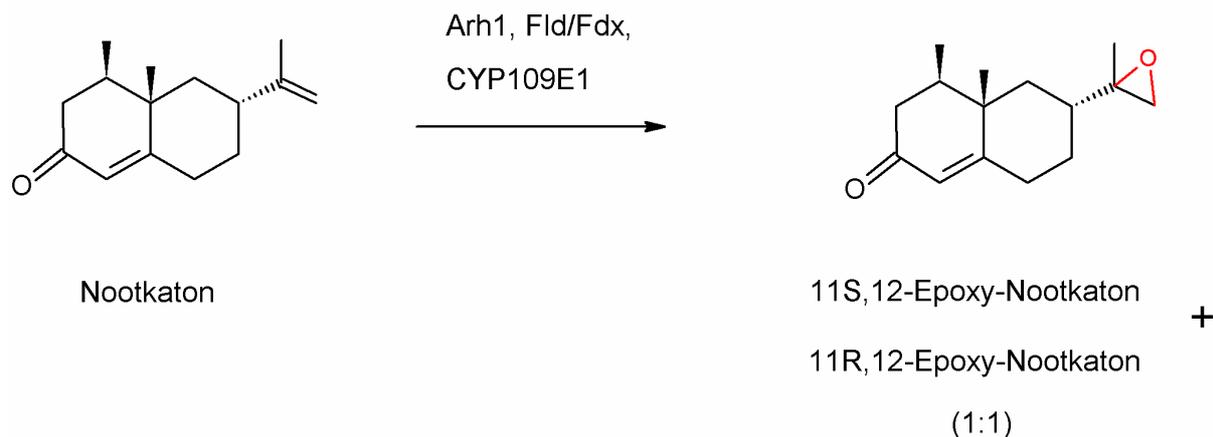
3.10.2. Produktcharakterisierung der CYP109E1- und CYP109A2-abhängigen Substratumsätze

Die Ganzzellumsätze erfolgten mit den beiden Stämmen, die CYP109E1 bzw. CYP109A2 exprimierten (pSMF2.1E bzw. pSMF2.1A). Durch das CYP109E1 Ganzzellsystem wurden 300 μ M Isolongifolen-9-on (19 mg) nach 4 h zu einem Haupt- und drei Nebenprodukten umgesetzt. Bei dem Hauptprodukt (16 mg) handelte es sich um (4R)-4-Hydroxy-Isolongifolen-9-on (Schema 2), wohingegen die Mengen der Nebenprodukte für eine Strukturaufklärung mittels NMR zu gering waren.



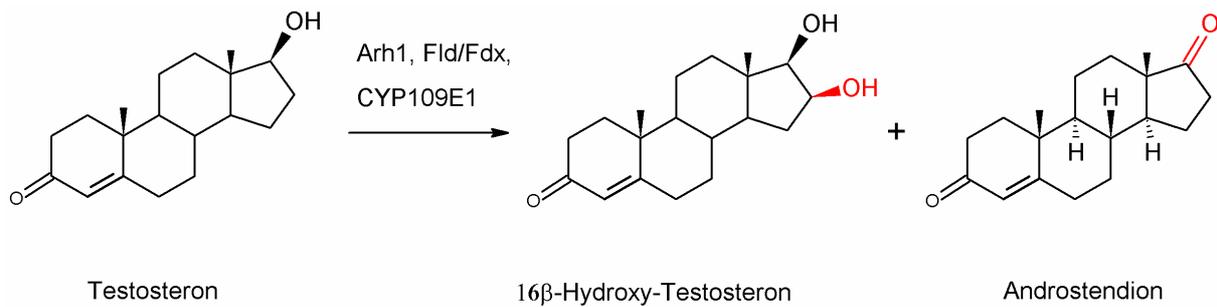
Schema 2: Reaktionsgleichung der CYP109E1-abhängigen Isolongifolen-9-on Umsetzung. Die durch die Reaktion eingeführte Hydroxy-Gruppe ist rot markiert.

Die Umsetzung von 300 μ M Nootkaton (19 mg) führte nach 4 h zu einem Hauptprodukt (11 mg), das mittels NMR-Spektroskopie als eine 1:1 Mischung aus den beiden C11-Epimeren (4R,5S,7R,11S)-11,12-Epoxy-Nootkaton und (4R,5S,7R,11R)-11,12-Epoxy-Nootkaton identifiziert werden konnte (Schema 3). Auch für Nootkaton war die Menge des Nebenproduktes zu gering, um eine Strukturaufklärung mittels NMR zu ermöglichen.



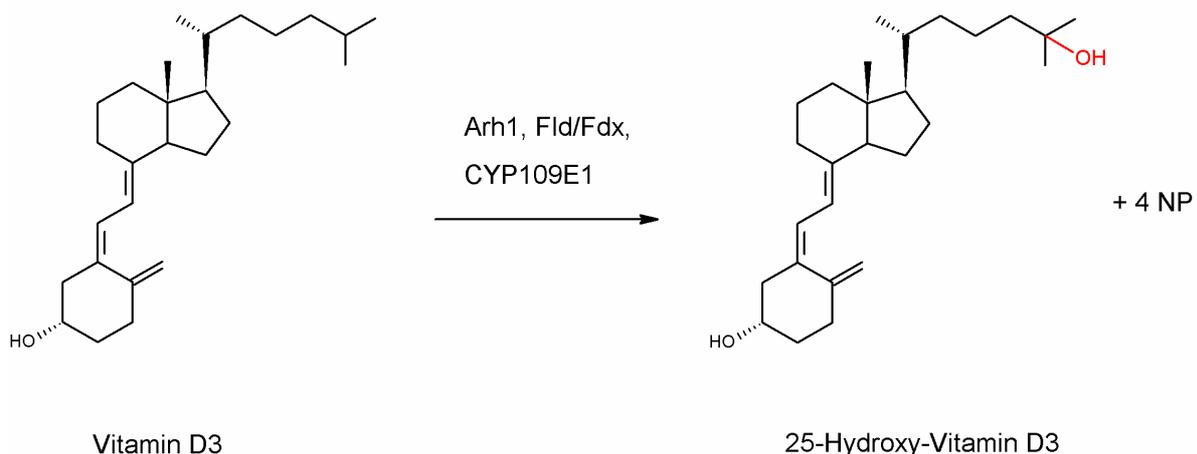
Schema 3: Reaktionsgleichung der CYP109E1-abhängigen Nootkaton Umsetzung. Die durch die Reaktion eingeführte Epoxid-Gruppe ist rot markiert.

300 μ M Testosteron (26 mg) wurden durch das CYP109E1 Ganzzellsystem innerhalb von 6 h zu einem Haupt- (19 mg) und einem Nebenprodukt (5 mg) umgesetzt. Die Strukturaufklärung mittels NMR wies nach, dass es sich bei dem Hauptprodukt um 16 β -Hydroxy-Testosteron und bei dem Nebenprodukt um Androstendion handelte (Schema 4). Die Umsetzung von Testosteron zu 16 β -Hydroxy-Testosteron und Androstendion warf die Frage auf, ob beide Produkte unabhängig voneinander entstehen oder ob Androstendion beispielsweise durch Wasserabspaltung aus 16 β -Hydroxy-Testosteron entsteht. Um Hinweise auf den zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus zu erhalten, wurden *in vitro* und *in vivo* Umsätze mit CYP109E1 und 16 β -Hydroxy-Testosteron als Substrat durchgeführt. Da dabei keine Produktbildung erfolgte (Daten nicht gezeigt), kann davon ausgegangen werden, dass 16 β -Hydroxy-Testosteron und Androstendion unabhängig voneinander von CYP109E1 aus Testosteron gebildet werden.

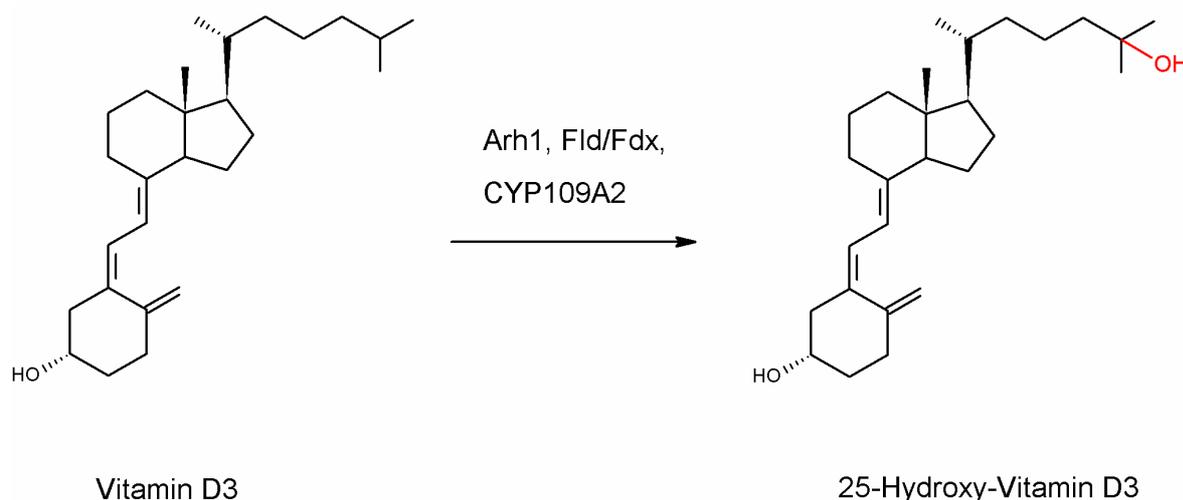


Schema 4: Reaktionsgleichung der CYP109E1-abhängigen Testosteron Umsetzung. Die durch die Reaktion eingeführten Gruppen sind rot markiert.

Die Umsetzung von Vitamin D₃ durch CYP109E1 und CYP109A2 wurde jeweils mit 200 μ M Vitamin D₃ (29 mg) für 24 h durchgeführt. Im Falle des CYP109E1 abhängigen Vitamin D₃ Umsatzes konnte mittels NMR nur die Struktur des Hauptproduktes P4 (11 mg) bestimmt werden, wohingegen die Mengen der Nebenprodukte für eine Strukturaufklärung zu gering waren. Wie schon aufgrund der Überlagerung mit dem Standard 25-Hydroxy-Vitamin D₃ im HPLC-Chromatogramm vermutet, konnte mittels NMR eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich bei diesem Produkt um 25-Hydroxy-Vitamin D₃ handelt (Schema 5). Vitamin D₃ wurde von CYP109A2 zu einem Produkt (16 mg) konvertiert. Auch hierbei bestätigte die Analyse mittels NMR-Spektroskopie das Produkt 25-Hydroxy-Vitamin D₃ (Schema 6).



Schema 5: Reaktionsgleichung der CYP109E1-abhängigen Vitamin D₃ Umsetzung. Die durch die Reaktion eingeführte Hydroxy-Gruppe ist rot markiert.



Schema 6: Reaktionsgleichung der CYP109A2-abhängigen Vitamin D3 Umsetzung. Die durch die Reaktion eingeführte Hydroxy-Gruppe ist rot markiert.

3.11. Zeitabhängige *in vivo* Substratumsetzungen

Alle konstruierten *B. megaterium* Ganzzell Biokatalysatoren eines bestimmten Cytochrom P450 Typs wiesen für ein Substrat jeweils die gleichen Produktmuster auf (s. 3.9.2). Um herauszufinden, ob die für jedes Cytochrom konstruierten Ganzzell Biokatalysatoren darüber hinaus Unterschiede aufweisen, wurden zeitabhängige *in vivo* Umsätze durchgeführt. Damit sollte insbesondere untersucht werden, ob die verschiedenen Redoxpartner einen Einfluss auf die Produktbildungsraten ausüben. Diese zeitabhängigen *in vivo* Umsätze wurden für jedes Cytochrom mit einem Substrat und den jeweiligen fünf *B. megaterium* Stämmen, die jeweils nur das Cytochrom P450 oder das Cytochrom P450 und eine der vier möglichen Redoxketten exprimierten, durchgeführt.

3.11.1. Zeitabhängiger KBA Umsatz durch CYP106A1 Biokatalysatoren

Im Falle von CYP106A1 wurden die fünf Stämme verglichen, die nur CYP106A1 (pSMF2.1B) oder CYP106A1, Arh1 und Fld (pSMF2.1BAFld), Fdx2 (pSMF2.1BAFdx2), Fdx3 (pSMF2.1BAFdx3) oder Fdx4 (pSMF2.1BAFdx4) exprimierten. Das Substrat KBA wurde 24 h nach der Induktion in einer Endkonzentration von 100 μM zu den verschiedenen Expressionskulturen zugegeben. Nach 0, 10, 20, 40, 60, 80 und 100 min wurden Proben entnommen, extrahiert und mittels HPLC analysiert. Der Stamm, der nur CYP106A1 exprimierte, zeigte über den gesamten Zeitraum die geringste Produktbildung (Abb.3.45); nach 100 min wurden nur $53,3 \pm 5,9\%$ Umsatz erzielt (Tab. 3.11.1). Im Gegensatz dazu konnte die Produktbildung durch Überexpression der Redoxpartner gesteigert werden: Nach 100 min wurden $88,1 \pm 8,7\%$ und $83,6 \pm 10,4\%$ Produktbildung erreicht, wenn zusätzlich zu CYP106A1 auch Arh1 und Fld oder Fdx3 exprimiert wurden (Abb. 3.45, Tab. 3.11.1). Bei Einsatz von Fdx2 oder Fdx4 konnten sogar $96,5 \pm 4,1\%$ und $98,8 \pm 0,2\%$ Produktbildung beobachtet werden (Abb. 3.45, Tab. 3.11.1). Die Negativkontrolle, mit dem Plasmid pSMF2.1 transformierte *B. megaterium* MS941 Zellen, zeigte innerhalb dieser Zeitperiode keinen Umsatz der KBA (Tab. 3.11.1). Während der gesamten Zeitspanne zeichneten sich die Stämme, die zusätzlich die Redoxpartner exprimierten, durch einen besseren Umsatz im Vergleich zu dem nur CYP106A1 exprimierenden Stamm aus. Dabei zeigten Fdx4 und Fdx2 ähnliche Werte, gefolgt von Fld und Fdx3 (Abb. 3.45). Durch den *B. megaterium* Stamm, der CYP106A1, Arh1 und Fdx4 exprimierte, konnten somit 100 μM KBA nach 100 min fast vollständig umgesetzt werden, wobei das Hauptprodukt 7 β -Hydroxy-KBA mit einer Selektivität von etwa 82% gebildet wurde. Dieses System wies damit eine theoretische Ausbeute von etwa 561 mg 7 β -Hydroxy-KBA $\text{L}^{-1} \text{Tag}^{-1}$ auf.

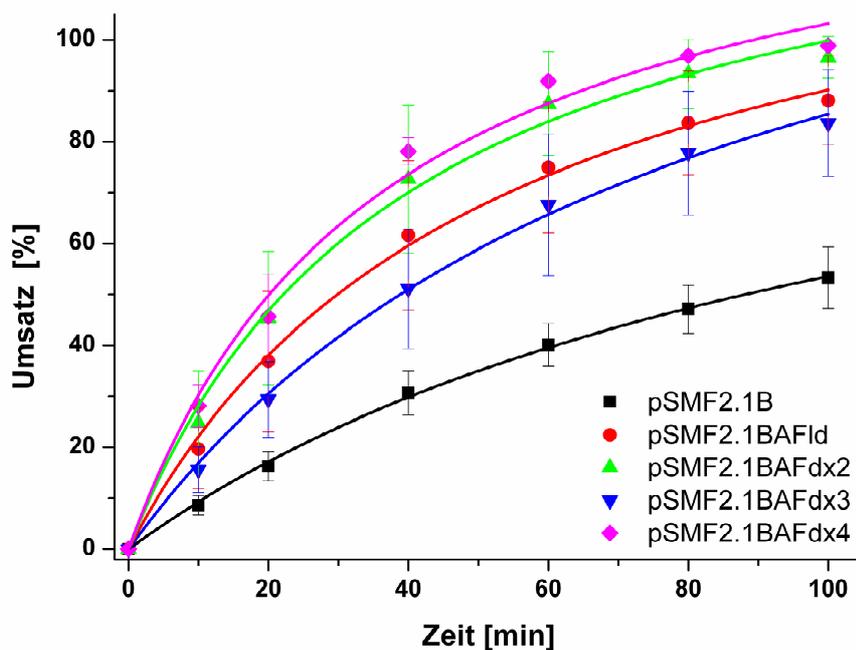


Abb. 3.45: KBA-Umsatz durch verschiedene *B. megaterium* MS941 Stämme, die CYP106A1 (schwarze Quadrate, pSMF2.1B) oder CYP106A1, Arh1 und Fld (rote Kreise, pSMF2.1BAFld), Fdx2 (grüne Dreiecke unten, pSMF2.1BAFdx2), Fdx3 (blaue Dreiecke oben, pSMF2.1BAFdx3) oder Fdx4 (pinke Raute, pSMF2.1BAFdx4) exprimierten. Die Reaktionen wurden in 25 ml Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 bei 30°C mit 100 μ M KBA durchgeführt und Proben wurden nach 0, 10, 20, 40, 60, 80 und 100 min entnommen.

Tab. 3.11.1: *In vivo* Umsatz von 100 μ M KBA innerhalb von 100 min durch verschiedene *B. megaterium* MS941 Biokatalysatoren, die nur CYP106A1 oder CYP106A1 und Arh1 zusammen mit Fld, Fdx2, Fdx3 oder Fdx4 exprimierten.

Ganzzell Biokatalysator	% Umsatz
pSMF2.1	0
pSMF2.1B	53,3 \pm 5,9
pSMF2.1BAFld	88,1 \pm 8,7
pSMF2.1BAFdx2	96,5 \pm 4,1
pSMF2.1BAFdx3	83,6 \pm 10,4
pSMF2.1BAFdx4	98,8 \pm 0,2

3.11.2. Zeitabhängiger Vitamin D3 Umsatz durch CYP109E1 Biokatalysatoren

Analog zu CYP106A1 wurden auch für CYP109E1 die *B. megaterium* Biokatalysatoren verglichen, die CYP109E1 (pSMF2.1E) oder CYP109E1, Arh1 und Fld (pSMF2.1EAFld), Fdx2 (pSMF2.1EAFdx2), Fdx3 (pSMF2.1EAFdx3) oder Fdx4 (pSMF2.1EAFdx4) exprimierten. Die Zugabe des Substrates Vitamin D3 erfolgte 24 h nach Induktion in der Endkonzentration 200 μ M. Proben der Kulturen wurden nach 0, 2, 4, 6, 8, 24, 32 und 48 h entnommen, extrahiert und per HPLC analysiert. Der nur das Cytochrom P450 CYP109E1 exprimierende Stamm wies während des gesamten Beobachtungszeitraums die höchste Produktbildung auf (Abb. 3.46) und erzielte mit $94,5 \pm 0,7\%$ Umsatz (Abb. 3.46, Tab. 3.11.2) auch nach 48 h unter allen fünf Stämmen den höchsten Wert. Im Vergleich dazu wurde die Produktbildung durch die zusätzliche Expression der Redoxpartner verringert: Während die Fdx2 und Fdx4 exprimierenden Stämme in den ersten 8 h noch annähernd gleiche Werte zeigten, war die Produktbildung bei Fdx4 ab dem Zeitpunkt 24 h schneller und wies nach 48 h mit $82,8 \pm 2,0\%$ den zweithöchsten Wert auf, wohingegen für Fdx2 $73,6 \pm 6,8\%$ Umsatz erreicht wurden (Abb. 3.46, Tab. 3.11.2). Der *B. megaterium* Stamm, der das Plasmid pSMF2.1EAFdx3 beinhaltetete, wies zu Beginn eine schlechtere Produktbildung auf als die übrigen Ferredoxine, erreichte am Ende der Zeitperiode aber mit $76,4 \pm 0,5\%$ Umsatz einen höheren Wert als Fdx2 (Abb. 3.46, Tab. 3.11.2). Unter allen untersuchten Stämmen war die Umsetzung unter Einsatz des Fld am schwächsten. Nach anfänglichen ähnlichen Werten wie Fdx3 verlangsamten sich die Umsätze mit zunehmender Zeit bis zu einem Endwert von $53,5 \pm 2,3\%$ Produktbildung nach 48 h (Abb. 3.46, Tab. 3.11.2). Der effizienteste Stamm (pSMF2.1E) erreichte den maximalen Umsatz schon nach 24 h, so dass damit eine maximale Ausbeute von 26 mg 25-Hydroxy-Vitamin D3 $L^{-1} Tag^{-1}$ erreicht werden konnte.

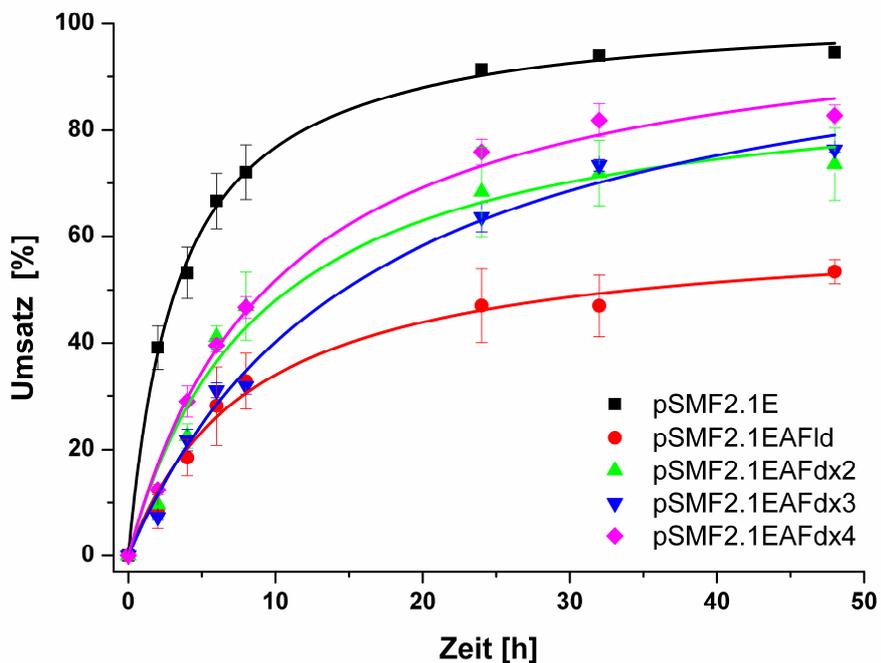


Abb. 3.46: Vitamin D3 Umsatz durch verschiedene *B. megaterium* MS941 Stämme, die CYP109E1 (schwarze Quadrate, pSMF2.1E) oder CYP106A1, Arh1 und Fld (rote Kreise, pSMF2.1EAFld), Fdx2 (grüne Dreiecke unten, pSMF2.1EAFdx2), Fdx3 (blaue Dreiecke oben, pSMF2.1EAFdx3) oder Fdx4 (pinke Raute, pSMF2.1EAFdx4) exprimierten. Die Reaktionen wurden in 50 ml TB-Medium bei 30°C mit 200 µM Vitamin D3 durchgeführt und Proben wurden nach 0, 2, 4, 6, 8, 24, 32 und 48 h entnommen.

Tab. 3.11.2: *In vivo* Umsatz von 200 µM Vitamin D3 innerhalb von 48 h durch verschiedene *B. megaterium* MS941 Biokatalysatoren, die nur CYP109E1 oder CYP109E1 und Arh1 zusammen mit Fld, Fdx2, Fdx3 oder Fdx4 exprimierten.

Ganzzell Biokatalysator	% Umsatz
pSMF2.1	0
pSMF2.1E	94,5 ± 0,7
pSMF2.1EAFld	53,5 ± 2,3
pSMF2.1EAFdx2	73,6 ± 6,8
pSMF2.1EAFdx3	76,4 ± 0,5
pSMF2.1EAFdx4	82,8 ± 2,0

3.11.3. Zeitabhängiger Vitamin D3 Umsatz durch CYP109A2 Biokatalysatoren

Wie schon für CYP106A1 und CYP109E1 wurden auch für CYP109A2 die jeweiligen fünf *B. megaterium* Biokatalysatoren miteinander verglichen. Das Substrat Vitamin D3 wurde 24 h nach Induktion in der Endkonzentration 200 μM zu den fünf Expressionskulturen zugegeben. Proben der Kulturen wurden nach 0, 2, 4, 6, 8, 24, 32 und 48 h entnommen, extrahiert und mittels HPLC analysiert. Zu Beginn zeigte der Stamm, der nur CYP109A2 exprimiert, die beste Produktbildung; am Ende des Messzeitraums wies der Fdx3 exprimierende Stamm jedoch eine minimal höhere Produktbildung auf ($77,0 \pm 8,3\%$ versus $75,5 \pm 6,6\%$ in 48 h) wie Abb. 3.46 und Tab. 3.11.3 zu entnehmen ist. Die Expression von Fdx4 führte zu $71,0 \pm 4,6\%$ Umsatz nach 48 h, gefolgt von Fdx2 mit $63,0 \pm 12,0\%$ Umsatz nach 48 h (Abb. 3.47 und Tab. 3.11.3). Während sich die beiden letztgenannten Stämme in den ersten 8 h kaum von den Stämmen unterschieden, die CYP109A2 bzw. CYP109A2, Arh1 und Fdx3 produzierten, wurden bei Expression des Fld schon zu Beginn der Messungen nur geringe Werte erreicht (Abb. 3.47). Nach 48 h konnte dieser Stamm mit $33,0 \pm 14,1\%$ Umsatz auch nur etwa ein Drittel des Substrates umsetzen (Tab. 3.11.3) und stellte damit unter allen fünf Stämmen denjenigen mit der geringsten Produktbildung dar. Zwischen den Zeiträumen 24 h und 48 h änderten sich die Produktbildungsraten kaum, so dass die maximalen Umsätze oft schon nach 24 h erreicht wurden. So wiesen die beiden besten CYP109A2 Biokatalysatoren, die nur CYP109A2 bzw. CYP109A2, Arh1 und Fdx3 exprimierten, eine Ausbeute von etwa 29 mg 25-Hydroxy-Vitamin D3 $\text{L}^{-1} \text{Tag}^{-1}$ auf.

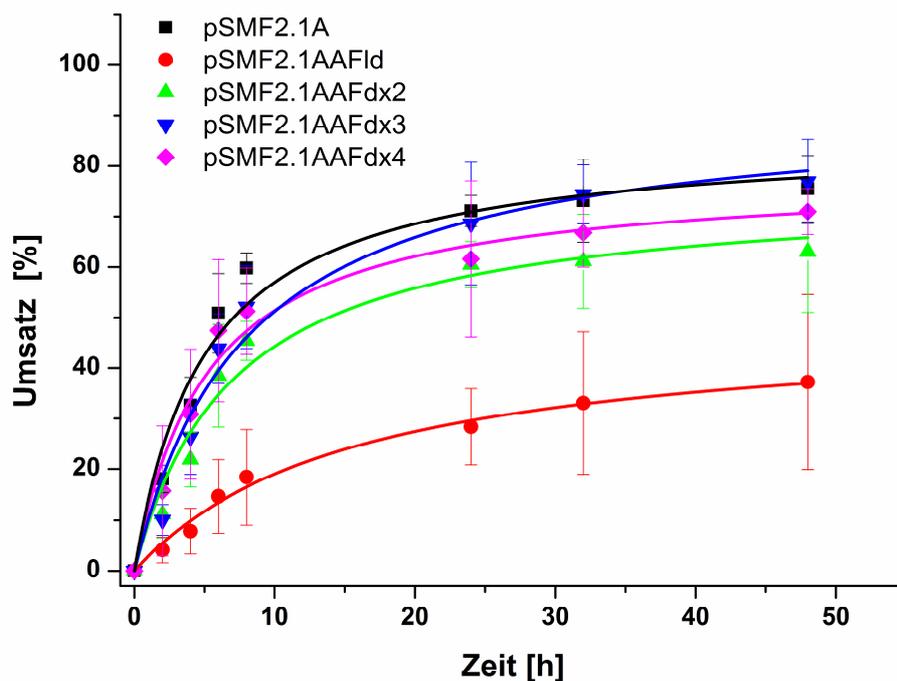


Abb. 3.47: Vitamin D3 Umsatz durch verschiedene *B. megaterium* MS941 Stämme, die CYP109A2 (schwarze Quadrate, pSMF2.1A) oder CYP109A2, Arh1 und Fld (rote Kreise, pSMF2.1AAFld), Fdx2 (grüne Dreiecke unten, pSMF2.1AAFdx2), Fdx3 (blaue Dreiecke oben, pSMF2.1AAFdx3) oder Fdx4 (pinke Raute, pSMF2.1AAFdx4) exprimierten. Die Reaktionen wurden in 50 ml TB-Medium bei 30°C mit 200 µM Vitamin D3 durchgeführt und Proben wurden nach 0, 2, 4, 6, 8, 24, 32 und 48 h entnommen.

Tab. 3.11.3: *In vivo* Umsatz von 200 µM Vitamin D3 innerhalb von 48 h durch verschiedene *B. megaterium* MS941 Biokatalysatoren, die nur CYP109A2 oder CYP109A2 und Arh1 zusammen mit Fld, Fdx2, Fdx3 oder Fdx4 exprimierten.

Ganzzell Biokatalysator	% Umsatz
pSMF2.1	0
pSMF2.1A	75,5 ± 6,6
pSMF2.1AAFld	33,0 ± 14,1
pSMF2.1AAFdx2	63,0 ± 12,0
pSMF2.1AAFdx3	77,0 ± 8,3
pSMF2.1AAFdx4	71,0 ± 4,6

4. Diskussion und Ausblick

Cytochrome P450 sind vielseitige Biokatalysatoren, welche die regio-, chemo-, und stereospezifische Oxidation nicht-aktivierter Kohlenwasserstoffe unter milden Reaktionsbedingungen katalysieren. Die wenigen existierenden chemischen Methoden zur direkten Oxidierung nicht-aktivierter Kohlenwasserstoffe sind in der Regel unselektiv, zeitaufwendig und teuer, so dass Cytochrome P450 diesbezüglich eine aussichtsreiche Alternative zu traditionellen chemischen Synthesen darstellen. Da Cytochrome P450 sich zudem durch eine sehr hohe Diversität bezüglich der von ihnen katalysierten Reaktionen und der umgesetzten Substrate auszeichnen, sind sie wichtige und vielversprechende Kandidaten für biotechnologische Anwendungen (Bernhardt 2006). Der breite Einsatz von P450s in der Industrie und Biotechnologie ist jedoch durch deren geringe Aktivität, eingeschränkte Stabilität, ihren Bedarf an dem teuren Kofaktor NAD(P)H und ihre Abhängigkeit von Elektronentransferproteinen limitiert. Obwohl die meisten dieser Nachteile auch auf mikrobielle Cytochrome P450 zutreffen, sind diese vom technischen Gesichtspunkt her jedoch einfacher zu handhaben als Cytochrome aus Pflanzen und Tieren. Zudem sind sie nicht membranassoziiert, weisen eine relativ hohe Stabilität auf und besitzen deshalb ein großes Potential zum Einsatz in Biooxidationsreaktionen. Dabei ermöglichen neue Sequenzierprojekte die Entdeckung und Charakterisierung neuer Cytochrome P450 aus verschiedenen Organismen mit neuartigen Substratspektren, Selektivitäten und Reaktionsmechanismen. So wurde kürzlich zum Beispiel das Genom des *B. megaterium* Stammes DSM319 sequenziert (Eppinger et al. 2011), um das Potential dieses industriell wichtigen Organismus besser auszuschöpfen. Cytochrome P450 gehören bekanntermaßen zu den interessantesten in *B. megaterium* vorhandenen Proteinen (He und Fulco 1991). Das Vorliegen der Sequenzinformationen des *B. megaterium* Stammes DSM319 (Eppinger et al. 2011) ermöglichte dabei die gezielte Suche nach sowohl Cytochromen P450 als auch nach deren potentiellen natürlichen Redoxpartnern. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war demzufolge die Identifizierung und Charakterisierung von Cytochrom P450 Systemen, bestehend aus den Cytochromen P450 selbst und deren Redoxpartnern, aus *B. megaterium* DSM319.

4.1. Bioinformatische Analysen zur Identifizierung von Cytochrom P450 Systemen

Um potentielle Cytochrome P450 und potentielle Redoxpartner der Cytochrome P450 in *B. megaterium* DSM319 zu identifizieren, wurden bioinformatische Analysen der genomischen Sequenz von *B. megaterium* DSM319 durchgeführt. Dadurch konnten vier Gene identifiziert werden, die für potentielle Cytochrome P450 kodieren. Dabei handelte es sich um die schon bekannten Cytochrome P450 CYP102A1 (P450 BM3) und CYP106A1 (P450 BM1) sowie die beiden neuen, der CYP109-Familie angehörenden, Cytochrome P450 CYP109E1 und CYP109A2. Da im Rahmen dieser Arbeit neue Cytochrome P450 identifiziert werden sollten und es sich bei dem P450 BM3 um das bisher am besten charakterisierte bakterielle Cytochrom P450 handelt (Whitehouse et al. 2012), wurde dieses P450 hier nicht weiter untersucht. CYP106A1 ist zwar schon länger bekannt, wurde jedoch bisher vorwiegend auf der Ebene der Genregulation und Genexpression untersucht (He et al. 1995; Shaw et al. 2000) und als Enzym selbst bezüglich seiner katalytischen Eigenschaften und Aktivitäten nicht näher charakterisiert. Bei den beiden CYP109 handelte es sich um neue Cytochrome P450, die bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurden. Demnach wurden die drei Cytochrome P450 CYP06A1, CYP109E1 und CYP109A2 ausgewählt und sollten in dieser Arbeit im Detail charakterisiert werden.

In einem ersten Schritt wurden die abgeleiteten Primärstrukturen und die genomischen Umgebungen der drei Gene näher untersucht. Alle drei P450s aus *B. megaterium* DSM319 enthielten jeweils das stark konservierte Threonin in der I-Helix, Glutaminsäure und Arginin in dem konservierten EXXR Motiv der K-Helix sowie die Signatur des Häm-Bindemotivs. Auch die theoretischen Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte wiesen für Cytochrome P450 typische Werte auf. Da zu Beginn dieser Arbeit keine Informationen über mögliche Substrate oder Redoxpartner zur Verfügung standen, bot die Untersuchung der genomischen Organisation zunächst die einzige Möglichkeit, sich diesen Fragestellungen anzunähern. Diese Analyse offenbarte jedoch, dass die Cytochrome P450 offensichtlich in keinem Gencluster oder Operon zusammen mit anderen Genen, die Proteine bekannter Funktion kodieren und somit auch Informationen über mögliche Funktionen und Substrate der Cytochrome liefern könnten, organisiert sind.

Neben den Cytochromen sollten auch deren natürliche Redoxpartner in *B. megaterium* DSM319 identifiziert werden. Eine Möglichkeit, mögliche Redoxpartner zu finden, besteht in der Untersuchung der benachbarten Gene der jeweiligen Cytochrome P450. Leider konnten in der unmittelbaren Nachbarschaft der P450 kodierenden Gene keine Gene gefunden werden, die für mögliche Elektronentransferproteine kodieren, wie dies auch schon für andere Cytochrome P450 beobachtet wurde (Bell et al. 2006; Ewen et al. 2009). Zudem erschwert die große Vielfalt der möglichen Elektronentransfersysteme (Hannemann et al. 2007) die Suche nach den entsprechenden Wechselwirkungspartnern der P450s. Deshalb sollte im gesamten Genom des *B. megaterium* Stammes DSM319 nach möglichen natürlichen Elektronentransferproteinen anhand deren Sequenzidentität zu bekannten Redoxpartnern gesucht werden. Diese Suche lieferte ein potentiell Flavodoxin, vier potentielle Ferredoxingene (Fdx1-4) und drei potentielle Ferredoxin Reduktasegene. Entsprechend der Analyse der abgeleiteten Primärstrukturen wiesen das Flavodoxin und die Ferredoxine Fdx2-4 saure pI-Werte auf, die vergleichbar waren mit den pI-Werten anderer, an Cytochrom P450 Systemen beteiligter Flavodoxine und Ferredoxine (Malca et al. 2011; Sticht und Rösch 1998). Fdx1 besaß hingegen mit einem Wert von 5,93 einen nur schwach sauren pH-Wert. Daneben lagen die theoretischen Molekulargewichte aller fünf Proteine in der zu erwartenden Größenordnung. Die drei potentiellen Ferredoxin Reduktasen wiesen neben typischen Molekulargewichten und pI-Werten jeweils auch, wie für Ferredoxin Reduktasen charakteristisch, eine NAD(P)H-Bindedomäne sowie eine FAD/FMN-Bindedomäne auf (Dym und Eisenberg 2001). Anhand des genomischen Kontextes konnte jedoch keinem der potentiellen Redoxproteine eine mögliche Funktion zugeordnet werden, bzw. es konnten keine Hinweise darüber erhalten werden, welches dieser Proteine möglicherweise an einem Cytochrom P450 System beteiligt ist.

Zusammenfassend zeigte die Untersuchung der genomischen Organisation, dass die Gene, die für potentielle Cytochrome P450 und deren potentielle Redoxpartner kodieren, über das ganze Genom verteilt sind und sich nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander befinden. Daher war es nicht möglich, die an den Cytochrom P450 Systemen beteiligten Redoxproteine anhand des genomischen Kontextes bzw. der bioinformatischen Analyse der abgeleiteten Primärstrukturen vorherzusagen. Infolgedessen sollten alle Gene, die für Cytochrome P450 und deren putative Redoxpartner kodieren, kloniert und die jeweiligen Proteine überexprimiert und gereinigt werden.

4.2. Expression, Reinigung und spektroskopische Charakterisierung

Alle Cytochrome P450 und die potentiellen Redoxpartner konnten erfolgreich in *E. coli* überexprimiert und in löslicher Form mit hohen Ausbeuten von jeweils mindestens 1000 nmol L⁻¹ Kultur gereinigt werden. Dabei stimmten die experimentell mittels SDS-PAGE bestimmten Molekulargewichte der Cytochrome P450, des Flavodoxins, des [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxins Fdx1 und der Ferredoxin Reduktasen FdR1 und FdR2 gut mit den theoretischen Molekulargewichten überein, während FdR3 leicht von dem theoretischen Molekulargewicht abwich. Die Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine Fdx2, Fdx3 und Fdx4 wiesen doppelt so hohe Molekulargewichte auf wie erwartet, was die Bildung von Dimeren vermuten lässt. Von dem Ferredoxin Etp1^{fd} aus *S. pombe*, das als heterologer Elektronenmediator in Cytochrom P450 Systemen fungieren kann, wurde beispielsweise auch eine Dimerenbildung berichtet (Schiffler et al. 2004).

Die oxidierten Formen aller drei Cytochrome wiesen einen typischen spektralen Verlauf auf und auch im reduzierten, CO-gebundenen Zustand konnte der charakteristische, namensgebende Peak bei 450 nm beobachtet werden. Die Expression des als Flavodoxin annotierten Gens führte zu blauen Zellpellets bzw. einem blau-grauen Lysat, was auf das Vorliegen des Fld in der Semichinon-Form hindeutete. Diese ungewöhnlichen Farben konnten auch für das Flavodoxin YkuN aus *B. subtilis* beobachtet werden (Lawson et al. 2004), wohingegen bei dem Flavodoxin YkuP aus dem gleichen *B. subtilis* Stamm die blaue Farbe schon beim Zellaufschluss verblasste und das Protein während der Dialyse in die komplett oxidierte gelb gefärbte Form überging (Lawson et al. 2004). Das Fld aus *B. megaterium* blieb jedoch während der Reinigung und Lagerung in der Semichinon-Form, was an der grünen Farbe erkennbar war. Zudem deutete das charakteristische UV/vis-Spektrum, insbesondere die breite Absorptionsbande von 550 bis 650 nm, auf diesen Redoxzustand hin. Daher kann vermutet werden, dass die *B. megaterium* Fld Semichinonform eine geringere Reaktivität mit Sauerstoff aufweist als zum Beispiel YkuP. Wie schon für die *B. subtilis* Flavodoxine YkuP und YkuN (Lawson et al. 2004) sowie das Flavodoxin CacFld aus *Clostridium acetobutylicum* beschrieben (Malca et al. 2011), konnte das Flavodoxin auch erfolgreich zur Chinonform oxidiert und zur Hydrochinonform reduziert werden. Es besitzt damit offensichtlich die für Flavodoxine charakteristische und im Zusammenhang mit Cytochromen P450 wichtige Eigenschaft, als Ein- und als Zweielektronenüberträger zu fungieren. Da das

Fld in *E. coli* in der Semichinonform exprimiert wurde, muss es während der Expression durch zelleigene Proteine reduziert worden sein. Für diese Reduktion könnte die *E. coli* Reduktase Fpr verantwortlich sein, für welche in dieser Arbeit *in vitro* ein Elektronentransfer auf Fld nachgewiesen werden konnte (s. Tab. 3.5.1).

Das als [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin annotierte Fdx1 wies durch seine rot-braune Farbe und den spektralen Verlauf starke Übereinstimmungen zu bekannten, an Cytochrom P450 Systemen beteiligten Vertebraten-Typ [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen wie Adx (Uhlmann und Bernhardt 1995) und Pdx (Tyson et al. 1972) auf. Die als [4Fe-4S]-Cluster Ferredoxine annotierten Fdx2, Fdx3 und Fdx4 waren in Abgrenzung zu Fdx1 grün-braun gefärbt und unterschieden sich auch durch ihr UV/vis-Spektrum von [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen. Solche UV/vis-Spektren mit relativ schwach ausgeprägten Absorptionsmaxima von 390 bis 400 nm wurden auch für andere Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine wie die [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxine Fdx2 und Fdx8 aus *Sorangium cellulosum* So ce56, die funktionell mit homologen und heterologen Cytochromen P450 wechselwirken können, aufgenommen (Ewen et al. 2009). Anhand der in dieser Arbeit eingesetzten UV/Vis-Spektroskopie kann jedoch nicht zwischen [3Fe-4S]-Cluster, [4Fe-4S]-Cluster oder Dicluster Ferredoxinen unterschieden werden. Um den genauen Fe-S-Cluster Typ der drei *B. megaterium* Ferredoxine Fdx2, Fdx3 und Fdx4 aufzuklären, könnten in weiterführenden Arbeiten zum Beispiel andere spektroskopische Methoden eingesetzt werden. Dazu wären die ESR- (Elektronenspinresonanz)-Spektroskopie (Noodleman et al. 2002) oder die Mößbauer-Spektroskopie (Bell et al. 1984) geeignet, da beide Techniken dazu in der Lage sind, zwischen den verschiedenen Fe-S-Cluster Typen zu unterscheiden und den genauen Fe-S-Cluster Typ zu bestimmen. Somit könnte anhand dieser Spektroskopien auch der Nachweis des [2Fe-2S]-Clusters in Fdx1 erfolgen.

Die drei *B. megaterium* Ferredoxin Reduktasen waren gelb gefärbt und stimmten auch bezüglich ihrer UV/vis-Absorptionsspektren gut mit bekannten, Cytochrom P450 assoziierten Ferredoxin Reduktasen wie der Putidaredoxin Reduktase (Sevrioukova und Poulos 2002), der Adrenodoxin Reduktase (Sagara et al. 1993) oder der myxobakteriellen Ferredoxin Reduktasen (Ewen et al. 2009) überein.

4.3. Identifizierung von Redoxpartnern der Cytochrome P450

Nach der erfolgreichen Klonierung und Reinigung von drei Cytochromen P450 sollten in einem nächsten Schritt Redoxpartner für die Cytochrome P450 identifiziert werden, weil diese zur Ausübung ihrer katalytischen Aktivität auf Elektronentransferproteine angewiesen sind. Da im Rahmen dieser Arbeit neben den Cytochromen P450 auch potentielle autologe Redoxproteine erfolgreich kloniert und gereinigt werden konnten, sollte zunächst überprüft werden, ob diese Redoxproteine funktionell mit den Cytochromen wechselwirken können. Es zeigte sich, dass das Flavodoxin und die drei Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine die Aktivität aller drei Cytochrome P450 unterstützten, während das [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin Fdx1 dazu nicht in der Lage war. Zudem übertrugen die drei autologen Ferredoxin Reduktasen keine Elektronen auf das Flavodoxin bzw. die Ferredoxine. Die Ursache für den nicht vorhandenen Elektronentransfer könnte darin liegen, dass Fdx1 und die Ferredoxin Reduktasen aufgrund ihres Redoxpotentials nicht in der Lage sind, mit den Cytochromen bzw. dem Fld und den Ferredoxinen zu wechselwirken. Daher wurden die *B. megaterium* Reduktasen durch verschiedene heterologe Reduktasen wie Arh1 aus *S. pombe*, bovine AdR und *E. coli* Fpr ersetzt. Arh1 wies unter diesen Reduktasen die höchste Effizienz bezüglich der Übertragung von Elektronen auf Fld und die drei Fdx auf. Nach diesen Ergebnissen können Fld, Fdx2, Fdx3 und Fdx4 als potentielle natürliche Redoxpartner von CYP106A1, CYP109E1 und CYP109A2 aus *B. megaterium* DSM319 betrachtet werden (Abb. 4.1).

Für verschiedene Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine wurde schon eine Wechselwirkung mit Cytochromen P450 beschrieben: Das CYP107H1 System aus *B. subtilis* (Green et al. 2003), das P450mor System aus dem *Mycobacterium* sp. Stamm HE5 (Sielaff und Andreesen 2005), das CYP51 System aus *M. tuberculosis* (McLean et al. 2006), das CYP105D System aus *Streptomyces coelicolor* (Chun et al. 2007) und das CYP260A1 System aus *Sorangium cellulosum* So ce56 (Ewen et al. 2009) sind Beispiele für bakterielle Cytochrom P450 Systeme, in denen Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine als Redoxpartner fungieren.

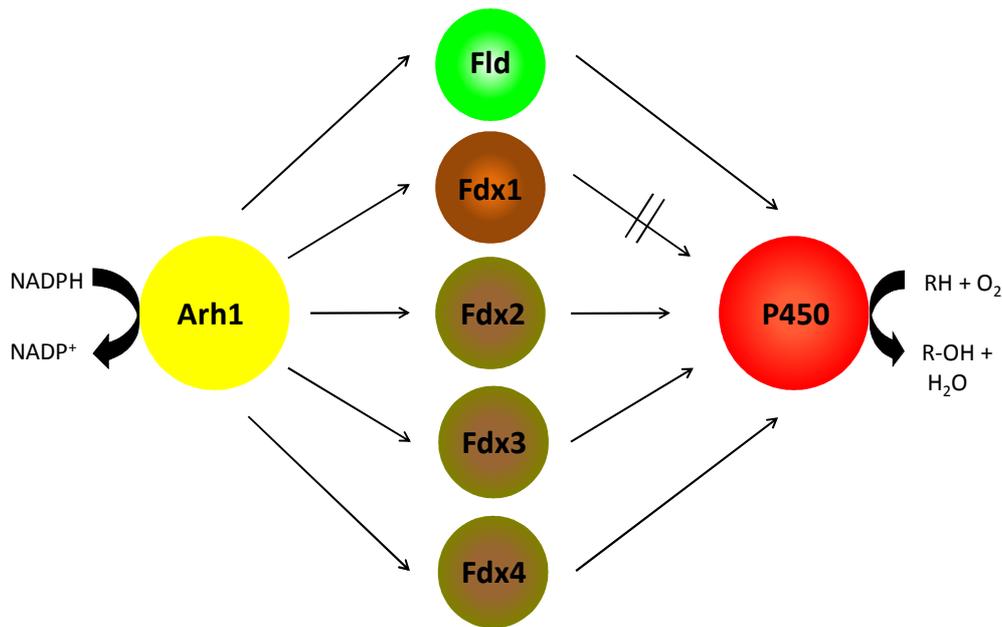


Abb. 4.1: Überblick über die neuen Cytochrom P450 Systeme, die in dieser Arbeit entdeckt wurden. Diese Cytochrom P450 Systeme bestehen aus Arh1 aus *S. pombe* sowie dem Flavodoxin oder einem von drei [3Fe-4S]- oder [4Fe-4S]-Cluster Ferredoxinen (Fdx2, Fdx3 und Fdx4) und dem jeweiligen Cytochrom P450 (CYP106A1, CYP109E1 und CYP109A2) aus *B. megaterium* DSM319. Das [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin Fdx1 war nicht in der Lage, mit den Cytochromen P450 funktionell zu wechselwirken.

Daneben sind auch einige Beispiele für Flavodoxine bekannt, die in der Lage sind, als Elektronentransferproteine in Cytochrom P450 Systemen zu agieren: Flavodoxin Reduktase und Flavodoxin aus *E. coli* können die endogenen Redoxpartner einiger heterolog exprimierter Cytochrome P450 ersetzen (Barnes et al. 1991; Jenkins und Waterman 1994). Auch das Flavodoxin AnFld aus dem Cyanobakterium *Anabaena* PCC 7119 besitzt die Fähigkeit, mit CYP106A2 aus *B. megaterium* ATCC 13368 zu wechselwirken (Goni et al. 2009). Mit dem Flavodoxin Cindoxin aus *Citrobacter braunii* als Redoxpartner für CYP176A1 (P450cin) wurde das erste Cytochrom P450 System entdeckt, das ein Flavodoxin als physiologisches Redoxprotein enthält (Hawkes et al. 2002). Kürzlich wurden zudem zwei Flavodoxine aus *Clostridium acetobutylicum*, die als mögliche natürliche Elektronentransferpartner für CYP152A2 fungieren können, identifiziert (Malca et al. 2011). Des Weiteren können die *B. subtilis* Flavodoxine YkuN und YkuP als Redoxpartner für CYP107H1 (Lawson et al. 2004) und CYP109B1 (Girhard et al. 2010) aus *B. subtilis* dienen.

Interessanterweise können diese beiden P450s ebenso mit Ferredoxinen interagieren: Die Aktivität von CYP109B1 kann mit verschiedenen heterologen [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen rekonstituiert werden (Girhard et al. 2010) und, wie bereits erwähnt, ist das [4Fe-4S]-Cluster Ferredoxin Fer in der Lage, Elektronen auf CYP107H1 zu übertragen, wenn auch mit einer sehr geringen Geschwindigkeit (Green et al. 2003). Auch in dieser Arbeit wurden Cytochrome P450 entdeckt, die Elektronen von einem Flavodoxin und von Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen aufnehmen können. Aber im Gegensatz zu dem CYP107H1 System unterstützen das Flavodoxin und die Ferredoxine die Aktivität der Cytochrome sehr effizient. Für die CYP107H1 und CYP109B1 Systeme aus *B. subtilis* konnten bisher ebenso keine homologen Reduktasen identifiziert werden. Daher kann spekuliert werden, dass die Cytochrom P450 Systeme aus *Bacillus* in Kombination mit Flavodoxinen bzw. Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen auf Reduktasen zurückgreifen, die sich von den bisher bekannten, Cytochrom P450 assoziierten, Reduktasen, welche auch in dieser Arbeit als Suchsequenzen zur Identifizierung von Reduktasen aus *B. megaterium* eingesetzt wurden, unterscheiden. Zudem besteht die Möglichkeit, dass Cytochrome P450 aus *Bacillus* natürlicherweise Redoxsysteme verwenden, die keiner der bisher bekannten Cytochrom P450 Klassen (Hannemann et al. 2007) zugeordnet werden können und die Cytochrom P450 Systeme aus *Bacillus* damit eine neuartige Klasse bilden.

Neben den autologen Redoxpartnern waren auch verschiedene heterologe Redoxproteine wie bovines Adx und Etp1^{fd} aus *S. pombe* in der Lage, Elektronen auf die P450 aus *B. megaterium* zu übertragen (Daten nicht gezeigt). Zudem konnten die in dieser Arbeit identifizierten autologen Redoxproteine aus *B. megaterium*, ebenso wie Adx und Etp1^{fd}, *in vitro* funktionell mit CYP106A2 wechselwirken (Daten nicht gezeigt). Um Hinweise auf die an der Redoxpartnerbindung beteiligten Reste zu erhalten, wurde das Homologiemodell von CYP106A2 betrachtet (Lisurek et al. 2008). Da für die elektrostatische Interaktion zwischen Cytochromen P450 und ihren Redoxpartnern negativ geladene Reste auf der Oberfläche des Redoxpartners und positiv geladene Reste auf der Oberfläche des Cytochroms P450 verantwortlich sind, wurden diese basischen Aminosäuren in CYP106A2 identifiziert (Lisurek 2004). Die Aminosäuren K53, R97, R100, R362, L343 und R344 sind auch in CYP106A1 an den entsprechenden Positionen vorhanden. Somit kann die Tatsache, dass CYP106A1 und CYP106A2 die gleichen Redoxpartner besitzen, mithilfe des CYP106A2 Homologiemodells erklärt werden (Lisurek et al. 2008).

4.4. Quantitative real-time Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)

Bisher konnte gezeigt werden, dass das Flavodoxin und die drei Ferredoxine in der Lage sind, *in vitro* die Aktivität der drei Cytochrome P450 zu unterstützen. Um Einblicke in die physiologische Bedeutung der Expression dieser Cytochrome P450 in *B. megaterium* selbst zu erhalten, sollte die Expression der Cytochrome P450 und der autologen Redoxpartner in *B. megaterium* mittels quantitativer real-time Reverse Transkriptase PCR untersucht werden. Dazu wurden *B. megaterium* MS941 Zellen unter ausreichender Eisenversorgung (+Fe) und unter Eisenmangel (-Fe) kultiviert, und die Expressionslevel der sieben Gene (drei Cytochrome P450, Flavodoxin, drei Ferredoxine) wurden bei diesen beiden Eisenkonzentrationen verglichen.

Für alle drei Cytochrome P450 konnte unter beiden Bedingungen eine Expression nachgewiesen werden, wobei sich die Expressionslevel im Einzelnen unterschieden: CYP106A1 zeigte bei beiden Bedingungen das gleiche Expressionslevel, während CYP109E1 bei Fehlen von Eisen eine deutlich höhere Expression aufwies als beim Vorhandensein von Eisen. Im Gegensatz dazu wurde CYP109A2 unter Eisenmangel schwächer exprimiert als unter ausreichender Eisenversorgung. Das Flavodoxin wurde bei Eisenmangel im Vergleich zu 25 μ M Eisen hochreguliert. Fdx4 wurde hingegen nur bei ausreichender Eisenversorgung exprimiert, während bei Eisenmangel keine Fdx4-Expression detektiert wurde. Damit konnte für alle drei Cytochrome eine Coexpression mit Fld bei unzureichender Eisenversorgung und mit Fdx4 bei ausreichender Eisenversorgung beobachtet werden. Dadurch wird die Expression aller Cytochrome P450 und die Expression mindestens eines Elektronentransferpartners bei verschiedenen Eisenkonzentrationen sichergestellt, so dass *B. megaterium* in Abhängigkeit des zur Verfügung stehenden Eisens zwischen verschiedenen Redoxproteinen wechseln kann. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen überein, dass Flavodoxine bei ungünstigen Umweltbedingungen wie Eisenmangel exprimiert werden, wo sie die eisenhaltigen Ferredoxine in Reaktionen, die zur Reduktion von N_2 und $NADP^+$ führten, ersetzen (Sancho 2006) und dadurch das Überleben und die Reproduktion unter Bedingungen ermöglichen, die anderenfalls schädlich gewesen wären (Zurbriggen et al. 2007). Folglich kann das verbleibende Eisen auf andere Enzyme, die auf Eisen angewiesen sind, umverteilt werden (Erdner et al. 1999; Mazouni et al. 2003). Im Zusammenhang dieser Arbeit könnte das verfügbare Eisen zum Beispiel für die Assemblierung der prosthetischen

Gruppe der Cytochrome P450, ein eisenhaltiges Häm b, verwendet werden, so dass die katalytische Aktivität der Cytochrome P450 sichergestellt ist. Eine ähnliche Regulation der Cytochrom P450 Aktivität wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Fld und CYP109E1 wurden jeweils bei Eisenmangel und Fdx4 und CYP109A2 jeweils bei ausreichender Eisenversorgung hochreguliert. Fld und CYP109E1 bzw. Fdx4 und CYP109A2 sind also möglicherweise am gleichen Stoffwechselweg beteiligt und werden dazu bei den entsprechenden Eisenkonzentrationen verstärkt exprimiert. Obwohl in dieser Arbeit die Expression von Fdx2 und Fdx3 nicht detektiert werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese beiden Ferredoxine unter Umweltbedingungen, die von den in dieser Arbeit gewählten Parametern abweichen, eine Coexpression mit den Cytochromen aufweisen und mit diesen natürlicherweise wechselwirken. Somit könnten in zukünftigen Arbeiten weitere Kulturbedingungen wie andere Kulturzeiten, weitere Eisenkonzentrationen oder verschiedene Medien getestet werden, um Hinweise auf die Expressionsbedingungen von Fdx2 und Fdx3 zu erhalten. Zudem wäre es interessant, genomweite Microarrayanalysen der Genexpression in *B. megaterium* durchzuführen. Dadurch könnten weitere Gene identifiziert werden, die eine ähnliche differentielle Expression in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration wie die Cytochrome und die Redoxpartner aufweisen und die damit Hinweise auf die physiologische Funktion der Cytochrom P450 Systeme in *B. megaterium* liefern könnten. Zusammengefasst können das Flavodoxin und die drei Ferredoxine Fdx2, Fdx3 und Fdx4 nach allen in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen als natürliche Redoxpartner von CYP106A1, CYP109E1 und CYP109A2 angesehen werden, wobei die Expressionsbedingungen für Fdx2 und Fdx3 noch identifiziert werden müssen. Die Tatsache, dass die Transkriptmenge für CYP109E1 bei Eisenmangel wesentlich höher war als alle übrigen Werte, deutet auf eine physiologische Relevanz der CYP109E1 Expression bei diesen Bedingungen hin, wobei es sich zum Beispiel darum handeln könnte, neue Nahrungsquellen zugänglich zu machen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die Proteinmenge, -stabilität und -aktivität durch weitere regulatorische Mechanismen wie posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden, so dass trotz hoher mRNA-Mengen in der Zelle nur geringe Mengen an aktivem CYP109E1 vorliegen.

4.5. Identifizierung von Substraten und katalytische Aktivität

Neben der Identifizierung von autologen Redoxpartnern für die drei Cytochrome P450 aus *B. megaterium* DSM319 bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, Substrate für die Cytochrome P450 zu identifizieren. Um erste Hinweise auf mögliche Substrate zu erhalten, wurde mithilfe der TypI-Differenzspektroskopie zuerst nach Substanzen gesucht, die an die jeweiligen Cytochrome P450 binden. Bei der Bindung einer Substanz an ein Cytochrom P450 handelt es sich um eine zwingende, jedoch nicht ausreichende Voraussetzung für eine Substratumsetzung. Deshalb wurde anschließend mithilfe von *in vitro* Rekonstitutionsassays untersucht, ob die Substanzen, für die eine Bindung nachgewiesen werden konnte, von den Cytochromen umgesetzt werden. Für diese Umsätze wurden die in dieser Arbeit identifizierten autologen Redoxpartner eingesetzt.

4.5.1. Substratidentifizierung für CYP106A1 und kinetische Analyse des CYP106A1-abhängigen KBA Umsatzes

Als mögliche Substrate von CYP106A1 wurden Substanzen getestet, die schon als Substrate des nächsten Verwandten, CYP106A2 aus *B. megaterium* ATCC 13368, bekannt waren. Bei diesen Substraten handelt es sich um Steroide sowie Di- und Triterpensäuren. Die pentazyklische Triterpensäure 11-Keto- β -Boswelliasäure (KBA) induzierte einen high-spin Shift in CYP106A1, während durch die Diterpensäure Abietinsäure kein TypI-Shift hervorgerufen werden konnte. Diese Ergebnisse deckten sich mit denen von CYP106A2, wofür zwar beide Substrate darstellen (Bleif et al. 2011; Bleif et al. 2012), von denen jedoch nur die KBA einen high-spin Shift induzierte. Dies könnte, wie schon für CYP106A2 diskutiert, dadurch erklärt werden, dass die Abietinsäure im Gegensatz zur KBA zu klein ist, um das axiale Wassermolekül zu verdrängen. Diese Hypothese wurde auch durch die für die Steroide erhaltenen Ergebnisse unterstützt, welche größer als die Abietinsäure sind: Unter den getesteten Steroiden induzierten Progesteron, Pregnenolon, Testosteron, Androstendion, DOC, Corticosteron und RSS einen TypI-Shift, während Cholestenon nicht in der Lage war, einen high-spin Shift hervorzurufen. Diese Ergebnisse unterschieden sich jedoch stark von denen für CYP106A2 bekannten Daten: Bei Cholestenon handelt es sich um das einzige steroidale high-spin Shift induzierende Substrat von CYP106A2 (Lisurek 2004), wohingegen

die übrigen Steroide keinen TypI-Shift in CYP106A2 induzierten (Lisurek 2004), obwohl sie von diesem umgesetzt werden. Die Bindung von DOC an CYP106A2 konnte lediglich mittels Infrarotspektroskopie nachgewiesen werden (Simgen et al. 2000). Die untersuchten Steroide verhalten sich bezüglich der Induktion eines TypI-Shifts in CYP106A1 bzw. CYP106A2 folglich genau umgekehrt. Diese Unterschiede lassen vermuten, dass der Substrateingangskanal bzw. die an der Substratbindung beteiligten Regionen in den beiden Enzymen eine unterschiedliche räumliche Struktur aufweisen. Cholestenon mit seiner langen hydrophoben Seitenkette am C17-Atom ist im Vergleich zu den kleineren Steroiden ohne Seitenkette offensichtlich zu groß und/oder zu hydrophob, um in CYP106A1 einen high-spin Shift zu induzieren.

Die Typ I-Differenzspektroskopie kann auch zur Berechnung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_D) herangezogen werden, welche als Maß für die Bindungsaffinität einer Substanz zu dem Cytochrom P450 gilt. Unter den getesteten Substanzen wies Testosteron den geringsten K_D -Wert und damit die höchste Bindungsaffinität zu CYP106A1 auf. Die geringste Bindungsaffinität wurde für RSS mit einem mehr als viermal so hohen K_D -Wert beobachtet, so dass sich bezüglich der Bindungsaffinität zu CYP106A1 folgende Reihenfolge ergab:

Testosteron > Progesteron > DOC > Androstendion > KBA > RSS

Anhand dieser Werte ließ sich zum Teil eine Korrelation zwischen der Stärke der Bindung und der chemischen Struktur der Substanzen erkennen: Da bis auf RSS alle Steroide einen geringeren K_D -Wert als die KBA besaßen, trägt die Größe der aus fünf Ringen bestehenden KBA offensichtlich zu einer schwächeren Bindung im Vergleich zu den Steroiden bei. Daneben führte eine zusätzliche Hydroxygruppe zum Beispiel am C21 oder C17 des Steroidgerüsts zu einem höheren K_D -Wert und damit einer schwächeren Bindung: Der K_D -Wert stieg von Progesteron zu DOC (21-Hydroxy-Progesteron) und wiederum zu RSS, das im Vergleich zu DOC zusätzlich eine Hydroxygruppe am C17 besitzt. Die hier erhaltenen hohen K_D -Werte deuten auf eine verhältnismäßig schwache Bindung der Substanzen an CYP106A1 hin. Dies unterstreicht die Feststellung, dass es sich bei diesen Substanzen nicht um die natürlichen Substrate des aus dem Bodenorganismus *B. megaterium* stammenden CYP106A1 handeln kann. Für die Bindung des natürlichen Substrates Cineol an P450_{cin} wurde zum Beispiel ein K_D -Wert von 0,7 μM bestimmt (Hawkes et al. 2002) und die

Dissoziationskonstante für P450cam und sein natürliches Substrat Campher betrug $1,8 \mu\text{M}$ (Kim et al. 2008).

Bei der KBA handelte es sich um die einzige Substanz, die in beiden CYP106 Enzymen einen TypI-Shift induzierte, und für die demzufolge die K_D -Werte miteinander verglichen werden konnten. Dabei wurde deutlich, dass KBA eine schwächere Bindung an CYP106A1 als an CYP106A2 aufweist, da der K_D -Wert im Falle von CYP106A1 mit $92,25 \pm 2,89 \mu\text{M}$ fast dreimal so hoch war wie im Falle von CYP106A2 (K_D : $33,34 \pm 2,87 \mu\text{M}$) (Bleif et al. 2012). Unterschiede im Bindungsverhalten spiegelten sich darüber hinaus auch darin wider, dass die Daten für CYP106A2 einer hyperbolischen Regression und für CYP106A1 einer sigmoidalen Regression entsprechend der Hill Gleichung folgten. Dieses sigmoidale Bindungsverhalten deutete auf eine Kooperativität auf der Ebene der Ligandenbindung oder der Ebene des Übergangs vom low-spin zum high-spin Zustand hin (Lampe et al. 2008). Abgesehen von der KBA folgten die Daten der übrigen Substanzen einer hyperbolischen Regression. Da es sich bei diesen Substanzen ausschließlich um Steroide handelte, liegt die Ursache des unterschiedlichen Bindungsverhaltens möglicherweise in den unterschiedlichen chemischen Strukturen der Steroide und der Triterpensäure. Um diese These zu verifizieren, könnten weitere Steroide und Terpensäuren hinsichtlich der Induktion eines TypI-Shifts und der mathematischen Auswertung des zugrunde liegenden Bindungsverhaltens getestet werden.

Mithilfe von *in vitro* Rekonstitutionsassays wurde als nächstes untersucht, ob die Substanzen, für die bisher eine Bindung an CYP106A1 nachgewiesen werden konnte, von diesem umgesetzt werden. Alle getesteten Steroide - Progesteron, Testosteron, DOC, Androstendion und RSS - wurden auch von CYP106A1 als Substrate akzeptiert. Diese Substanzen wurden zudem von CYP106A1 zu einem identischen bzw. sehr ähnlichen Produktmuster umgesetzt wie von CYP106A2. Zwischen den beiden CYP106 konnten damit keine Unterschiede bezüglich der Umsetzung von Steroiden gefunden werden. So überlagerte das Hauptprodukt der CYP106A1-abhängigen Progesteron Umsetzung im HPLC-Chromatogramm mit dem Standard 15β -Hydroxy-Progesteron, dem Hauptprodukt des CYP106A2-abhängigen Progesteron Umsatzes. Daher kann davon ausgegangen werden, dass auch die übrigen Steroide von CYP106A1 zu den schon von CYP106A2 bekannten Produkten umgesetzt werden, weshalb die Steroide in dieser Arbeit als Substrate von CYP106A1 nicht weiter untersucht wurden.

Anders verhielt es sich jedoch bei Betrachtung der Terpenoide: Die pentazyklische Triterpensäure KBA wurde zwar auch von beiden Enzymen als Substrat akzeptiert, jedoch zu

einem anderen Produktmuster umgesetzt. Die CYP106A1-abhängige KBA Umsetzung führte zu einem Haupt- und einem Nebenprodukt (Brill et al. 2013), während KBA von CYP106A2 zu einem Haupt- und drei Nebenprodukten umgesetzt wurde (Bleif et al. 2012), wobei jedoch die beiden Hauptprodukte nicht identisch waren. Weitere Unterschiede zeigten sich bezüglich der Abietinsäure: Sie stellt ein Substrat von CYP106A2 dar (Bleif et al. 2011), konnte von CYP106A1 aber nicht umgesetzt werden. Diese Unterschiede könnten mithilfe des Homologiemodells erklärt werden, das in Ermangelung einer Kristallstruktur für CYP106A2 und Progesteron entwickelt wurde (Lisurek et al. 2008) und das die Basis für molekulare Docking-Studien mit 17α -Methyltestosteron und Abietinsäure bildete (Bleif 2012; Bleif et al. 2011). Dabei wurden für CYP106A2 diejenigen Aminosäuren abgeleitet, die die sogenannten Substraterkennungsstellen (SRSs) bilden. Diese SRS sind zwischen verschiedenen P450 am wenigsten konserviert und stellen damit den eigentlichen Grund für die Substratvariabilität der P450 dar. Anhand des Dockings wurden mögliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Säurefunktion der Abietinsäure und den Seitenketten der Aminosäuren D295, E78 und R66 erkannt (Bleif et al. 2011). CYP106A1 besitzt an der Position 295 ebenfalls die Aminosäure Asparaginsäure. An Position 78 liegt bei CYP106A1 jedoch anstelle der Glutaminsäure ein Lysin vor und an Position 66 ein Glycin statt des Arginins. Damit liegt ein Austausch einer sauren durch eine basische Aminosäure bzw. einer basischen durch eine unpolare Aminosäure vor. Des Weiteren wurde die Isopropylgruppe der Abietinsäure durch eine hydrophobe Zange, die von den Leucinresten L291 und L239 gebildet wurde, im aktiven Zentrum von CYP106A2 stabilisiert (Bleif et al. 2011). Das L239 ist auch in CYP106A1 vorhanden, und an Position 291 befindet sich mit Isoleucin eine Aminosäure, die sich nur unwesentlich von Leucin unterscheidet. Daher ist davon auszugehen, dass vor allem die unterschiedlichen Aminosäuren an den Positionen 66 und 78 dafür verantwortlich sind, dass die für die Substratbindung essentiellen Wasserstoffbrückenbindungen nicht ausgebildet werden können und die Abietinsäure von CYP106A1 daher als Substrat nicht akzeptiert wurde. Diese Unterschiede könnten auch dazu führen bzw. beitragen, dass die KBA von CYP106A1 zu einem anderen Produktmuster umgesetzt wurde.

Neben dem Test ausgewählter Substanzen auf Bindung an CYP106A1 wurde auch eine Naturstoffbibliothek gescreent, wobei dieses Screening auf der Induktion von TypI-Shifts beruhte. Durch dieses Screening wurden mit Betulinsäure, Ursolsäure, Oleanolsäure, 18β -Glycyrrhetinsäure, Dipterocarpol und Betulin weitere Substrate für CYP106A1 identifiziert. Diese sechs Substanzen wurden auch beim Screening der Naturstoffbibliothek als Substrate

von CYP106A2 gefunden (Schmitz et al. 2012). Zudem zeigten beide Enzyme bei Umsetzung der einzigen mittels HPLC analysierbaren Substanz, 18 β -Glycyrrhetinsäure, das gleiche Produktmuster. Die für diese Umsetzung wichtigen Aminosäuren sind daher wahrscheinlich in beiden Enzymen identisch bzw. ähnlich. Die übrigen Substanzen konnten aufgrund ihrer chemischen Struktur nicht mit der bevorzugten Analysemethode HPLC untersucht werden. Dafür stand nur die Dünnschichtchromatographie zur Verfügung, bei der jedoch eine Quantifizierung der Substratumsätze nur eingeschränkt möglich ist. Weil mit der KBA jedoch ein interessantes Substrat identifiziert werden konnte, das von CYP106A1 zu einem anderen Produktmuster als von CYP106A2 umgesetzt wurde, wurden alle weiteren Experimente mit der KBA als Substrat durchgeführt.

Um die CYP106A1-abhängige Umsetzung der KBA detaillierter zu untersuchen, wurden *in vitro* kinetische Analysen durchgeführt. Dabei wurde ein V_{\max} -Wert von 5,4 nmol Produkte/nmol CYP106A1/min berechnet. Die Daten folgten hier einer hyperbolischen Regression, obwohl bei Analyse des TypI-Spinshifts ein sigmoidales Bindungsverhalten der KBA beobachtet werden konnte. Entsprechend dieser Daten weist CYP106A1 im Vergleich zu CYP106A2 ($V_{\max} = 97,4$ nmol Produkte/nmol CYP106A2/min) (Bleif et al. 2012) eine geringere Geschwindigkeit hinsichtlich des KBA Umsatzes auf. Eine sigmoidale Regression bezüglich der Substratbindung und eine hyperbolische Regression bezüglich der kinetischen Analyse wurde auch im Falle von CYP3A4 und Nile Red als Substrat beobachtet (Lampe et al. 2008). In dieser Studie schlugen die Autoren vor, dass das erste Nile Red Molekül und folgende Nile Red Moleküle den Häm Spin Zustand in unterschiedlicher Art und Weise beeinflussen, aber nicht zu CYP Komplexen mit unterschiedlichen kinetischen Parametern führen, zumindest innerhalb der Auflösung ihres Assays (Lampe et al. 2008). Diese Erklärung könnte auch auf CYP106A1 und das Substrat KBA zutreffen, es sind aber weitere Experimente notwendig, um die detaillierten Mechanismen aufzuklären.

4.5.2. Substratidentifizierung für CYP109E1 und CYP109A2 und kinetische Analysen der CYP109E1- und CYP109A2-abhängigen Vitamin D3 Umsätze

Mit Isolongifolen-9-on, Nootkaton und Testosteron wurden drei Substanzen identifiziert, die einen high-spin Shift in CYP109E1 induzierten. Sie unterschieden sich jedoch bezüglich der berechneten Bindungskonstanten und damit bezüglich der Affinitäten zu CYP109E1. Testosteron wies den niedrigsten K_D -Wert und damit die stärkste Bindung zu CYP109E1 auf, während die Bindungskonstante von Isolongifolen-9-on mehr als doppelt so hoch war wie diejenige von Testosteron. Daraus ergab sich folgende Reihenfolge bezüglich der Bindungsaffinität:

Testosteron > Nootkaton > Isolongifolen-9-on

Dabei konnte eine Korrelation zwischen der Bindungsstärke und der Struktur der Substanzen festgestellt werden: Die Substanz mit der stärksten Affinität, Testosteron, besteht aus vier Ringen und ist damit wesentlich größer als die beiden anderen, nur aus zwei Ringen bestehenden Substanzen. Isolongifolen-9-on und Nootkaton besitzen eine ähnliche chemische Struktur und ein identisches Molekulargewicht. Nootkaton weist jedoch eine Seitenkette und damit eine größere räumliche Ausdehnung als Isolongifolen-9-on auf. Aufgrund der relativ großen Bindungskonstanten kann wie schon im Falle von CYP106A1 vermutet werden, dass es sich bei diesen Substanzen nicht um die natürlichen Substrate von CYP109E1 handelt. Auch für andere Cytochrome P450 wurde schon die Bindung der hier betrachteten Substanzen untersucht. Der K_D -Wert für die Bindung von Nootkaton an CYP260A1 aus *S. cellulosum* So ce56 betrug $7,87 \pm 3,16 \mu\text{M}$ (Khatri 2009), im Falle von CYP109B1 aus *B. subtilis* $320 \pm 11 \mu\text{M}$ (Girhard et al. 2010). Die Bindung von Nootkaton an CYP109E1 (K_D : $131,79 \pm 10,03 \mu\text{M}$) war somit wesentlich schwächer als an CYP260A1, jedoch stärker als an CYP109B1. In CYP109B1 konnte das Substrat Testosteron jedoch keinen TypI-Shift induzieren (Girhard et al. 2010). Vitamin D3 war nicht in der Lage, in CYP109E1 einen high-spin Shift hervorzurufen, wofür die Tatsache, dass Vitamin D3 wesentlich größer und hydrophober als die übrigen Substanzen ist, ursächlich sein könnte. Vitamin D3 induzierte zwar einen high-spin Shift in CYP105A1 aus *Streptomyces griseolus* (Sawada et al. 2004); für diese Bindung wurde aber kein K_D -Wert bestimmt.

Isolongifolen-9-on, Nootkaton, Testosteron und Vitamin D3 wurden von CYP109E1 jeweils zu einem Haupt- und einem bis mehreren Nebenprodukten umgesetzt. Abgesehen vom Nebenprodukt der CYP109E1-abhängigen Testosteron Umsetzung besaßen alle gebildeten Produkte eine geringere Retentionszeit als das jeweilige Substrat, was bei der hier eingesetzten reversed-phase HPLC bedeutete, dass die Produkte hydrophiler sind als das Substrat. Dies kann bei den meisten Cytochrom-P450 katalysierten Umsätzen beobachtet werden, da Cytochrome P450 ihre Substrate in der Regel zum Beispiel durch eine Hydroxylierung oxidieren und damit hydrophiler machen. Im Falle von Testosteron eluierte das Nebenprodukt jedoch später als Testosteron und war damit hydrophober als Testosteron selbst. Damit kann es sich bei diesem Nebenprodukt nicht um ein hydroxyliertes Testosteron-Derivat handeln, sondern der Bildung dieses Produktes müssen andere Mechanismen zugrunde liegen.

Vitamin D3 induzierte in CYP109A2 wie schon in CYP109E1 ein Differenzspektrum, das mit keinem der bekannten Bindungsspektren übereinstimmte. Wie von CYP109E1 konnte es aber auch von CYP109A2 erfolgreich umgesetzt werden. Im Vergleich zu CYP109E1 war die Umsetzung durch CYP109A2 jedoch wesentlich schlechter. Bei gleichen Reaktionsbedingungen wurde im Falle von CYP109E1 noch etwa 40% des Substrates detektiert, wohingegen im Falle von CYP109A2 nur etwa 5% des Vitamin D3 umgesetzt werden konnte. Des Weiteren trat bei CYP109A2 nur ein Produkt auf, das mit einem der fünf durch CYP109E1 gebildeten Produkte und dem Standard 25-Hydroxy-Vitamin D3 überlagerte. Da es sich bei dem nächsten Verwandten von CYP109A2, CYP109A1 aus *B. subtilis* W23, um ein P450 mit unbekannter Funktion handelt (Lawson et al. 2004), konnten dadurch keine Hinweise auf mögliche weitere Substrate erhalten werden. Um das Substratspektrum von CYP109A2 zu erweitern, bieten sich in zukünftigen Arbeiten die Testung von Strukturanaloga des Vitamin D3 und das Screening der Naturstoffbibliothek an.

Zur näheren Untersuchung der CYP109-abhängigen Substratumsetzungen wurden *in vitro* kinetische Analysen durchgeführt. Aus den vorhandenen Substraten von CYP109E1 wurde dafür Vitamin D3 ausgewählt. Da Vitamin D3 bisher das einzige Substrat von CYP109A2 darstellt, konnten diese beiden Enzyme dadurch bezüglich ihrer katalytischen Aktivität verglichen werden. Der für die katalytische Aktivität der CYP109E1-abhängigen Vitamin D3 Umsetzung berechnete V_{\max} -Wert von 23,9 nmol Produkte/nmol CYP109E1/min erreichte annähernd den hundertfachen Wert des für CYP109A2 berechneten V_{\max} -Wertes (263,8 pmol Produkt/nmol CYP109A2/min). Demnach weist CYP109E1 eine wesentlich höhere

Geschwindigkeit hinsichtlich des Vitamin D3 Umsatzes als CYP109A2 auf. Während der K_M -Wert im Falle von CYP109E1 etwas niedriger war als für CYP109A2 (32,8 versus 44,9 μM), unterschieden sich die Hill Konstanten nicht (1,80 versus 1,83). Um die katalytische Aktivität von CYP109E1 besser mit den Literaturangaben vergleichen zu können, wurde neben der Gesamtproduktbildung auch die katalytische Aktivität für die Bildung des Hauptproduktes, 25-Hydroxy-Vitamin D3, bestimmt. Dabei ergaben sich ein apparenter V_{\max} -Wert von 23,7 nmol 25-Hydroxy-Vitamin D3/nmol CYP109E1/min, ein apparenter K_M -Wert von 45,3 μM und eine Hill Konstante von 1,82. Die geringen Abweichungen zu den oben angegebenen Werten der Gesamtproduktbildung machen deutlich, dass unter den Bedingungen, unter denen die katalytische Aktivität bestimmt wurde, fast ausschließlich das Hauptprodukt 25-Hydroxy-Vitamin D3 gebildet wird. CYP109E1 weist damit für die 25-Hydroxylierung von Vitamin D3 einen ähnlichen V_{\max} -Wert auf wie der für die 1α -Hydroxylierung von 25-Hydroxy-Vitamin D3 durch murines CYP27B1 (Sakaki et al. 2011). Die V_{\max} -Werte der übrigen bekannten Vitamin D3-Hydroxylasen sind dagegen wesentlich niedriger und bewegen sich in der Größenordnung der katalytischen Aktivität von CYP109A2: CYP107 und humanes CYP27A1 wiesen beispielsweise V_{\max} -Werte von 290 bzw. 270 pmol Produkt/nmol CYP/min für die 25-Hydroxylierung von Vitamin D3 auf (Sakaki et al. 2011). Dagegen zeigten CYP105A1, CYP107, CYP27A1 und CYP2R1 für die 25-Hydroxylierung von Vitamin D3 jedoch deutlich geringere K_M -Werte als die beiden CYP109 (z. B. 0,45 μM für CYP2R1 und 13,5 für CYP107) (Sakaki et al. 2011). Demnach besitzt Vitamin D3 zu diesen Enzymen eine höhere Affinität als zu CYP109E1 und CYP109A2, so dass höhere Vitamin D3 Konzentrationen notwendig sind, um eine Halbsättigung dieser Enzyme zu erreichen. Zur Verbesserung der Vitamin D3 Umsetzung sollte daher zukünftig beispielsweise durch Mutagenesen eine Verringerung der K_M -Werte der beiden CYP109 angestrebt werden. Der V_{\max}/K_M Wert war für CYP109E1 etwa 66-fach höher als für CYP109A2, so dass CYP109E1 bezüglich des Umsatzes von Vitamin D3 eine wesentlich höhere katalytische Effizienz aufwies.

4.6. Ganzzellumsätze in *B. megaterium*

Nach der erfolgreichen Identifizierung von Substraten für alle drei Cytochrome P450 sollten die Strukturen der Reaktionsprodukte aufgeklärt werden. Für einen Großteil der eingesetzten Substrate standen keine Produktstandards zur Verfügung. Dadurch war eine Strukturaufklärung anhand einer Überlagerung im HPLC-Chromatogramm, wie zum Beispiel im Falle des 15 β -Hydroxy-Progesterons, für diese Substanzen nicht möglich. Eine detaillierte und eindeutige Charakterisierung der Produkte sollte deshalb mittels NMR-Spektroskopie erfolgen. Ein Nachteil dieser Methode besteht aber darin, dass für eine Strukturaufklärung Produktausbeuten im mg-Bereich benötigt werden. Ein Upscale der *in vitro* Reaktionen zum Erreichen der geforderten Produktmengen würde aber mit dem Verbrauch einer großen Menge an gereinigten Proteinen sowie der Cofaktoren NADPH und Glucose-6-Phosphat einhergehen, was wiederum mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand verbunden wäre. Eine Alternative stellt ein Cytochrom P450 abhängiger Ganzzellbiokatalysator dar, da dadurch keine Proteine gereinigt werden müssen und auch die Regeneration der Cofaktoren durch die Zelle selbst erfolgt. Seit Kurzem existiert in unserem Arbeitskreis ein rekombinantes Ganzzell-System, das die Expression von Cytochrom P450 Systemen in *B. megaterium* MS941 ermöglicht (Bleif et al. 2012). Auch in dieser Arbeit erschien es sinnvoll, die aus *B. megaterium* DSM319 stammenden Cytochrome P450 und Redoxproteine in dem Stamm *B. megaterium* MS941, einer Protease-defizienten Mutante von *B. megaterium* DSM319 (Wittchen und Meinhardt 1995), zu exprimieren, da für diese Proteine so ein nahezu natürliches zelluläres Milieu gewährleistet war. Einen weiteren Grund stellte die bereits erfolgreiche Expression der Reduktase Arh1 in *B. megaterium* MS941 dar (Kleser et al. 2012). Darüber hinaus besitzt *B. megaterium* im Gegensatz zu *E. coli* die Fähigkeit, hydrophobe Substanzen aufzunehmen und umzusetzen, was für die in dieser Arbeit identifizierten hydrophoben Substrate wie zum Beispiel Vitamin D3 und KBA bedeutend war.

4.7. Strukturaufklärung der Produkte

4.7.1. Produktcharakterisierung des CYP106A1-abhängigen KBA Umsatzes

Für CYP106A1 konnten Steroide und Terpenoide als Substrate identifiziert werden, wobei sich die durch CYP106A1 katalysierten Steroid-Umsätze nicht von den entsprechenden CYP106A2-abhängigen Umsätzen unterschieden. Unter den Terpenoiden stellte die pentazyklische Triterpensäure KBA die einzige mittels HPLC analysierbare Substanz dar, die von CYP106A1 zu einem anderen Produktmuster umgesetzt wurde als von CYP106A2 (Bleif et al. 2012). Daher wurden die Ganzzellumsätze ausschließlich mit dem Substrat KBA durchgeführt. Das Hauptprodukt konnte als 7 β -Hydroxy-KBA identifiziert werden, bei dem Nebenprodukt handelte es sich um eine Mischung von 7 β ,15 α -Dihydroxy-KBA und 15 α -Hydroxy-KBA in einem Verhältnis von 2:1 (Brill et al. 2013). 15 α -Hydroxy-KBA wurde auch als Hauptprodukt der CYP106A2-abhängigen KBA Umsetzung identifiziert (Bleif et al. 2012), wohingegen die Synthese und NMR-Analyse von 7 β -Hydroxy-KBA und 7 β ,15 α -Dihydroxy-KBA bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurden.

Pentazyklische Triterpene (PTs) besitzen umfangreiche einzigartige biologische Aktivitäten und weisen klinische Signifikanz als weit verbreitete Therapeutika für die Prävention und Behandlung von Stoffwechsel- und Gefäßerkrankungen auf (Sheng und Sun 2011). Boswelliasäuren (BAs) stellen die wichtigsten bioaktiven Bestandteile des Harzextraktes aus der Weihrauchkiefer *Boswellia serrata* dar und werden in der indischen ayurvedischen Medizin zur Behandlung entzündlicher und arthritischer Erkrankungen eingesetzt (Gupta et al. 2001; Krüger et al. 2008). Die molekularen Angriffspunkte der pharmakologischen Aktivitäten der BAs sind die 5- und 12-Lipoxygenase (Poeckel und Werz 2006), die Cyclooxygenase-1 (Siemoneit et al. 2008), die humane Leukozytenelastase (Safayhi et al. 1997), der „nuclear factor- κ B“ (Syrovets et al. 2005), Topoisomerasen (Syrovets et al. 2000), Cathepsin G (Tausch et al. 2009) und die mikrosomale Prostaglandin E2 Synthase (Wertz 2009). Allerdings deckten pharmakologische Studien eine schlechte Bioverfügbarkeit der BAs, insbesondere der KBA, einer der wirksamsten BAs, auf (Krüger et al. 2008), welche möglicherweise durch strukturelle Modifikationen der KBA wie zum Beispiel die Hydroxylierung von Kohlenstoffatomen verbessert werden könnte. Die Hydroxylierung nicht-aktiver Kohlenstoffatome, wie die des C7 der KBA stellt eine Reaktion dar, die durch traditionelle chemische Methoden nicht möglich ist (Rabe et al. 2008). Die in dieser Arbeit

identifizierten neuartigen Substanzen sind daher interessante KBA Derivate, die möglicherweise eine höhere Bioverfügbarkeit oder verbesserte pharmakologische Aktivitäten im Vergleich zu dem Substrat KBA besitzen. Zudem könnten diese Substanzen den Ausgangspunkt für zusätzliche Modifikationen durch chemische Methoden bilden. Das CYP106A1 Ganzzellsystem war in der Lage, KBA innerhalb von 100 min vollständig zu konvertieren, wobei das Hauptprodukt 7 β -Hydroxy-KBA mit einer Selektivität von etwa 83% gebildet wurde. Mit einer theoretischen Ausbeute von 560,7 mg 7 β -Hydroxy-KBA L⁻¹ wies das CYP106A1 System somit die gleiche Produktivität auf wie die 15 α -Hydroxy-KBA Bildung durch das CYP106A2 System (Bleif et al. 2012). Da dieser Wert ohne weitere Optimierungen erhalten wurde, könnte die Ausbeute durch den Einsatz unterschiedlicher Medien und die Änderung von Kulturbedingungen wie Temperatur, pH-Wert und eingesetzte KBA-Konzentration wahrscheinlich noch weiter gesteigert werden.

4.7.2. Produktcharakterisierung der CYP109E1- und CYP109A2-abhängigen Substratumsätze

Als Substrate von CYP109E1 wurden die beiden Sesquiterpene Isolongifolen-9-on und Nootkaton, das Steroid Testosteron und das von Steroiden abgeleitete Vitamin D3 identifiziert, wobei mit Ausnahme von Vitamin D3 für diese Substanzen keine Produktstandards zur Verfügung standen. Das Hauptprodukt des CYP109E1-abhängigen Vitamin D3 Umsatzes und das Produkt des CYP109A2-abhängigen Vitamin D3 Umsatzes überlagerten im HPLC-Chromatogramm mit dem Standard 25-Hydroxy-Vitamin D3, was jedoch nicht als Beweis für die Bildung von 25-Hydroxy-Vitamin D3 ausreichte. Daher wurden alle vier Substanzen im großen Maßstab umgesetzt, die Produkte gereinigt und deren Struktur mittels NMR Spektroskopie analysiert. Im Falle von Testosteron konnte auch die Struktur des Nebenproduktes bestimmt werden, während für die übrigen drei Substanzen die Mengen der Nebenprodukte zu gering waren, um eine Strukturbestimmung mittels NMR zu ermöglichen.

Isolongifolen-9-on und Nootkaton

Sesquiterpene, zu denen die hier identifizierten Substrate Isolongifolen-9-on und Nootkaton gehören, stellen die vielfältigste Gruppe der Terpenoide dar und sind Bestandteile pflanzlicher ätherischer Öle (Fraga 2012). So wurden viele Pflanzen, die Sesquiterpene enthalten, in der traditionellen Medizin eingesetzt (Galani et al. 2010). Derivate der Sesquiterpene gelten als bioaktive Substanzen mit begehrten Geruchs- und Geschmackseigenschaften (Fraga 2012), wobei die zusätzliche Hydroxylierung der Sesquiterpene oft zu einer Verstärkung ihrer sensorischen Eigenschaften führt (Cankar et al. 2011) und daher einen essentiellen Schritt in der Herstellung von Aromastoffen bildet. Auf die Hydroxylierung folgt meist eine weitere Funktionalisierung durch zum Beispiel Epoxidierungen oder Reduktionen, wobei vor allem die Hydroxylierung durch chemische Methoden mit hohem Zeit- und Kostenaufwand sowie einer geringen Chemo-, Stereo- und Regio- und Enantioselektivität verbunden ist (Bicas et al. 2009). Cytochrome P450 stellen diesbezüglich eine erfolgsversprechende Alternative dar, da sie in der Lage sind, eine Vielzahl sehr spezifischer Oxidationsreaktionen durchzuführen (Urlacher und Girhard 2012).

Bei dem Hauptprodukt des Umsatzes des Sesquiterpens Isolongifolen-9-on handelte es sich um (4R)-4-Hydroxy-Isolongifolen-9-on. Diese Substanz ist in der Literatur entsprechend einer anderen Nomenklatur auch unter dem Namen (9R)-9-Hydroxy-Isolongifolen-4-on zu finden. Für (4R)-4-Hydroxy-Isolongifolen-9-on konnte eine wirksame Inhibierung der Tyrosinase nachgewiesen werden (Choudhary 2003), die als Schlüsselenzym der Melaninbiosynthese in Pflanzen und Tieren bekannt ist. Die Entwicklung von Tyrosinase Inhibitoren hat daher klinische Relevanz für die Behandlung einiger dermatologischer Erkrankungen, die mit einer Melanin Hyperpigmentierung einhergehen (Shiino et al. 2001). Daneben werden diese Inhibitoren auch in Kosmetika zum Bleichen der Haut und zur Depigmentierung nach einem Sonnenbrand eingesetzt (Shiino et al. 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass (4R)-4-Hydroxy-Isolongifolen-9-on die durch chemische Mutagene induzierte SOS-Antwort in *Salmonella typhimurium* unterdrücken kann (Sakata et al. 2010). Durch mikrobielle Transformation von Isolongifolen-9-on durch verschiedene Pilze wie zum Beispiel *Aspergillus niger* konnte neben anderen Produkten (4R)-4-Hydroxy-Isolongifolen-9-on isoliert werden (Choudhary 2003). Auch bei der Biotransformation von Isolongifolen durch den Pilz *Glomerella cingulata* entstand (4R)-4-Hydroxy-Isolongifolen-9-on neben anderen Produkten in einem Anteil von 15% (Sakata et al. 2010). Im Gegensatz zu den durch

die Biotransformation erhaltenen Produktgemischen wird Isolongifolen-9-on von CYP109E1 fast ausschließlich zu (4R)-4-Hydroxy-Isolongifolen-9-on umgesetzt, so dass CYP109E1 eine wesentlich höhere Regioselektivität gewährleistet. Mit CYP109E1 ist zudem das für die Umsetzung verantwortliche Enzym bekannt, wohingegen diese Enzyme in den beiden erwähnten Pilzen nicht identifiziert wurden. Das Vorhandensein des Gens für dieses Enzym ermöglichte hier eine Überexpression von CYP109E1, wodurch eine effiziente Umsetzung von 100µM Isolongifolen-9-on innerhalb weniger Stunden erreicht werden konnte. Neben dem Vorteil der höheren Regioselektivität ist das in dieser Arbeit identifizierte System somit auch wesentlich schneller als die bisher bekannten Systeme, die eine Umsatzzeit von 7 bis 15 Tage erfordern (Choudhary 2003; Sakata et al. 2010). Wie CYP109E1 konnte auch CYP260A1 Isolongifolen-9-on als Substrat akzeptieren (Ringle 2013). Die Umsätze waren jedoch relativ schwach und mit der Bildung von insgesamt fünf Produkten auch unselektiv. Dagegen wies CYP109E1 bezüglich des Isolongifolen-9-on Umsatzes eine höhere Regioselektivität auf.

Das Sesquiterpen Nootkaton ((4R,5S,7R)-Nootkaton) ist ein natürlicher Aromastoff, der in den Schalenölen vieler Zitrusfrüchte wie der Grapefruit vorkommt. Nootkaton weist vielfältige biologische Aktivitäten auf und findet deshalb eine breite Anwendung: Neben dem Einsatz als Riech- und Duftstoff für die Kosmetik- und Arzneimittelindustrie sowie als Aromastoff für die Lebensmittelindustrie (Fraatz et al. 2009) besitzt Nootkaton durch Hemmung der Acetylcholintransferase und von humanen Cytochromen P450 auch eine pharmakologische Bedeutung (Fraatz et al. 2009). Daneben kann Nootkaton aufgrund seiner insektiziden Wirkung auch als Insektenrepellent eingesetzt werden (Panella et al. 2005). Nootkaton wurde von CYP109E1 zu einem Haupt- und einem Nebenprodukt umgesetzt. Das Hauptprodukt wurde als eine 1:1 Mischung aus den beiden C11-Epimeren (4R,5S,7R,11S)-11,12-Epoxy-Nootkaton und (4R,5S,7R,11R)-11,12-Epoxy-Nootkaton bestimmt. Damit entsteht ein anderes Produkt als durch CYP264B1 (13-Hydroxy-Nootkaton) (Ly et al. 2012) und CYP260A1 (4-Hydroxy-Nootkaton) (Ringle 2013) aus *S. cellulorum* So ce56. 11,12-Epoxy-Nootkaton wurde als Metabolit im Urin nach dem Konsum von Grapefruitsaft gefunden (Chayen 1988). Es entsteht zudem photochemisch nach Bestrahlung von Nootkaton mit UV-Licht (Tateba et al. 1992) und kann wie auch Nootkaton selbst als Insektenrepellent eingesetzt werden (Maupin et al. 2002). Da die entsprechenden Negativkontrollen in dieser Arbeit keinen Umsatz von Nootkaton zeigten, kann die Bildung von 11,12-Epoxy-Nootkaton

durch UV-Licht ausgeschlossen werden, so dass dieses eindeutig durch die Aktivität von CYP109E1 entsteht. In der Literatur konnte die Bildung dieses Nootkaton-Derivates schon beschrieben werden: Die Transformation von (+)-Valencen mit *Chaetomium globosum* führte neben Nootkaton zu weiteren Oxidationsprodukten wie zum Beispiel 11,12-Epoxy-Nootkaton (Kaspera et al. 2005). Zudem konnte für verschiedene Nootkaton Derivate wie 11S,12-Epoxy-Nootkaton ein antiproliferativer Effekt auf eine humane Leukämie Zelllinie nachgewiesen werden (Gliszczyńska et al. 2011).

Testosteron

Steroide sind Triterpenoid Lipide mit einer spezifischen, aus vier Cycloalkan Ringen (A-D) bestehenden Struktur. Sie sind in der Natur weit verbreitet und konnten in Pflanzen, Insekten, Vertebraten und auch in niederen Eukaryoten gefunden werden (Donova und Egorova 2012). Die physiologischen Funktionen der Steroide reichen von ihrer Funktion als Steroidhormone (Glucocorticoide, Mineralcorticoide, Sexualhormone) und Gallensäuren über die Kontrolle wichtiger Aspekte der Zellproliferation und der Gewebedifferenzierung bis hin zur Regulation von Signalübertragungswegen (Donova und Egorova 2012). Daneben werden Steroide und Steroidderivate auch von der pharmazeutischen Industrie als Diuretika, Kontrazeptiva, Entzündungshemmer, Anabolika, Immunsuppressiva und zur Vorbeugung und Behandlung vieler schwerwiegender Erkrankungen wie hormonabhängigem Brust- und Prostatakrebs, HIV und neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt (Bhatti und Khera 2012). Aktuell sind mehr als 300 zugelassene steroidale Arzneimittel bekannt und steroidale Medikamente gehören zu den von der pharmazeutischen Industrie am stärksten vermarkteten Produkten (Tong und Dong 2009). In diesem Zusammenhang stellt die mikrobielle Steroid Transformation eine leistungsstarke Möglichkeit zur Herstellung neuartiger steroidaler Arzneimittel dar, da die entsprechenden Positionen am Steroidgerüst durch chemische Reagenzien kaum zugänglich sind (Donova und Egorova 2012).

In dieser Arbeit konnte das Steroid Testosteron von CYP109E1 zu dem Hauptprodukt 16 β -Hydroxy-Testosteron und dem Nebenprodukt Androstendion, das im Unterschied zu Testosteron an Position 17 eine Keto- statt einer Hydroxygruppe besitzt, umgesetzt werden. Anhand von *in vitro* und *in vivo* Umsätzen konnte gezeigt werden, dass 16 β -Hydroxy-Testosteron von CYP109E1 nicht als Substrat akzeptiert wird und dass 16 β -Hydroxy-

Testosteron und Androstendion folglich unabhängig voneinander entstehen. Testosteron wird von vielen verschiedenen humanen mikrosomalen Cytochromen P450 wie zum Beispiel CYP3A4 zu 16 β -Hydroxy-Testosteron metabolisiert. Jedoch katalysiert CYP3A4 die Monohydroxylierung von Testosteron an insgesamt zehn verschiedenen Positionen (Evans und Relling 1999), weist also keine Stereo- und Regioselektivität bezüglich der Hydroxylierung von Testosteron auf. Zudem sind Säuger P450 durch eine geringere Stabilität und Aktivität sowie eine schlechtere Expression als bakterielle P450 gekennzeichnet. Kürzlich wurde mit CYP102A1 M11, einer 10-fach Mutante von CYP102A1 (BM3), die erste bakterielle Steroid Hydroxylase publiziert, die die 16 β -Hydroxylierung von Steroiden wie Testosteron katalysieren kann (Vottero et al. 2011). Diese Mutante lieferte neben 16 β -Hydroxy-Testosteron aber auch 2 β -Hydroxy-Testosteron und 15 α -Hydroxy-Testosteron (Vottero et al. 2011). Durch die zusätzliche Mutation A82W in den Mutanten M01 und M11 konnten Enzyme erhalten werden, die zu einem 16 β -Hydroxy-Testosteron Anteil von 85% bzw. 75% führten (Rea et al. 2012). Durch diese Mutationen konnte der Anteil an 16 β -Hydroxy-Testosteron demnach zwar gesteigert werden, doch es traten im Gegensatz zu der durch CYP109E1 katalysierten Testosteron Umsetzung weiterhin zusätzliche hydroxylierte Derivate auf. Bezüglich der Hydroxylierungspositionen unterscheiden sich bakterielle und humane P450 zum Teil: Während beide die 2 α -, 2 β -, 6 β -, 15 β -, 16 α - und 17-Hydroxylierung von Testosteron katalysieren, konnte die 7 β - und 12 β -Hydroxylierung bisher nur durch bakterielle P450 realisiert werden (Agematu et al. 2006). Auch das nahe verwandte CYP109B1 aus *B. subtilis* akzeptiert Testosteron als Substrat und oxidiert es im Gegensatz zu CYP109E1 an der Positionen 15 β . Daneben erfolgte wie im Falle von CYP109E1 eine Oxidierung an Position 17, welche zu Androstendion führt (Agematu et al. 2006; Arisawa und Agematu 2007). Bei CYP109E1 handelt es sich damit um das erste bakterielle Wildtyp-P450, das die 16 β -Hydroxylierung von Steroiden katalysieren kann. Für 16 β -Hydroxy-Testosteron sind bisher keine Anwendungsmöglichkeiten bekannt, da diese Substanz bisher nicht in großen Mengen zur Verfügung stand bzw. noch keine Untersuchungen zu ihrer Wirkungsweise durchgeführt wurden. Durch das CYP109E1 Ganzzellsystem besteht nun jedoch die Möglichkeit, größere Mengen an 16 β -Hydroxy-Testosteron herzustellen und diese Substanz in Zellkulturexperimenten auf pharmakologische Wirkungen zu untersuchen, da Steroidderivaten wie schon erwähnt ein großes Potential zur Entwicklung neuer Arzneimittel zukommt. Zu den aktuell für die pharmazeutische Industrie wichtigsten Reaktionen zählt die 16 α -Hydroxylierung von Steroiden (Donova und Egorova 2012). Durch ungerichtete oder gerichtete Mutagenesen unter Berücksichtigung eines Homologiemodells von CYP109E1

könnte des Weiteren der Versuch unternommen werden, die Stereoselektivität von einer 16 β - zu einer 16 α -Hydroxylierung zu ändern.

Vitamin D3

Vitamin D3 ist ein fettlösliches Prohormon, das in der Haut durch ultraviolette Strahlung aus 7-Dehydrocholesterol gebildet oder durch die Nahrung aufgenommen wird. Vitamin D3 ist biologisch inaktiv und wird durch CYP27A1 und CYP2R1 in der Leber zu 25-Hydroxy-Vitamin D3 und anschließend durch CYP27B1 in der Niere zu der aktiven Form 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D3 umgewandelt (Schuster 2011). Aktives Vitamin D3 spielt in Säugern eine wichtige Rolle im Knochenmetabolismus, der Immunität sowie der Kontrolle der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung.

Vitamin D3 konnte durch CYP109E1 und CYP109A2 zu 25-Hydroxy-Vitamin D3 umgesetzt werden. Dabei stellte 25-Hydroxy-Vitamin D3 das einzige Produkt des CYP109A2-abhängigen Vitamin D3 Umsatzes dar, während CYP109E1 daneben noch vier weitere Produkte bildete. Eines dieser weiteren Produkte überlagerte im HPLC-Chromatogramm mit dem Standard 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D3, wobei die Mengen dieses Produktes und die der übrigen Nebenprodukte für eine Strukturaufklärung mittels NMR zu gering waren. In weiterführenden Studien sollten die Strukturen dieser Nebenprodukte jedoch mittels LC-MS oder nach Optimierung bzw. Upscale der Umsätze mittels NMR bestimmt werden. Dadurch könnten neben dem Nachweis der Bildung von 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D3 weitere pharmazeutisch interessante Vitamin D3-Derivate identifiziert werden. So produzierte die Mutante CYP105A1 R73V/R84A neben 25-Hydroxy-Vitamin D3 und 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D3 auch 1 α ,25,26-Trihydroxy-Vitamin D3 (Hayashi et al. 2010). Diese Substanz weist bei vergleichbaren antiproliferativen Aktivitäten einen wesentlich geringeren kalzämischen Effekt als 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D3 auf und ist damit für die Entwicklung eines Antikrebsmittels geeignet (Hayashi et al. 2010). In der Literatur sind weitere Vitamin D3 Hydroxylasen zu finden: Die bakteriellen P450 CYP105A1 aus *Streptomyces griseolus* und CYP105A2 und CYP107 aus *Pseudonocardia autotrophica* (früher als *Amycolata autotrophica* bezeichnet) sind in der Lage, Vitamin D3 zu 25-Hydroxy-Vitamin D3 und 1 α ,25-Dihydroxy-Vitamin D3 umzusetzen (Fujii et al. 2009; Hayashi et al. 2010; Sawada et al. 2004).

25-Hydroxy-Vitamin D3 stellt die Hauptform des im Körper zirkulierenden Vitamin D3 dar und wird als Standard zur Untersuchung des Vitamin D3-Blutspiegels bei der klinischen Labordiagnostik eingesetzt. Zudem ist zum Beispiel bei einer Leberzirrhose die Substitution von 25-Hydroxy-Vitamin D3 notwendig. Darüber hinaus ist eine Anwendung der Vitamin D3-Derivate zur therapeutischen Behandlung von Haut-, Leber- und Nierenerkrankungen beim Menschen sowie als Futtermittelzusatz in der Tierzucht möglich (Schuster 2011). Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass 25-Hydroxy-Vitamin D3 selbst als Hormon fungieren kann, so dass eine potentielle Anwendung dieser Substanz als nichttoxisches, natürliches, chemopräventives Arzneimittel zur Vorbeugung von Krebs erfolgen kann (Lou et al. 2010; Peng et al. 2009). Ein Mangel an 25-Hydroxy-Vitamin D3 und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D3 führt zu einem erhöhten Risiko, an chronischen Krankheiten wie Osteoporose, Autoimmunkrankheiten, kardiovaskulären Krankheiten, Diabetes mellitus Typ 1, Infektionskrankheiten und bestimmten Krebsarten zu erkranken (Jean et al. 2008). Daraus ergibt sich ein großer industrieller Bedarf an verschiedenen biologisch aktiven Vitamin D3-Derivaten. Die konventionelle chemische Synthese von Vitamin D3-Derivaten beruht auf der Extraktion eines Gallensäurederivates aus tierischen Organismen und dessen mehrstufiger Weiterverarbeitung, wodurch nach etwa 20 Schritten 25-Hydroxy-Vitamin D3 und $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D3 mit einer sehr geringen Ausbeute von unter 1% erhalten werden (Kametani und Furuyama 1987). Die schwierige Synthese des 25-Hydroxy-Vitamin D3 und der hohe Bedarf an dieser Substanz wird auch an den aktuellen Marktpreisen deutlich: Während der Preis für 1 g Vitamin D3 bei 42 Euro liegt, kostet 1 mg 25-Hydroxy-Vitamin D3 218 Euro (jeweils Sigma-Aldrich). Damit ergibt sich eine sehr hohe Wertschöpfung durch die Hydroxylierung des Vitamin D3 an der Position C25, und 25-Hydroxy-Vitamin D3 besitzt gegenüber dem Ausgangsstoff einen etwa 5000-fach höheren Marktwert. Durch die in dieser Arbeit eingesetzten CYP109E1 bzw. CYP109A2 Ganzzellsysteme konnten Ausbeuten von 26 bzw. 29 mg 25-Hydroxy-Vitamin D3 $L^{-1} Tag^{-1}$ erzielt werden. Diese Werte können mit den Ausbeuten anderer Vitamin D3 Biokonversionen verglichen werden: Durch Screening einer Vielzahl an Bakterien- und Pilzstämmen konnten zwölf Stämme identifiziert werden, die Vitamin D3 umsetzten, unter denen der Stamm *Amycolata autotrophica* mit 8,3 mg 25-Hydroxy-Vitamin D3 und 0,17 mg $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D3 pro Liter Kultur in 120 h die höchste Aktivität aufwies (Sakaki et al. 2011). Bei Überexpression von CYP105A2 in *S. lividans* konnten 20 mg 25-Hydroxy-Vitamin D3 pro Liter Kultur produziert werden (Sakaki et al. 2011). Die maximale Ausbeute an 25-Hydroxy-Vitamin D3 durch ein rekombinantes CYP105A1 (R73V/ R84A) *B. megaterium* Ganzzellsystem betrug 0,5 mg/Liter $L^{-1}/24h$

(Kleser 2011). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ausbeuten an 25-Hydroxy-Vitamin D3 wurden ohne weitere Optimierungen erhalten. Somit könnten diese Werte durch Testung verschiedener Medien und Kulturbedingungen wie dem pH-Wert, der Temperatur und der Vitamin D3-, Cyclodextrin- und Saponin-Konzentrationen noch gesteigert werden. Eine zusätzliche Möglichkeit stellt der Wechsel von den in dieser Arbeit eingesetzten Schüttelkolben zu einem Fermenter dar, in dem durch weitere Optimierung verschiedener Parameter wie etwa der Sauerstoffkonzentration die Ausbeuten erhöht werden können. Ein weiterer Ansatzpunkt ergibt sich in der Mutagenese von CYP109E1 und CYP109A2, da beispielsweise die Aktivitäten von CYP107 und CYP105A1 durch die Einführung von Punktmutationen mittels molekularer Evolution und gerichteter Mutagenese erheblich gesteigert werden konnten (Fujii et al. 2009; Hayashi et al. 2010).

Anhand der umgesetzten Substrate zeigte sich, dass CYP109E1 ein sehr vielseitiges Cytochrom P450 ist: Neben dem Steroid Testosteron konnten auch kleinere Moleküle wie Sesquiterpene und sehr große Moleküle wie Vitamin D3 umgesetzt werden. Um das Substratspektrum von CYP109E1 zu erweitern, könnten Strukturanaloga der bereits identifizierten Substrate wie α - und β -Ionon, Valencen oder Vitamin D2 auf einen Umsatz durch CYP109E1 überprüft werden. Des Weiteren könnte auch getestet werden, ob die Substrate des homologen CYP109B1 aus *B. subtilis* wie beispielsweise Compactin, Betamethasondipropionat, Androsta-1,4-dien-3,17-dion sowie verschiedene Progesteron- und Testosteronderivate und Fettsäuren auch von CYP109E1 als Substrate akzeptiert werden (Girhard et al. 2010). Nach der erfolgreichen Identifizierung von Substraten für CYP106A2 und CYP106A1 stellt das Screening der Naturstoffbibliothek eine weitere vielversprechende Möglichkeit dar, neue interessante Substrate für CYP109E1 zu finden.

In dieser Arbeit konnte CYP109E1 als Vitamin D3-Hydroxylase, Steroidhydroxylase und –oxidase sowie als Sesquiterpenhydroxylase und –epoxidase identifiziert werden. Abgesehen von der schon erwähnten Diversität bezüglich der akzeptierten Substrate ist CYP109E1 zudem in der Lage, unterschiedliche Reaktionen zu vollführen: Neben der Hydroxylierung nicht-aktivierter Kohlenstoffe wie im Falle von Vitamin D3, Isolongifolen-9-on und Testosteron besitzt CYP109E1 auch die Fähigkeit, Hydroxygruppen zu Ketogruppen zu oxidieren wie im Falle des Umsatzes von Testosteron zu Androstendion. Zudem ist CYP109E1 in der Lage, Doppelbindungen zu oxidieren, wie am Beispiel der Epoxidierung von Nootkaton zu 11,12-Epoxy-Nootkaton nachgewiesen werden konnte. CYP109E1 besitzt folglich ein großes Potential, da oxidierte Vitamin D3-, Steroid- und Terpendervative

biotechnologisch und pharmazeutisch sehr interessant und begehrt sind und durch den Einsatz von CYP109E1 als Biokatalysator zukünftig weitere neue Substrate und Produkte mit vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten identifiziert werden können. Für CYP109A2 konnte in dieser Arbeit zwar nur Vitamin D3 als Substrat identifiziert werden, welches durch das CYP109A2 Ganzzellsystem aber sehr effizient und mit einer hohen Regioselektivität zu dem einzigen Produkt 25-Hydroxy-Vitamin D3 umgesetzt werden konnte. Damit kann CYP109A2 als Biokatalysator zur Produktion des industriell begehrten 25-Hydroxy-Vitamin D3 eingesetzt werden.

4.8. Einfluss der Redoxpartner auf die Produktbildung

Um den Elektronentransfer in den neu identifizierten Cytochrom P450 Systemen detaillierter zu charakterisieren, wurden die vier Redoxpartner hinsichtlich ihrer Effizienz, als Elektronenmediator zwischen der Reduktase Arh1 und den Cytochromen P450 zu agieren, verglichen. In den *in vitro* Substratumsatzassays wiesen Fdx2 und Fdx3 für alle drei Cytochrome P450 die höchsten Produktbildungsraten auf. Im Falle von CYP109E1 und CYP109A2 führten Fld und Fdx4 zu ähnlichen Aktivitäten, wohingegen Fld eindeutig den schlechtesten Redoxpartner für CYP106A1 darstellte. Die Ergebnisse dieser *in vitro* Umsätze sind für alle Cytochrome P450 in Abb. 4.2 zusammengefasst.

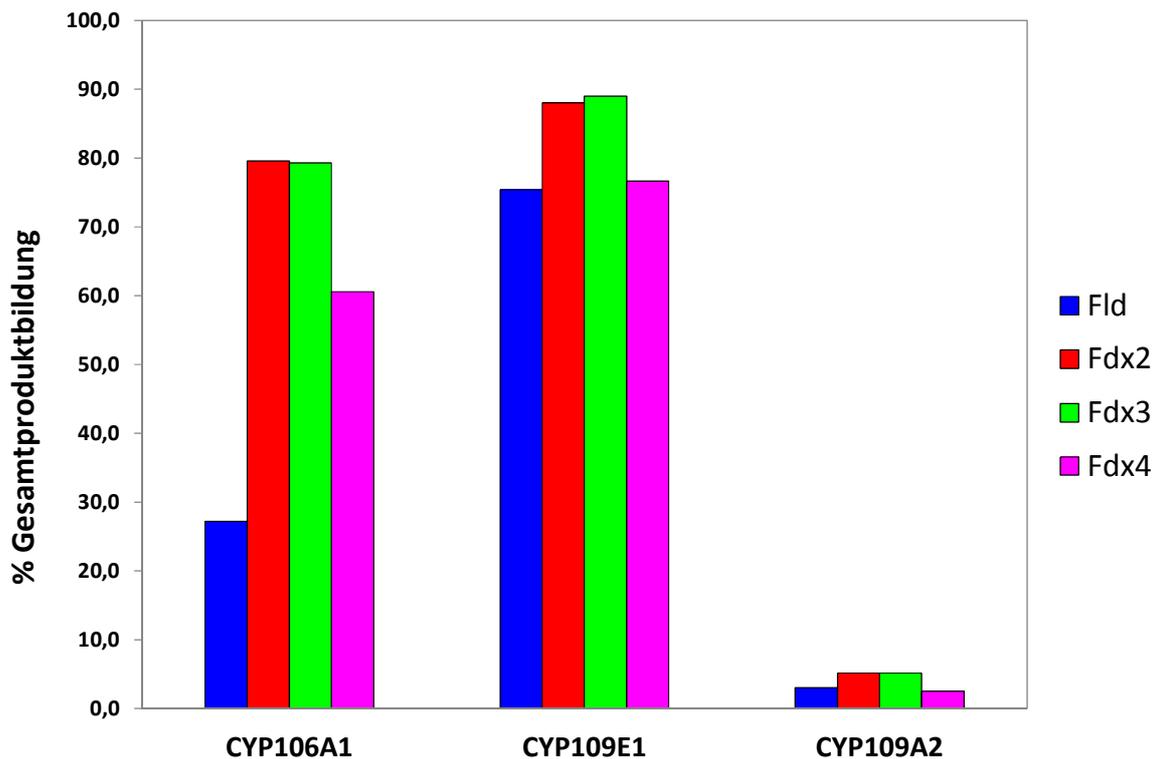


Abb. 4.2: Einfluss der Redoxpartner auf die Produktbildung der Cytochrom P540-abhängigen *in vitro* Umsätze von KBA, Isolongifolen-9-on bzw. Vitamin D3 durch CYP106A1, CYP109E1 bzw. CYP109A2. Für die *in vitro* Umsätze wurde die heterologe Ferredoxin Reduktase Arh1 zusammen mit dem Flavodoxin Fld (blau) bzw. den Ferredoxinen Fdx2 (rot), Fdx3 (grün) und Fdx4 (pink) aus *B. megaterium* DSM319 eingesetzt.

Zusätzlich zu den *in vitro* Reaktionen wurden die vier Redoxproteine auch *in vivo* miteinander verglichen. Dazu wurden *B. megaterium* MS941 Ganzzell Biokatalysatoren hergestellt, die das jeweilige Cytochrom P450, die Reduktase Arh1 und entweder Fld, Fdx2, Fdx3 oder Fdx4 exprimierten. Zudem wurde jeweils ein *B. megaterium* MS941 Stamm konstruiert, der nur CYP106A1, CYP109E1 oder CYP109A2 ohne die Redoxpartner exprimierte. Die letztgenannten Stämme erreichten wie schon zuvor die *B. megaterium* MS941 Ganzzellsysteme, die nur CYP106A2 (Bleif 2012) bzw. CYP105A1 (Kleser et al. 2012) exprimierten, *in vivo* jeweils eine effiziente Substratumsetzung. Daraus ließ sich ableiten, dass unter den gewählten Umsatzbedingungen entsprechende Redoxpartner aus *B. megaterium* vorhanden und aktiv sein mussten. Bei diesen Redoxpartnern könnte es sich um die in dieser Arbeit klonierten Redoxproteine Fld, Fdx2, Fdx3 und/oder Fdx4 handeln, was jedoch zum

jetzigen Zeitpunkt anhand der zur Verfügung stehenden Daten nicht nachgewiesen werden kann. In weiterführenden Experimenten könnten die vier Gene in den *B. megaterium* Stämmen, die nur das jeweilige Cytochrom P450 exprimieren, ausgeknockt werden. Durch Vergleich der Substratumsetzung in diesen Knock-out Stämmen mit den vorherigen Werten könnten Informationen darüber erhalten werden, ob diese Redoxproteine für den Elektronentransfer *in vivo* verantwortlich sind. Zusammen mit den schon vorliegenden Daten der qRT-PCR, die eine Koexpression der Cytochrome mit dem Fld bzw. Fdx4 in Abhängigkeit vom Eisenlevel zeigten, könnte dadurch der Nachweis erbracht werden, dass Fld, Fdx2, Fdx3 und/oder Fdx4 die physiologischen Redoxpartner der Cytochrome P450 in *B. megaterium* darstellen. Beim Vergleich der fünf Ganzzell Biokatalysatoren traten für die drei Cytochrome P450 Unterschiede auf: Der Stamm, der nur CYP106A1 exprimierte, zeigte zwar eine relativ effiziente Substratumsetzung, welche jedoch durch die zusätzliche Expression der Redoxpartner signifikant (1,5- bis annähernd 2-fach) gesteigert werden konnte. Daran war erkennbar, dass die Konzentrationen der Redoxpartner die limitierenden Parameter dieses Ganzzellsystems darstellten. Im Gegensatz dazu wies der Stamm, der nur CYP109E1 exprimierte, während des gesamten Messzeitraums die beste Produktbildung auf. Bei den Ganzzell Biokatalysatoren des CYP109A2 Typs war die Produktbildung durch die Stämme, die nur CYP109A2 bzw. CYP109A2, Arh1 und Fdx3 oder Fdx4 exprimierten, vergleichbar effizient. Die Konzentrationen der Redoxpartner stellten in den CYP109E1 und CYP109A2 Ganzzellsystemen demzufolge nicht den limitierenden Faktor dar. Die Ursache für den geringeren Umsatz bei Coexpression der Redoxpartner könnte darin liegen, dass die Cytochrom P450 Konzentration durch die zusätzliche Expression weiterer Proteine verringert wird und dadurch der Umsatz sinkt. Eine verringerte P450 Expression wurde schon für das CYP106A2 Ganzzellsystem beobachtet, bei dem die CYP106A2-Konzentration durch die Coexpression eines bzw. zweier Proteine auf die Hälfte bzw. ein Drittel fiel (Bleif 2012). Dort führte diese Coexpression aber trotz der verringerten Cytochrom P450-Menge zu höheren Umsatzraten, wie dies auch in dieser Arbeit für CYP106A1 festgestellt wurde. Bei den CYP109E1 und CYP109A2 Ganzzell Biokatalysatoren stellt folglich ein anderer Parameter wie zum Beispiel die Substrataufnahme oder die NADPH-Konzentration den limitierenden Faktor dar. Die Ergebnisse dieser *in vivo* Umsätze sind für alle Cytochrome P450 in Abb. 4.3 zusammengefasst.

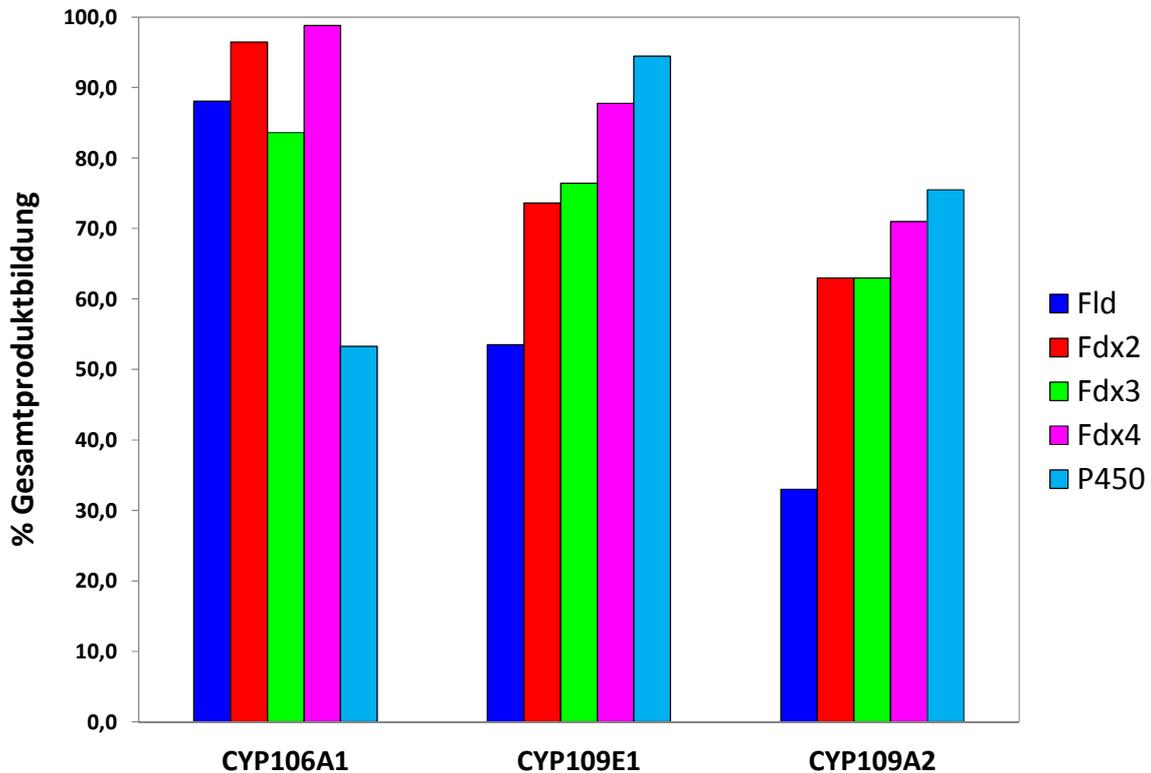


Abb. 4.3: Vergleich der Gesamtproduktbildung durch verschiedene Ganzzell Biokatalysatoren. Für jedes Cytochrom P450 wurden fünf *B. megaterium* Stämme verglichen, die nur das jeweilige Cytochrom P450 (hellblau) oder das jeweilige Cytochrom P450 und Arh1 zusammen mit Fld (blau), Fdx2 (rot), Fdx3 (grün) oder Fdx4 (pink) exprimierten. Die Quantifizierung erfolgte anhand des CYP106A1-abhängigen KBA Umsatzes bzw. des CYP109E1- und CYP109A2-abhängigen Umsatzes von Vitamin D3.

Fdx2 und Fdx3 führten *in vitro* jeweils zu den besten Produktbildungsraten, während Fdx4 *in vivo* höhere Werte aufwies als Fdx2 und Fdx3. Fld stellte *in vitro* den schlechtesten Redoxpartner für CYP106A1 dar, wies für CYP109E1 und CYP109A2 dagegen ähnliche Werte auf wie Fdx4. *In vivo* erreichte Fld in dem CYP106A1 System annähernd die gleichen Werte wie die Ferredoxine, wohingegen durch die Expression von Fld in beiden CYP109 Systemen jeweils die geringste Gesamtproduktbildung erreicht wurde. Insgesamt betrachtet stellen die Ferredoxine im Vergleich zu dem Flavodoxin demnach die besseren Redoxpartner für die Cytochrome P450 aus *B. megaterium* dar. Die Tatsache, dass die einzelnen Redoxpartner *in vitro* und *in vivo* unterschiedliche Produktbildungsraten zeigten, könnte durch unterschiedliche Stabilitäten der Redoxproteine oder durch unterschiedliche

Verhältnisse zwischen den Proteinen erklärt werden: Während *in vitro* ein Verhältnis von 3:20:1 für Arh1:Fld/Fdx:CYP benutzt wurde, war das Verhältnis *in vivo* 1:1:1 entsprechend der Klonierung der Gene in einen tricistronischen Vektor und nachfolgender Translation der Proteine in gleichen Mengen.

Die hohe katalytische Aktivität des P450 BM3 lässt sich unter anderem darauf zurückführen, dass die Redoxpartnerdomäne über einen kurzen Proteinlinker mit der P450-Domäne verknüpft ist und damit der Elektronentransfer sehr effizient erfolgen kann (Whitehouse et al. 2012). Zur Steigerung der Aktivität der *B. megaterium* Cytochrome P450 könnten diese an die in dieser Arbeit identifizierten autologen Redoxproteine fusioniert werden. Diese als molekulares „Lego“ bekannte Technik wurde schon erfolgreich für die Fusion des Flavodoxins aus *Desulfovibrio vulgaris* an die Häm-domäne des P450 BM3 eingesetzt und führte dort zu verbesserten elektrochemischen und katalytischen Eigenschaften (Fantuzzi et al. 2006). Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz sogenannter PCNAs (proliferating cell nuclear antigens) aus *Sulfolobus solfataricus* dar, die natürlicherweise Multienzymkomplexe bilden (Hirakawa und Nagamune 2013). Nach Fusion des P450 und der Redoxpartner an die PCNAs und anschließender separater Expression der drei Proteine assemblierten diese spontan zu einem heterotrimeren Multienzymkomplex, der sich aufgrund des effizienten Elektronentransfers durch eine erhöhte Aktivität auszeichnete (Hirakawa und Nagamune 2013). Dieser als PUPPET bezeichnete Ansatz stellt somit eine vielversprechende Möglichkeit dar, die katalytische Aktivität der in dieser Arbeit identifizierten Cytochrom P450 Systeme aus *B. megaterium* zu erhöhen. Die aus den Cytochromen P450 und ihren Redoxproteinen bestehenden Fusionsproteine und Multienzymkomplexe bieten neben der Untersuchung der zugrunde liegenden Elektronentransfer Mechanismen auch die Möglichkeit, die biotechnologischen Anwendungsmöglichkeiten der Cytochrom P450 Systeme zu erweitern.

5. Literaturverzeichnis

- Agematu H, Matsumoto N, Fujii Y, Kabumoto H, Doi S, Machida K, Ishikawa J, Arisawa A (2006) Hydroxylation of testosterone by bacterial cytochromes P450 using the *Escherichia coli* expression system. *Biosci Biotechnol Biochem.* 70(1):307-311
- Appleby AC (1967) A soluble haemoprotein P 450 from nitrogen-fixing *Rhizobium bacteroids*. *Biochim Biophys Acta.* 147(2):399-402
- Arisawa A, Agematu H (2007) A modular approach to biotransformation using microbial cytochrome P450 monooxygenases. In: Schmid R, Urlacher VB (eds) *Modern biooxidation.* Wiley-VCH, Weinheim, pp 177-192
- Armah CN, Mackie AR, Roy C, Price K, Osbourn AE, Bowyer P, Ladha S (1999) The membrane-permeabilizing effect of avenacin A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol. *Biophys J.* 76(1 Pt 1):281-290
- Asl MN, Hosseinzadeh H (2008) Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytother Res.* 22(6):709-724
- Asres K, Seyoum A, Veeresham C, Bucar F, Gibbons S (2005) Naturally derived anti-HIV agents. *Phytother Res.* 19(7):557-581
- Barg H, Malten M, Jahn M, Jahn D (2005) Protein and Vitamin Production in *Bacillus megaterium* vol 18. *Microbial processes and products*, 1st edn. Humana Press, Inc, Totowa 205–223
- Barnes HJ, Arlotto MP, Waterman MR (1991) Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88(13):5597–5601
- Beinert H (2000) Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J Biol Inorg Chem.* 5(1):2-15
- Bell SG, Hoskins N, Xu F, Caprotti D, Rao Z, Wong LL (2006) Cytochrome P450 enzymes from the metabolically diverse bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Biochem Biophys Res Commun.* 342(1):191–196
- Bell SH, Dickson DP, Rieder R, Cammack R, Patil DS, Hall DO, Rao KK (1984) Spectroscopic studies of the nature of the iron clusters in the soluble hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* (strain Norway 4). *Eur J Biochem.* 145(3):645-651
- 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 (1979) Isolation and characterization of cytochrome P-450meg. *Acta Biol Med Ger.* 38(2-3):333–344
- Berg JM, Tymoczko, JL, Stryer, L (2003) *Biochemie.* Spektrum Akademischer Verlag. 5 ed
- 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*. John Wiley and Sons, New York, pp 361–396
- Bhatti HN, Khera RA (2012) Biological transformations of steroidal compounds: A review. *Steroids*. 77(12):1267-1290
- 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, Yang Y, Deckwer WD, Malten M, Jahn D (2007) Plasmid system for the intracellular production and purification of affinity-tagged proteins in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng*. 96(3):525-537
- Bleif S (2012) Von der Identifizierung neuer Substrate der 15 β -Hydroxylase (CYP106A2) zur Cytochrom P450-Ganzzellkatalyse in *Bacillus megaterium*. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Bleif S, Hannemann F, Lisurek M, von Kries JP, Zapp J, Dietzen M, Antes I, Bernhardt R (2011) 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 (2012) 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*. 93(3):1135–1146
- Boddupalli SS, Estabrook RW, Peterson JA (1990) Fatty acid monooxygenation by cytochrome P-450BM-3. *J Biol Chem*. 265(8):4233-4239
- Breitmaier E (2005) *Terpene: Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone*. WILEY-VCH.
- Brill E, Hannemann F, Zapp J, Brüning G, Jauch J, Bernhardt R (2013) A new cytochrome P450 system from *Bacillus megaterium* DSM319 for the hydroxylation of 11-keto-beta-boswellic acid (KBA). *Appl Microbiol Biotechnol*. (in press) doi:10.1007/s00253-013-5029-0
- 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
- Cankar K, van Houwelingen A, Bosch D, Sonke T, Bouwmeester H, Beekwilder J (2011) A chicory cytochrome P450 mono-oxygenase CYP71AV8 for the oxidation of (+)-valencene. *FEBS Lett*. 585(1):178-182
- Challinor VL, De Voss JJ (2013) Open-chain steroidal glycosides, a diverse class of plant saponins. *Nat Prod Rep* 30(3):429-454
- Chapman SK, Reid GA (1999) *Flavoprotein Protocols*. Aus der Serie: *Methods in Molecular Biology*. Totowa, New Jersey, Humana Press.
- Chayen RM, Y; Wyler, H; Berman, E; Potgieter, E; Goldberg, S (1988) Urodiolenone from grapefruit juice, a urinary metabolite found in hypertensive subjects. *Phytochemistry*. 27(2):369-372
- Chefson A, Auclair K (2006) Progress towards the easier use of P450 enzymes. *Mol Biosyst*. 2(10):462-469
- Choudhary M, Musharraf SG, Khan MTH, Abdelrahman D, Pervaz M, Shaheen F, Atta-ur-Rahman (2003) Microbial transformation of Isolongifolen-4-one. *Helv Chim Acta*. 86 (10):3450-3460

- Chun Y-J, Shimada T, Sanchez-Ponce R, Martin MV, Lei L, Zhao B, Kelly SL, Waterman MR, Lamb DC, Guengerich FP (2007) Electron transport pathway for a *Streptomyces* cytochrome P450: cytochrome P450 105D5-catalyzed fatty acid hydroxylation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Biol Chem.* 282(24):17486–17500
- David F, Steinwand M, Hust M, Bohle K, Ross A, Dubel S, Franco-Lara E (2011) Antibody production in *Bacillus megaterium*: strategies and physiological implications of scaling from microtiter plates to industrial bioreactors. *Biotechnol J.* 6(12):1516-1531
- De Bary A (1884) Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozen und Bakterien. Wilhelm Engelmann, Leipzig
- de Carvalho CC, da Fonseca MM (2006) Biotransformation of terpenes. *Biotechnol Adv.* 24(2):134-142
- Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I (2005) Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev.* 105(6):2253-2277
- Donova MV, Egorova OV (2012) Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 94(6):1423-1447
- Duport C, Spagnoli R, Degryse E, Pompon D (1998) Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nat Biotechnol.* 16(2):186-189
- Dym O, Eisenberg D (2001) Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* 10(9):1712-1728
- Eastburn SD, Tao BY (1994) Applications of modified cyclodextrins. *Biotechnol Adv.* 12(2):325-339
- 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
- Erdner DL, Price NM, Doucette GJ, Peleato ML, Anderson DM (1999) Characterization of ferredoxin and flavodoxin as markers of iron limitation in marine phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser.* 184:43–53
- Estabrook RW, Baron J, Hildebrandt A (1971) A new spectral species associated with cytochrome P-450 in liver microsomes. *Chem Biol Interact.* 3(4):260-261
- Evans WE, Relling MV (1999) Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science.* 286(5439):487-491
- 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
- Ewen KM, Schiffler B, Takasaki Y, Bernhardt R, Hannemann F (2008) The endogenous adrenodoxin reductase-like flavoprotein arh1 supports heterologous cytochrome P450-dependent substrate conversions in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS yeast research.* 8(3):432–441
- Fantuzzi A, Meharena YT, Briscoe PB, Sassone C, Borgia B, Gilardi G (2006) Improving catalytic properties of P450 BM3 haem domain electrodes by molecular Lego. *Chem Commun (Camb).* 12:1289-1291

- Finn RD, Mistry J, Tate J, Coggill P, Heger A, Pollington JE, Gavin OL, Gunasekaran P, Ceric G, Forslund K, Holm L, Sonnhammer ELL, Eddy SR, Bateman A (2010) The Pfam protein families database. *Nucleic acids research* 38(Database issue):D211-222
- Fraatz MA, Berger RG, Zorn H (2009) Nootkatone--a biotechnological challenge. *Appl Microbiol Biotechnol.* 83(1):35-41
- Fraga BM (2012) Natural sesquiterpenoids. *Nat Prod Rep.* 29(11):1334-1366
- Francis G, Kerem Z, Makkar HP, Becker K (2002) The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr.* 88(6):587-605
- Fregel R, Rodriguez V, Cabrera VM (2008) Microwave improved *Escherichia coli* transformation. *Lett Appl Microbiol.* 46(4):498-499
- Freigang J, Diederichs K, Schäfer KP, Welte W, Paul R (2002) Crystal structure of oxidized flavodoxin, an essential protein in *Helicobacter pylori*. *Protein sci.* 11(2):253-261
- Fujii Y, Kabumoto H, Nishimura K, Fujii T, Yanai S, Takeda K, Tamura N, Arisawa A, Tamura T (2009) Purification, characterization, and directed evolution study of a vitamin D3 hydroxylase from *Pseudonocardia autotrophica*. *Biochem Biophys Res Commun.* 385(2):170-175
- Fulco AJ (1991) P450BM-3 and other inducible bacterial P450 cytochromes: biochemistry and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 31:177-203
- Galani VJ, Patel BG, Rana DG (2010) *Sphaeranthus indicus* Linn.: A phytopharmacological review. *Int J Ayurveda Res.* 1(4):247-253
- Gangeswaran R, Eady RR (1996) Flavodoxin 1 of *Azotobacter vinelandii*: characterization and role in electron donation to purified assimilatory nitrate reductase. *Biochem J.* 317 (Pt 1):103-108
- Garfinkel D (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys.* 77(2):493-509
- Girhard M, Klaus T, Khatri Y, Bernhardt R, Urlacher V (2010) Characterization of the versatile monooxygenase CYP109B1 from *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87(2):595-607
- Gliszczynska A, Lysek A, Janeczko T, Switalska M, Wietrzyk J, Wawrzenczyk C (2011) Microbial transformation of (+)-nootkatone and the antiproliferative activity of its metabolites. *Bioorg Med Chem.* 19(7):2464-2469
- Goldspiel BR (1997) Clinical overview of the taxanes. *Pharmacotherapy.* 17(5 Pt 2):110S-125S
- Goni G, Zöllner 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
- 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
- Graham SE, Peterson JA (1999) How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch Biochem Biophys.* 369(1):24-29

- Green AJ, Munro AW, Cheesman MR, Reid GA, Wachenfeldt Cv, Chapman SK (2003) Expression, purification and characterisation of a *Bacillus subtilis* ferredoxin: a potential electron transfer donor to cytochrome P450 BioI. *J Inorg Biochem.* 93(1-2):92–99
- Grinberg AV, Hannemann F, Schiffler B, Müller J, Heinemann U, Bernhardt R (2000) Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins.* 40(4):590–612
- 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
- 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
- Harada H, Misawa N (2012) Novel approach in the biosynthesis of functional carotenoids in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol.* 892:133-141
- 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
- Hayashi K, Yasuda K, Sugimoto H, Ikushiro S, Kamakura M, Kittaka A, Horst RL, Chen TC, Ohta M, Shiro Y, Sakaki T (2010) Three-step hydroxylation of vitamin D3 by a genetically engineered CYP105A1: enzymes and catalysis. *FEBS J.* 277(19):3999-4009
- 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
- He JS, Liang Q, Fulco AJ (1995) The molecular cloning and characterization of BM1P1 and BM1P2 proteins, putative positive transcription factors involved in barbiturate-mediated induction of the genes encoding cytochrome P450BM-1 of *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem.* 270(31):18615-18625
- He JS, Ruettinger RT, Liu HM, Fulco AJ (1989) Molecular cloning, coding nucleotides and the deduced amino acid sequence of P-450BM-1 from *Bacillus megaterium*. *Biochim Biophys Acta.* 1009(3):301-303
- Hirakawa H, Nagamune T (2013) Use of *Sulfolobus solfataricus* PCNA subunit proteins to direct the assembly of multimeric enzyme complexes. *Methods Mol Biol.* 978:149-163
- Huber C, Eisenreich W, Hecht S, Wächtershäuser G (2003) A possible primordial peptide cycle. *Science.* 301(5635):938-940
- Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C (2008) Daily oral 25-hydroxycholecalciferol supplementation for vitamin D deficiency in haemodialysis patients: effects on mineral metabolism and bone markers. *Nephrol Dial Transplant.* 23(11):3670-3676
- Jenkins CM, Waterman MR (1994) Flavodoxin and NADPH-flavodoxin reductase from *Escherichia coli* support bovine cytochrome P450c17 hydroxylase activities. *J Biol Chem.* 269(44):27401–27408
- Julsing MK, Schrewe M, Cornelissen S, Hermann I, Schmid A, Bühler B (2012) Outer membrane protein AlkL boosts biocatalytic oxyfunctionalization of hydrophobic substrates in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 78(16):5724-5733
- Kametani T, Furuyama H (1987) Synthesis of vitamin D3 and related compounds. *Med Res Rev.* 7(2):147-171
- Karplus PA, Walsh KA, Herriott JR (1984) Amino acid sequence of spinach ferredoxin:NADP+ oxidoreductase. *Biochemistry.* 23(26):6576-6583

- Kaspera R, Krings U, Nanzad T, Berger RG (2005) Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67(4):477-483
- Katagiri M, Ganguli BN, Gunsalus IC (1968) A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation. *J Biol Chem.* 243(12):3543-3546
- Kelly SL, Kelly DE (2013) Microbial cytochromes P450: biodiversity and biotechnology. Where do cytochromes P450 come from, what do they do and what can they do for us? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 368(1612):20120476
- Khatri Y (2009) The cytochrome P450 complement of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56 and characterization of two members, CYP109D1 and CYP260A1. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Khatri Y, Hannemann F, Ewen KM, Pistorius D, Perlova O, Kagawa N, Brachmann AO, Müller R, Bernhardt R (2010) The CYPome of *Sorangium cellulosum* So ce56 and identification of CYP109D1 as a new fatty acid hydroxylase. *Chem Biol.* 17(12):1295–1305
- 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
- Klatte M, Bauer P (2009) Accurate Real-time Reverse Transcription Quantitative PCR. *Methods Mol Biol.* 479:61–77
- Kleser M (2011) Etablierung einer Biotransformation zur stereoselektiven Hydroxylierung der Sulfonylharnstoffe Glimepirid und Glibenclamid sowie von Vitamin D3 mit CYP105A1. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Kleser M, Hannemann F, Hutter M, Zapp J, Bernhardt R (2012) CYP105A1 mediated 3-hydroxylation of glimepiride and glibenclamide using a recombinant *Bacillus megaterium* whole-cell catalyst. *J Biotechnol.* 157(3):405-412
- Klingenberg M (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 75(2):376-386
- Knight E Jr, D'Eustachio AJ, Hardy RW (1966) Flavodoxin: a flavoprotein with ferredoxin activity from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim Biophys Acta.* 113(3):626–628
- Korneli C, David F, Biedendieck R, Jahn D, Wittmann C (2013) Getting the big beast to work--systems biotechnology of *Bacillus megaterium* for novel high-value proteins. *J Biotechnol.* 163(2):87-96
- Krüger P, Daneshfar R, Eckert GP, Klein J, Volmer DA, Bahr U, Müller WE, Karas M, Schubert-Zsilavec M, Abdel-Tawab M (2008) Metabolism of boswellic acids in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos.* 36(6):1135–1142
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680–685
- Lampe JN, Fernandez C, Nath A, Atkins WM (2008) Nile Red is a fluorescent allosteric substrate of cytochrome P450 3A4. *Biochemistry.* 47(2):509–516
- Lawson RJ, Wachenfeldt Cv, Haq I, Perkins J, Munro AW (2004) Expression and characterization of the two flavodoxin proteins of *Bacillus subtilis*, YkuN and YkuP: biophysical properties and interactions with cytochrome P450 BioI. *Biochemistry.* 43(39):12390–12409

- Lebeault JM, Lode ET, Coon MJ (1971) Fatty acid and hydrocarbon hydroxylation in yeast: role of cytochrome P-450 in *Candida tropicalis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 42(3):413-419
- Lill R, Diekert K, Kaut A, Lange H, Pelzer W, Prohl C, Kispal G (1999) The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem.* 380(10):1157-1166
- Lill R, Mühlenhoff U (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem.* 77:669-700
- Lindenmayer A, Smith L (1964) Cytochromes and Other Pigments of Baker's Yeast Grown Aerobically and Anaerobically. *Biochim Biophys Acta.* 93:445-461
- 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
- Locuson CW, Hutzler JM, Tracy TS (2007) Visible spectra of type II cytochrome P450-drug complexes: evidence that "incomplete" heme coordination is common. *Drug Metab Dispos.* 35(4):614-622
- Lou YR, Molnar F, Perakyla M, Qiao S, Kalueff AV, St-Arnaud R, Carlberg C, Tuohimaa P (2010) 25-Hydroxyvitamin D(3) is an agonistic vitamin D receptor ligand. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 118(3):162-170
- Lovenberg TW (2003) Iron-sulphur Proteins, Volume II, Molecular properties. Aus der Serie: Molecular Biology. New York and London, Academic Press.
- Ly TT, Khatri Y, Zapp J, Hutter MC, Bernhardt R (2012) CYP264B1 from *Sorangium cellulosum* So ce56: a fascinating norisoprenoid and sesquiterpene hydroxylase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 95(1):123-133
- Malca SH, Girhard M, Schuster S, Dürre P, Urlacher VB (2011) Expression, purification and characterization of two *Clostridium acetobutylicum* flavodoxins: potential electron transfer partners for CYP152A2. *Biochem Biophys Acta.* 1814(1):257-264
- 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
- Massey V (1995) Introduction: flavoprotein structure and mechanism. *FASEB J.* 9(7):473-475
- Maupin GO, Dolan MC, Karchesy JJ, Panella NA (2002) Compounds for pest control and methods for their use. Patent WO 0250053.
- Mazouni K, Domain F, Chauvat F, Cassier-Chauvat C (2003) Expression and regulation of the crucial plant-like ferredoxin of cyanobacteria. *Molecular microbiology.* 49(4):1019-1029

- McLean KJ, Scrutton NS, Munro AW (2003) Kinetic, spectroscopic and thermodynamic characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* adrenodoxin reductase homologue FprA. *Biochem J.* 372(Pt 2):317-327
- McLean KJ, Warman AJ, Seward HE, Marshall KR, Girvan HM, Cheesman MR, Waterman MR, Munro AW (2006) Biophysical characterization of the sterol demethylase P450 from *Mycobacterium tuberculosis*, its cognate ferredoxin, and their interactions. *Biochemistry.* 45(27):8427–8443
- Meinhardt F, Stahl U, Ebeling W (1989) Highly efficient expression of homologous and heterologous genes in *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 30(4):343–350
- Narhi LO, Fulco AJ (1986) Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem.* 261(16):7160-7169
- Nelson DR (2013) A world of cytochrome P450s. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 368(1612):20120430
- 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
- Nguyen KT, Virus C, Günnewich N, Hannemann F, Bernhardt R (2012) Changing the regioselectivity of a P450 from C15 to C11 hydroxylation of progesterone. *Chembiochem.* 13(8):1161–1166
- Noodleman L, Lovell T, Liu T, Himo F, Torres RA (2002) Insights into properties and energetics of iron-sulfur proteins from simple clusters to nitrogenase. *Curr Opin Chem Biol.* 6(2):259-273
- 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
- Omura T, Sato R (1962) A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem.* 237:1375-1376
- Omura T, Sato R (1964a) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem.* 239:2370–2378
- Omura T, Sato R (1964b) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties. *J Biol Chem.* 239:2379-2385
- Ortiz de Montellano PR (2010) Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. *Chem Rev.* 110(2):932-948
- Panella NA, Dolan MC, Karchesy JJ, Xiong Y, Peralta-Cruz J, Khasawneh M, Montenieri JA, Maupin GO (2005) Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska yellow cedar. *J Med Entomol.* 42(3):352-358
- Peng X, Hawthorne M, Vaishnav A, St-Arnaud R, Mehta RG (2009) 25-Hydroxyvitamin D3 is a natural chemopreventive agent against carcinogen induced precancerous lesions in mouse mammary gland organ culture. *Breast Cancer Res Treat.* 113(1):31-41
- 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
- Presnell SR, Cohen FE (1989) Topological distribution of four- α -helix bundles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86(17):6592-6596
- Puan K-J, Wang H, Dairi T, Kuzuyama T, Morita CT (2005) *fldA* is an essential gene required in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *FEBS letters.* 579(17):3802–3806
- Rabe KS, Gandubert VJ, Spengler M, Erkelenz M, Niemeyer CM (2008) Engineering and assaying of cytochrome P450 biocatalysts. *Anal Bioanal Chem.* 392(6):1059–1073
- Rea V, Kolkman AJ, Vottero E, Stronks EJ, Ampt KA, Honing M, Vermeulen NP, Wijmenga SS, Commandeur JN (2012) Active site substitution A82W improves the regioselectivity of steroid hydroxylation by cytochrome P450 BM3 mutants as rationalized by spin relaxation nuclear magnetic resonance studies. *Biochemistry.* 51(3):750-760
- Richhardt J, Larsen M, Meinhardt F (2010) An improved transconjugation protocol for *Bacillus megaterium* facilitating a direct genetic knockout. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86(6):1959–1965
- Ringle M (2013) Charakterisierung ausgewählter Cytochrome P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56. Neue potentielle Biokatalysatoren. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Ringle M, Khatri Y, Zapp J, Hannemann F, Bernhardt R (2012) Application of a new versatile electron transfer system for cytochrome P450-based *Escherichia coli* whole-cell bioconversions. *Appl Microbiol Biotechnol.*
- Roberts SC (2007) Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat Chem Biol.* 3(7):387-395
- 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
- Safayhi H, Rall B, Sailer ER, Ammon HP (1997) Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase. *J Pharmacol Exp Ther.* 281(1):460–463
- 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
- Sakaki T (2012) Practical application of cytochrome P450. *Biol Pharm Bull.* 35(6):844-849
- Sakaki T, Sugimoto H, Hayashi K, Yasuda K, Munetsuna E, Kamakura M, Ikushiro S, Shiro Y (2011) Bioconversion of vitamin D to its active form by bacterial or mammalian cytochrome P450. *Biochim Biophys Acta.* 1814(1):249-256
- Sakata K, Oda Y, Miyazawa M (2010) Suppression of SOS-inducing activity of chemical mutagens by metabolites from microbial transformation of (-)-isolongifolene. *J Agric Food Chem.* 58(4):2164-2167
- Sancho J (2006) Flavodoxins: sequence, folding, binding, function and beyond. *Cell Mol Life Sci.* 63(7-8):855–864

- Sawada N, Sakaki T, Yoneda S, Kusudo T, Shinkyo R, Ohta M, Inouye K (2004) Conversion of vitamin D3 to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 by *Streptomyces griseolus* cytochrome P450SU-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 320(1):156-164
- Schenkman JB, Jansson I (1998) Spectral analyses of cytochromes P450. *Methods Mol Biol.* 107:25-33
- Schiffler B, Bureik M, Reinle W, Müller EC, Hannemann F, Bernhardt R (2004) The adrenodoxin-like ferredoxin of *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria. *J Inorg Biochem.* 98(7):1229-1237
- Schmitz D, Zapp J, Bernhardt R (2012) Hydroxylation of the triterpenoid dipterocarpol with CYP106A2 from *Bacillus megaterium*. *The FEBS journal.* 279(9):1663–1674
- Schuster I (2011) Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochim Biophys Acta.* 1814(1):186-199
- Sevrioukova IF, Poulos TL (2002) Putidaredoxin reductase, a new function for an old protein. *J Biol Chem.* 277(28):25831-25839
- Sharov AA, Dudekula DB, Ko MS (2005) A web-based tool for principal component and significance analysis of microarray data. *Bioinformatics.* 21(10):2548–2549
- Shaw GC, Hsueh YH, Kao HS (2000) The basal-level expression of the cytochrome P450(BM-1) gene is negatively affected by the bm1P1 gene of *Bacillus megaterium*. *Curr Microbiol.* 40(1):47-50
- Sheng H, Sun H (2011) Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. *Nat Prod Rep.* 28(3):543
- Shiino M, Watanabe Y, Umezawa K (2001) Synthesis of N-substituted N-nitrosohydroxylamines as inhibitors of mushroom tyrosinase. *Bioorg Med Chem.* 9(5):1233-1240
- Shimada T, Kim D, Murayama N, Tanaka K, Takenaka S, Nagy LD, Folkman LM, Foroozesh MK, Komori M, Yamazaki H, Guengerich FP (2013) Binding of Diverse Environmental Chemicals with Human Cytochromes P450 2A13, 2A6, and 1B1 and Enzyme Inhibition. *Chem Res Toxicol.* (in press) doi:10.1021/tx300492j
- 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. *The FEBS journal.* 272(5):1148–1159
- Siemoneit U, Hofmann B, Kather N, Lamkemeyer T, Madlung J, Franke L, Schneider G, Jauch J, Poeckel D, Werz O (2008) Identification and functional analysis of cyclooxygenase-1 as a molecular target of boswellic acids. *Biochem Pharmacol.* 75(2):503–513
- Simgen B, Contzen J, Schwarzer R, Bernhardt R, Jung C (2000) Substrate binding to 15 β -hydroxylase (CYP106A2) probed by FT infrared spectroscopic studies of the iron ligand CO stretch vibration. *Biochem Biophys Res Commun.* 269(3):737-742
- Singh M, Sharma R, Banerjee UC (2002) Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol Adv.* 20(5-6):341-359
- Smillie RM (1965) Isolation of two proteins with chloroplast ferredoxin activity from a blue-green alga. *Biochem Biophys Res Commun.* 20(5):621–629
- Smith KE, Ahmed F, Antoniou T (1993) Microbial transformations of steroids. *Biochem Soc Trans.* 21(4):1077-1080

- Sparg SG, Light ME, van Staden J (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol.* 94(2-3):219-243
- Sticht H, Rösch P (1998) The structure of iron-sulfur proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 70(2):95–136
- Stok JE, De Voss J (2000) Expression, purification, and characterization of BioI: a carbon-carbon bond cleaving cytochrome P450 involved in biotin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch Biochem Biophys.* 384(2):351-360
- Sussman MD, Vary P.S., Hartman C., Setlow P. (1988) Integration and mapping of *Bacillus megaterium* genes which code for small, acid-soluble spore proteins and their protease. *J Bacteriol.* 170(10):4942–4945
- Syrovets T, Büchele B, Gedig E, Slupsky JR, Simmet T (2000) Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and II α . *Mol Pharmacol.* 58(1):71–81
- Syrovets T, Büchele B, Krauss C, Laumonier Y, Simmet T (2005) Acetyl-boswellic acids inhibit lipopolysaccharide-mediated TNF- α induction in monocytes by direct interaction with IkappaB kinases. *J Immunol.* 174(1):498–506
- Szcebara FM, Chandelier C, Villeret C, Masurel A, Bourot S, Duport C, Blanchard S, Groisillier A, Testet E, Costaglioli P, Cauet G, Degryse E, Balbuena D, Winter J, Achstetter T, Spagnoli R, Pompon D, Dumas B (2003) Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat Biotechnol.* 21(2):143-149
- Tateba H, Morita K, Tada M (1992) Photochemical reaction of nootkatone under various conditions. *J Chem Res Syn.* 5:140-141
- Tausch L, Henkel A, Siemoneit U, Poeckel D, Kather N, Franke L, Hofmann B, Schneider G, Angioni C, Geisslinger G, Skarke C, Holtmeier W, Beckhaus T, Karas M, Jauch J, Werz O (2009) Identification of human cathepsin G as a functional target of boswellic acids from the anti-inflammatory remedy frankincense. *J Immunol.* 183(5):3433-3442
- Tong WY, Dong X (2009) Microbial biotransformation: recent developments on steroid drugs. *Recent Pat Biotechnol.* 3(2):141-153
- 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
- Tyson CA, Lipscomb JD, Gunsalus IC (1972) The role of putidaredoxin and P450 cam in methylene hydroxylation. *J Biol Chem.* 247(18):5777-5784
- Uhlmann H, Bernhardt R (1995) The role of threonine 54 in adrenodoxin for the properties of its iron-sulfur cluster and its electron transfer function. *J Biol Chem.* 270(50):29959-29966
- Urlacher VB, Eiben S (2006) Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* 24(7):324–330
- Urlacher VB, Girhard M (2012) Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* 30(1):26–36
- van Beilen JB, Duetz WA, Schmid A, Witholt B (2003) Practical issues in the application of oxygenases. *Trends Biotechnol.* 21(4):170-177
- Vary P, 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

- Vary PS (1992) Development of Genetic Engineering in *Bacillus megaterium*. In *Biology of Bacilli: Application to Industry*. Doi, R. and McGloughlin, M. (eds). Boston: Butterworths-Heinemann:pp. 251-310
- 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
- Vottero E, Rea V, Lastdrager J, Honing M, Vermeulen NP, Commandeur JN (2011) Role of residue 87 in substrate selectivity and regioselectivity of drug-metabolizing cytochrome P450 CYP102A1 M11. *J Biol Inorg Chem*. 16(6):899-912
- Wächtershäuser G (2007) On the chemistry and evolution of the pioneer organism. *Chem Biodivers*. 4(4):584-602
- Watanabe I, Nara F, Serizawa N (1995) Cloning, characterization and expression of the gene encoding cytochrome P-450sca-2 from *Streptomyces carbophilus* involved in production of pravastatin, a specific HMG-CoA reductase inhibitor. *Gene*. 163(1):81-85
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol*. 1(6):REVIEWS 3003.1-3003.9
- Werz OS, Ulf; Henkel, Arne; Jauch, Johann; Kather, Nicole (2009) Use of boswellic acids and synthetic boswellic acid derivatives for inhibiting microsomal prostaglandin E2 synthase and cathepsin G. *Ger. Offen.* (2009) DE 102008015607 A1 20091015.
- White NJ (2008) Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science*. 320(5874):330-334
- Whitehouse CJC, Bell SG, Wong LL (2012) P450(BM3) (CYP102A1): connecting the dots. *Chem Soc Rev*. 41(3):1218–1260
- Withers ST, Keasling JD (2007) Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Appl Microbiol Biotechnol*. 73(5):980-990
- 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
- Zehentgruber D, Hannemann F, Bleif S, Bernhardt R, Lütz S (2010) Towards preparative scale steroid hydroxylation with cytochrome P450 monooxygenase CYP106A2. *Chembiochem*. 11(5):713–721
- Zheng M, Doan B, Schneider TD, Storz G (1999) OxyR and SoxRS regulation of fur. *J Bacteriol*. 181(15):4639–4643
- Zurbriggen MD, Tognetti VB, Carrillo N (2007) Stress-inducible flavodoxin from photosynthetic microorganisms. The mystery of flavodoxin loss from the plant genome. *IUBMB Life*. 59(4-5):355–360

6. Anhang

6.1. Oligonukleotide

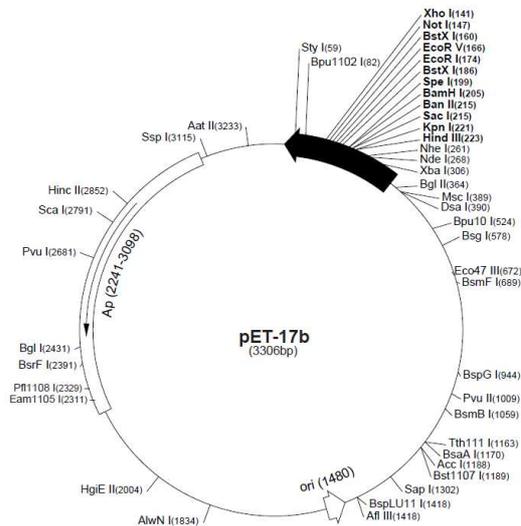
Tab. 6.1: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Primer mit Nukleotidsequenz und Verwendungszweck. Die Schnittstellen für die jeweiligen Restriktionsenzyme sind kursiv dargestellt, die für einen *His₆-tag* kodierenden Abschnitte sind unterstrichen.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Nukleotidsequenz (5'→3')
BM1-for- <i>NdeI</i>	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von CYP106A1 mit <i>NdeI</i> Schnittstelle	CATATGAACAAAGAAGTCATTCCCGTT ACAG
BM1-rev- <i>HindIII</i>	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von CYP106A1 mit <i>His₆-tag</i> und <i>HindIII</i> Schnittstelle	AAGCTTAATGGTGATGGTGATGGTGTC TGACACCGTCATGGGCAAGTAG
205-for- <i>NdeI</i>	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von CYP109E1 mit <i>NdeI</i> Schnittstelle	CATATGAAAACAGAAAGAGAAAACGG
205-rev- <i>KpnI</i>	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von CYP109E1 mit <i>His₆-tag</i> und <i>KpnI</i> Schnittstelle	GGTACCTTAATGGTGATGGTGATGGT GTACGTTTTTACGAATCAATAATT
1468-for- <i>NdeI</i>	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von CYP109A2 mit <i>NdeI</i> Schnittstelle	CATATGGAAAAAAATCTTTTATCTAT AGT
1468-rev- <i>KpnI</i>	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von CYP109A2 mit <i>His₆-tag</i> und <i>KpnI</i> Schnittstelle	GGTACCTTAATGGTGATGGTGATGGT GGCGTTATTTAAAGCAATTTTCAT
Fld-for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fld mit <i>NcoI</i> Schnittstelle	CCATGGAGGAAATCTTACTAGCTTAT GCG
Fld-rev	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von Fld mit <i>His₆-tag</i> und <i>BamHI</i> Schnittstelle	GGATCCTTAATGGTGATGGTGATGGT GTGAAGCAGCAGATTTTGCTAC
Fdx1-for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fdx1 mit <i>NdeI</i> Schnittstelle	CATATGCCAAGAGTAACCGTTTTAGG ATA
Fdx1-rev	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von Fdx1 mit <i>His₆-tag</i> und <i>KpnI</i> Schnittstelle	GGTACCTTAATGGTGATGGTGATGGT GCTCTGCGGGTCGAGGTCCTG
Fdx2-for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fdx2 mit <i>NdeI</i> Schnittstelle	CATATGATCATGGGGAAATATACG
Fdx2-rev	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von Fdx2 mit <i>His₆-tag</i> und <i>HindIII</i> Schnittstelle	AAGCTTAATGGTGATGGTGATGGTGTT GAAATTTATTCGAGTCTCC
Fdx3-for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fdx3 mit <i>NdeI</i> Schnittstelle	CATATGCCAAAATATACAATTGTTGTT G
Fdx3-rev	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von Fdx3 mit <i>His₆-tag</i> und <i>HindIII</i> Schnittstelle	AAGCTTAATGGTGATGGTGATGGTGTT CGAATTTATTAGCATCGCCGTC
Fdx4-for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fdx4 mit <i>NdeI</i> Schnittstelle	CATATGGCTTTTACGATGGTAGATAAG
Fdx4-rev	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von Fdx4 mit <i>His₆-tag</i> und <i>HindIII</i> Schnittstelle	AAGCTTAATGGTGATGGTGATGGTGTT CGAATTTTGTTCATCTCCAT
FdR1-for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von FdR1 mit <i>NdeI</i> Schnittstelle	CATATGCCAATATTTTTGACCGTATCA
FdR1-rev	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von FdR1 mit <i>His₆-tag</i> und <i>KpnI</i> Schnittstelle	GGTACCTTAATGGTGATGGTGATGGT GATCTTCAACCGGAACCAGCC
FdR2-for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von FdR2 mit <i>NcoI</i> Schnittstelle	CCATGGCAACAAAATTTTACACCTT A
FdR2-rev	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von FdR2 mit <i>His₆-tag</i> und <i>BamHI</i> Schnittstelle	GGATCCTTAATGGTGATGGTGATGGT GCCATCCGCGTTCGTACTIONAC
FdR3-for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von FdR3 mit <i>NcoI</i> Schnittstelle	CCATGGAGAAAAGACGGTCGTTTTG
FdR3-rev	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von FdR3 mit <i>His₆-tag</i> und <i>BamHI</i> Schnittstelle	GGATCCTTAATGGTGATGGTGATGGT GAGCTGTTTCCATTGTTCTTTG
BM1- <i>SpeI</i> -for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von CYP106A1 mit <i>SpeI</i> Schnittstelle und RBS	ACTAGTAAATCAAGGAGGTGAATATA CAATGAACAAAGAAGTCATTCCCGTT AC

BM1- <i>MluI</i> -rev	Rückwärtssprimer zur Amplifikation von CYP106A1 mit <i>MluI</i> Schnittstelle	ACGCGTTTATCTGTACACCGTCATGGG CAAG
205- <i>SpeI</i> -for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von CYP109E1 mit <i>SpeI</i> Schnittstelle und RBS	ACTAGTAAATCAAGGAGGTGAATATA CAATGAAAACAGAAAGAGAAAACGG
205- <i>KpnI</i> -rev	Rückwärtssprimer zur Amplifikation von CYP109E1 mit <i>KpnI</i> Schnittstelle	GGTACCTTATACGTTTTTACGAATCAA TAATT
1468- <i>SpeI</i> -for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von CYP109A2 mit <i>SpeI</i> Schnittstelle und RBS	ACTAGTAAATCAAGGAGGTGAATATA CAATGGAAAAAAAATCTTTTATCTAT AG
1468- <i>MluI</i> -rev	Rückwärtssprimer zur Amplifikation von CYP109A2 mit <i>MluI</i> Schnittstelle	ACGCGTTTAGGCGTTATTAAAAGCAA TTTCAT
Fld- <i>BsrGI</i> -for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fld mit <i>BsrGI</i> Schnittstelle und RBS	TGTACAAATCAAGGAGGTGAATATAC AATGAAGGAAATCTTACTAGCTTATG
Fld- <i>SphI</i> -rev	Rückwärtssprimer zur Amplifikation von Fld mit <i>SphI</i> Schnittstelle	GCATGCTTATGAAGCAGCAGATTTTG CTAC
Fdx2- <i>SacI</i> -for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fdx2 mit <i>SacI</i> Schnittstelle und RBS	GAGCTCAAATCAAGGAGGTGAATATA CAATGATCATGGGGAAATATACG
Fdx3- <i>SacI</i> -for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fdx3 mit <i>SacI</i> Schnittstelle und RBS	GAGCTCAAATCAAGGAGGTGAATATA CAATGCCAAAATATACAATTGTTG
Fdx4- <i>SacI</i> -for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fdx4 mit <i>SacI</i> Schnittstelle und RBS	GAGCTCAAATCAAGGAGGTGAATATA CAATGGCTTTTACGATGGTAGATAAG
Fdx-His- <i>NotI</i> -rev	Rückwärtssprimer zur Amplifikation von Fdx2, Fdx3 oder Fdx4 mit His ₆ -tag und <i>NotI</i> Schnittstelle	GCGGCCGCTTAATGGTGATGGTGATG GTG
rpoB-Stan-for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation des Standards für rpoB	GCTTGCTTTAGGACGAAACG
rpoB-Stan-rev	Rückwärtssprimer zur Amplifikation des Standards für rpoB	ACCTCCATCTCACAAAACG
rpoB-RT-for	RT-Vorwärtsprimer zur Amplifikation von rpoB	CTACCAGACGGTACGCCAAT
rpoB-RT-rev	RT-Rückwärtssprimer zur Amplifikation von rpoB	ACGAGACATGCCAGCTTCTT
BM1-RT-for	RT-Vorwärtsprimer zur Amplifikation von CYP106A1	CAACGTGCAGGAGCTGAATA
BM1-RT-rev	RT-Rückwärtssprimer zur Amplifikation von CYP106A1	ACATATTTGCAATGGCGTGA
205-RT-for	RT-Vorwärtsprimer zur Amplifikation von CYP109E1	AAACGGAATTGTCCGTCAG
205-RT-rev	RT-Rückwärtssprimer zur Amplifikation von CYP109E1	CACTTCTTTGACCCCGTCAT
1468-RT-for	RT-Vorwärtsprimer zur Amplifikation von CYP109A2	TTCAGCACTTGGAGGGTCAT
1468-RT-rev	RT-Rückwärtssprimer zur Amplifikation von CYP109A2	AAATCACGCCTTCATTACGC
Fld-RT-for	RT-Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fld	GCATGGATTGCATGTGAAAC
Fld-RT-rev	RT-Rückwärtssprimer zur Amplifikation von Fld	ACCGGGAACGGCTATATTTT
Fdx2-RT-for	RT-Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fdx2 (entspricht Fdx2-for)	CATATGATCATGGGGAAATATACG
Fdx2-RT-rev	RT-Rückwärtssprimer zur Amplifikation von Fdx2	CTCTTGGGGCACTTCAGCCGTG
Fdx3-RT-for	RT-Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fdx3 (entspricht Fdx3-for)	CATATGCCAAAATATACAATTGTTGTT G
Fdx3-RT-rev	RT-Rückwärtssprimer zur Amplifikation von Fdx3 (entspricht Fdx3-rev)	AAGCTTAATGGTGATGGTGATGGTGTT CGAATTTATTAGCATCGCCGTC
Fdx4-RT-for	RT-Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fdx4	AGGTCTTGCTTATGCCGTGT
Fdx4-RT-rev	RT-Rückwärtssprimer zur Amplifikation von Fdx4	ACGGCTGCTCTGCAACTTT

6.2. Verwendete Plasmide

6.2.1. Expressionsplasmide für *E. coli*



pET-3a-d Vectors

TR026 12/98

	Cat. No.
pET-3a DNA	69418-3
pET-3b DNA	69419-3
pET-3c DNA	69420-3
pET-3d DNA	69421-3

The pET-3a-d vectors carry an N-terminal T7-Tag[®] sequence and *Bam*HI cloning site. These vectors are the precursors to many pET family vectors; the pET-2/a-d(+/-) series corresponds to pET-3a-d but incorporates several additional features. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below.

pET-3a sequence landmarks

T7 promoter	615-631
T7 transcription start	614
T7-Tag coding sequence	519-551
T7 terminator	404-450
pBR322 origin	2814
<i>bla</i> coding sequence	3575-4432

The maps for pET-3b, pET-3c and pET-3d are the same as pET-3a (shown) with the following exceptions: pET-3b is a 4638bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 510. pET-3c is a 4638bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*HI at 510. pET-3d is a 4637bp plasmid; the *Bam*HI site is in the same reading frame as in pET-3c. An *Nco*I site is substituted for the *Nde*I site with a net 3bp deletion at position 550 of pET-3c. As a result, *Nco*I cuts pET-3d at 546. For the rest of the sites, subtract 3bp from each site beyond position 551 in pET-3a. *Nde*I does not cut pET-3d.

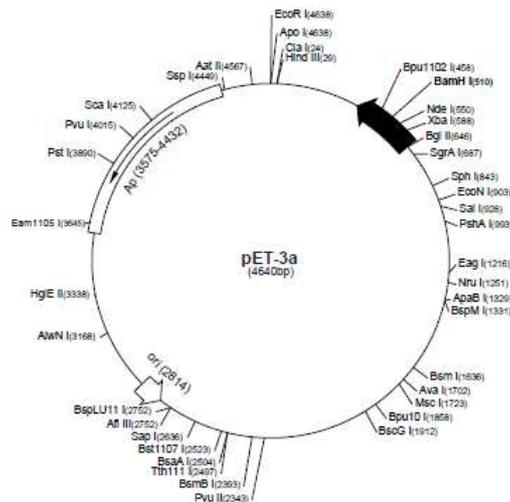


Abb. 6.1: Karten der Expressionsplasmide pET-17b und pET-3a-d.

6.2.2. Expressionsplasmide für *B. megaterium*

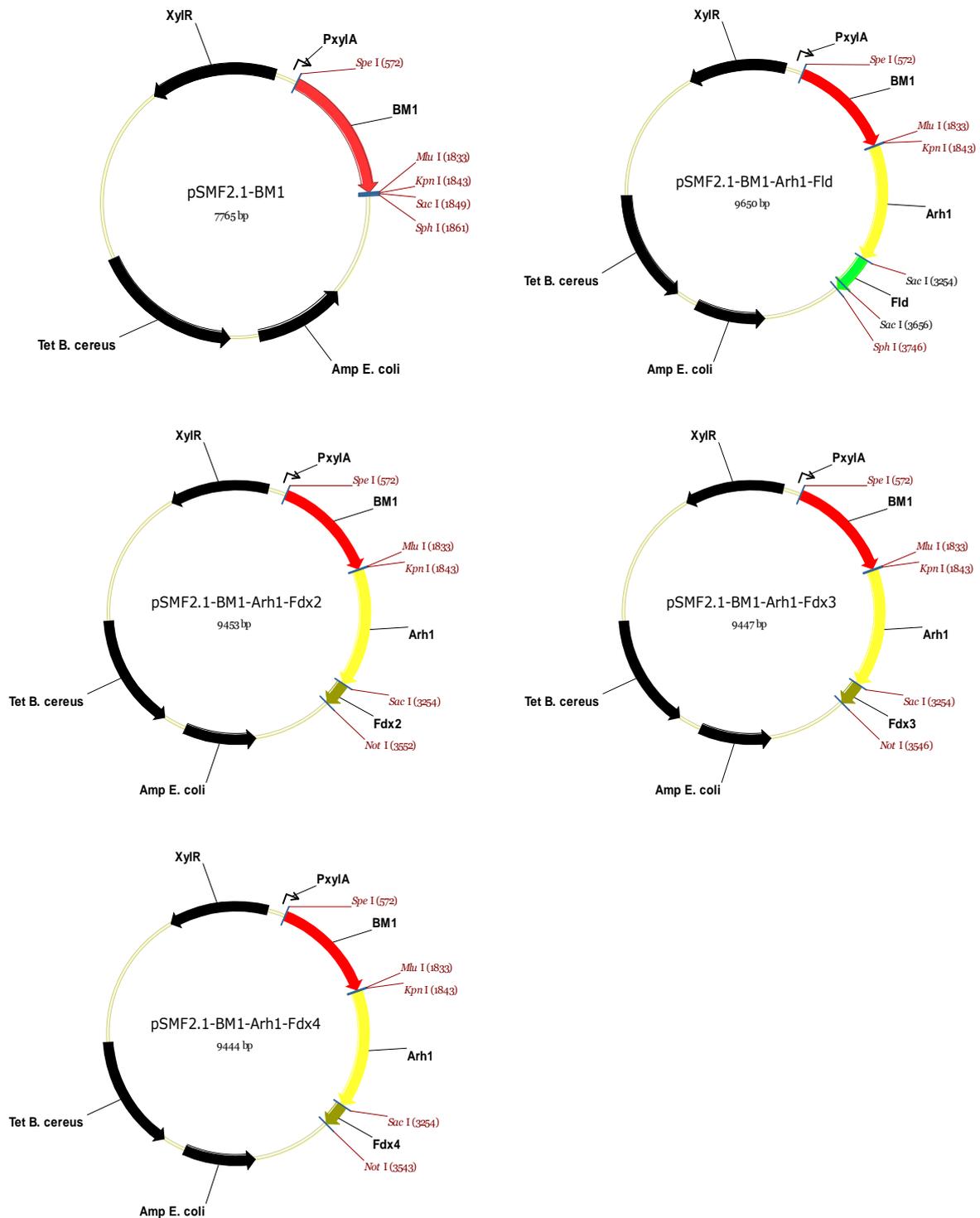


Abb. 6.2: Expressionsplasmide zur rekombinanten Proteinexpression in *B. megaterium*. Für jedes Cytochrom P450 wurden fünf verschiedene Plasmide konstruiert wie exemplarisch für CYP106A1 dargestellt. Für CYP109E1 und CYP109A2 wurden diese Plasmide in analoger Weise konstruiert, wobei CYP109E1 über *SpeI* und *KpnI* und CYP109A2 über *SpeI* und *MluI* kloniert wurden.

6.3. Aminosäuresequenzen

CYP106A1:

MNKEVIPVTEIPKFQSRAEEFFPIQWYKEMLNNSPVYFHEETNTWNVFQYEHVKQVLSDYEFF
SSDGQRTTIFVGDNSKKKSTSPITNLTNLDPPDHRKARSLAAAFTHRSLKNWEPRIKQIAADL
VEAIQKNPTINIVDDLSSPFPSLVIADLFGVPVKDRYQFKKWVDILFQPYDQERLEEIEQEKQR
AGAEYFQYLYPIVIEKRSNLSDDIISDLIAEFDGETFTDEEIVHATMLLLGAGVETTSHAIANM
FYSFLYDDKSLYSELRNNRELAPKAVEMLRYRFHISRRDRRTVKQDNELLGVKLLKKGDVVIA
WMSACNMDETMFENPFSVDIHRPTNKKHLTFGNPHFCLGAPLARLEMKIILEAFLEAFSHIE
PFEDFELEPHLTASATGQSLTYLPMTVYR

CYP109E1:

MKTERENGIVRQVNTIQTKEEFNPFSWYEEMRNTAPVQWDEERQVWDVVFHYDGVKEVLE
QKNIFSSDRRPPQNQRQTALGTSLINIDPPKHAEMRALVNKAFTPKAMKAWEPKIARITNELL
QEVHLEDIDIVEHLSYPLPVMVIADILGVPIEDQRQFKDWSDIIVAGPSNNERETLEKLQEK
MKANDELETYFYRIIEEKTRPGDDIISVLLQAKEEGKQLTDEEIVGFSILLIAGNETTTNLISN
TIYCLMEDKASFERLKREKELLPSGIEEVLRYRSPVQALHRIVKEDVTLGKLLKAGEHVVPW
MGAHRDAEYFEDPEVFKIDRKPNVHMAFGRGIHFCLGAPLARIEAKIMLAELIDRYPQMDW
SPSFELKPIESTFVYGLKELLIRKNV

CYP109A2:

MEKKSFIYSRLKTLPSFTFKRKKEDEMNPKAVKRENRYANLIPMQEIKSVEQQLYPFDIYNSL
RQEAPIRYDESRNCWDVFDYETVKYILKNPSLFSSKRAMEERQESILMMDPPKHTKLRNLVN
KAFTPRAIQHLEGHIEEIADYLLDEVSSKEKFDIVDFAGPLPIIVIAELLGVPIQDRALFKKYSD
DLVSGAENNSDEAFKMMQKRNEGVIPLQGYFKEIIAERQQNKQEDLISLLEAEIDGEHLTE
EEVLGFCILLVAGNETTTNLITNGVRYMTEDVDVQNEVRRDISLVPNLVEETLRYYPPIQAIG
RIAAEDVELGECKIKRGQQVISWAASANRDSAKFEWPDTFVVHRKTNPHVSFGFGIHFCLGAP
LARMEGKIAFTKLLKGGFSKVQNQSLKPIDSPFVFGVKKYEIAFNNA

Flavodoxin (Fld):

MKEILLAYASMSGNTEAIADLIEEELVKHGLHVKRAEVYDIDASDLVSAESIIFGAYTWGDGE
LPDDFLDLYDEMDDIDLSQKQMAVFGSGDSSYDVFCGAVDLIEEKIKRCNGNIAVPGLKIELS
PFGEDIEKCKVFAKGFAEVVAKSAAS

Fdx1:

MPRVTVLGYGSFEVAKGKLVLALEDNGINILHRCGGKAKCTTCRVEVLEGEYCDLTHAEK
NAYSESSIEDHLRLSCQIRVNEDITVRPILTVENSGREAGPRPAE

Fdx2:

MIMGKYTIVDKETCIACGACGAAAPDIYDYDDEGIAFVILDDNQGTAEVPQELEDDLIDAFEG
CPTESIRIADEKFDGDSNKFQ

Fdx3:

MPKYTIVDKDTCIACGACGAAAPDIYDYDDEGIAFVTLDDNQGVVEIPEDLEDDMMDAMEG
CPTDSIRVADEKFDGDANKFE

Fdx4:

MAFTMVDKETCIACGACGGSAPDLYDYDSEGLAYAVLDNNEGTKEVPEHQQDEMMEAYEG
CPTDSIKVAEQPFYGDATKFE

FdR1:

MPIFLTVSFLEGNKMTNKKYEPLLQPFTFSNGIKLDNRVILAPMTNFSSNEDGTVSNAEVDYY
VRRSNGVSMVITACTYGTNGKGFHGEFAADSDEMIPSLRRLATAIKDQGAKAVLQIFHGGR
MCPPELVPNGEVVSASAVAAEQEGAPVPRELTNEEIEGIIHDFGEMTRRAIEAGFDGVEIHGAN
NYLIQQFFSPHSNRREDKWGGSVEKRLTFPLAIVDEVKQAVSKHAKPFLVGYRFSPEEPETP
GITMADTLKLVDALAEKDLDYLVSLMEFWSKPRRGVEDTRSRIEIIQERVGSRVPMGVGSI
HTADEAAALETGIPLLAIGRELIMDPDWVQKVKEGRENEIVTTLSKKDQEKLVIPDPLWQAV
INTPGWFPVED

FdR2:

MTTKLFSPTYVKDVTLKNRIVMSPMCMYSCEKEDGVITDFHVMVHYTTRAVGQVGLIMVEAS
AVVPQGRISAQDLGIWNDEQRDGLTKLVTQLKENGAKTAIQLAHAGRKATVEGDIYAPSAIA
FDDKSKKPVEMTTEQIHETISAFKESARRSKEAGFDIIELHAAHGVLVHQFLSPLSNKRSDEYG
GSAENRYRFLKEIIEAVKTEWDGPLFVRVSASDYTEGGLTVDDHVAFKWMKEQGVLDLIDV
SSGALVHAPINVYPGYQVPFADKIKQQANIDTGAVGLITTGRQAEIILQSERADLIFVARELLR
DPYFPRTAAKELNETISAPVQYERGW

FdR3:

MKKRRSFCTIKLVIIYFTKVEVENNVYKKYVSANLSFINRYPWEVDAMRSQESLQSIIQNFNE
VEKGLSNREAVEESNRCLYCYDAPCIQACPTGIDIPTFIKKIASGNLKGSAETIMSSNPVGASCA
RVCPTDELCEGACVLNHSTKPIGDLQRYATDWAIQNEQVLFKKGKANGKKVAIVGGGPA
GLSAAARELARFGYDVTIFEAEKQAGGLNTYGIVSFRLPQAISFWEVEQVKNLDVKIKTNVRIG
EDILPSELLQSYDAVVLAIGMSKVPSLHVEGEELDGVYDAIDFVKKTKSEALSTEFVGGKRVAV
IGAGNTAIDGATCSVRLGAENVQILYRRTREEMTAYDFEFEFKQDGVFRWLTAPIRIIGDEN
GKVSIECVKMTLTDPDADGRRKPPVVEGSTFTIPVDAVVKAIGQERYLSLIQQFQLHHEDGV
VLINQETFQTSNPKVFACGDVIFGKGQGEAMVVTAQQGKQTALNIHMQLTKETMETA

6.4. NMR-Daten

Tab. 6.2: Strukturdaten zu 7 β -Hydroxy-KBA und 7 β ,15 α -Dihydroxy-KBA in CD₃OD

7 β -Hydroxy-KBA			7 β ,15 α -Dihydroxy-KBA	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	34.63	2.33 <i>ddd</i> (13.0, 4.0, 4.0) 1.27 <i>m</i>	34.62	2.37 <i>ddd</i> (13.0, 4.0, 4.0) 1.31 <i>m</i>
2	26.81	2.18 <i>m</i> 1.50 <i>m</i>	28.06	2.23 <i>dddd</i> (14.5, 14.5, 4.0, 3.0) 1.50 <i>m</i>
3	71.17	3.96 <i>dd</i> (3.0, 3.0)	71.12	3.97 <i>dd</i> (3.0, 3.0)
4	47.94	-----	48.03	-----
5	46.40	1.51 <i>m</i>	46.26	1.54 <i>m</i>
6	30.83	2.00 <i>m</i> 1.84 <i>m</i>	29.45	2.04 <i>dd</i> (13.5, 11.5) 1.94 <i>ddd</i> (13.5, 5.0, 2.0)
7	73.61	4.01 <i>dd</i> (11.0, 4.5)	72.60	4.01 <i>dd</i> (11.5, 5.0)
8	51.51	-----	51.98	-----
9	61.94	2.46 <i>s</i>	62.14	2.44 <i>s</i>
10	38.54	-----	38.83	-----
11	201.58	-----	200.58	-----
12	131.03	5.53 <i>s</i>	131.95	5.60 <i>s</i>
13	168.30	-----	166.84	-----
14	46.66	-----	52.47	-----
15	31.85	2.14 <i>m</i> 1.64 <i>brd</i> (9.5)	67.71	4.27 <i>dd</i> (12.0, 5.0)
16	28.77	2.13 <i>m</i> 0.99 <i>m</i>	37.38	2.12 <i>m</i> 1.30 <i>m</i>
17	35.02	-----	35.08	-----
18	61.44	1.57 <i>dd</i> (11.5, 1.5)	61.49	1.60 <i>dd</i> (11.5, 1.5)
19	40.69	1.49 <i>m</i>	40.43	0.97 <i>m</i>
20	40.48	0.94 <i>m</i>	40.53	1.48 <i>m</i>
21	31.82	1.43 <i>m</i> 1.32 <i>m</i>	31.82	1.48 <i>m</i> 1.34 <i>m</i>
22	41.77	1.48 <i>m</i> 1.32 <i>m</i>	41.53	1.54 <i>m</i> 1.36 <i>m</i>
23	24.84	1.26 <i>s</i> (3H)	24.88	1.28 <i>s</i> (3H)
24	180.87	-----	180.57	-----
25	13.83	1.11 <i>s</i> (3H)	13.87	1.14 <i>s</i> (3H)
26	12.26	1.14 <i>s</i> (3H)	12.60	1.18 <i>s</i> (3H)
27	20.60	1.42 <i>s</i> (3H)	14.89	1.37 <i>s</i> (3H)
28	29.32	0.82 <i>s</i> (3H)	30.01	0.87 <i>s</i> (3H)
29	17.75	0.78 <i>d</i> (6.5; 3H)	17.77	0.85 <i>d</i> (6.5; 3H)
30	21.34	0.93 <i>s</i> (3H)	21.35	0.97 <i>m</i> (3H)

Tab. 6.3: Strukturdaten zu (4R)-4-Hydroxy-Isolongifolen-9-on in CDCl₃

	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	181.71	-----
2	42.10	-----
3	54.42	1.95 <i>brs</i>
4	70.30	4.31 <i>brd</i> (6.6)
5	40.16	1.80 <i>ddd</i> (13.0, 6.6, 2.6) 1.73 <i>ddd</i> (13.0, 2.1, 1.0)
6	57.96	-----
7	34.10	-----
8	49.81	2.31 <i>d</i> (16.2) 2.06 <i>dd</i> (16.2, 0.8)
9	199.81	-----
10	117.58	5.70 <i>s</i>
11	32.82	1.59 <i>m</i>
12	24.25	1.11 <i>s</i> (3H)
13	27.20	1.09 <i>s</i> (3H)
14	25.28	0.97 <i>v</i>
15	25.90	1.06 <i>s</i> (3H)

Tab. 6.4: Strukturdaten zu (4R,5S,7R,11S)-11,12-Epoxy-Nootkaton und (4R,5S,7R,11R)-11,12-Epoxy-Nootkaton in CDCl₃

(4R,5S,7R,11S)-11,12-Epoxy-Nootkaton			(4R,5S,7R,11R)-11,12-Epoxy-Nootkaton	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	124.87	5.73 <i>brs</i>	124.87	5.73 <i>brs</i>
2	199.50	-----	199.40	-----
3	42.01	2.23 <i>m</i> (2H)	42.01	2.23 <i>m</i> (2H)
4	39.60	1.60 <i>m</i>	39.42	1.58 <i>m</i>
5	39.01	-----	38.97	-----
6	40.43	2.02 <i>m</i> 1.10 <i>m</i>	40.74	1.90 <i>m</i> 1.00 <i>m</i>
7	40.50	1.99 <i>m</i>	40.44	1.99 <i>m</i>
8	28.79	1.88 <i>m</i> 1.22 <i>m</i>	28.37	1.97 <i>m</i> 1.29 <i>m</i>
9	32.43	2.42 <i>m</i> 2.35 <i>m</i>	32.38	2.42 <i>m</i> 2.35 <i>m</i>
10	168.80	-----	168.87	-----
11	58.91	-----	59.13	-----
12	53.33	2.56 <i>m</i> 2.62 <i>m</i>	53.65	2.57 <i>m</i> 2.63 <i>m</i>
13	17.73	1.22 <i>s</i> (3H)	18.04	1.24 <i>s</i> (3H)
14	14.89	0.96 <i>d</i> (6.7; 3H)	14.89	0.94 <i>d</i> (6.7; 3H)
15	16.74	1.04 <i>s</i> (3H)	16.74	1.04 <i>s</i> (3H)

Tab. 6.5: Strukturdaten zu 16 β -Hydroxy-Testosteron und Androstendion in CDCl₃

16 β -Hydroxy-Testosteron			Androstendion	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	35.63	2.00 <i>ddd</i> (13.5, 5.0, 3.5) 1.66 <i>ddd</i> (14.0, 13.5, 5.0)	35.69	2.02 <i>ddd</i> (13.5, 5.0, 3.2) 1.70 <i>m</i>
2	33.88	2.38 <i>m</i> 2.31 <i>m</i>	33.89	2.40 <i>m</i> 2.35 <i>m</i>
3	199.68	-----	199.29	-----
4	123.84	5.70 <i>s</i>	124.15	5.73 <i>brs</i>
5	171.20	-----	170.27	-----
6	32.69	2.37 <i>m</i> 2.25 <i>m</i>	32.55	2.42 <i>m</i> 2.31 <i>m</i>
7	31.66	1.84 <i>m</i> 0.98 <i>m</i>	30.74	1.96 <i>m</i> 1.11 <i>m</i>
8	34.99	1.62 <i>m</i>	35.15	1.72 <i>m</i>
9	54.01	0.92 <i>m</i>	53.82	0.97 <i>ddd</i> (12.5, 10.5, 4.0)
10	38.66	-----	38.63	-----
11	20.32	1.57 <i>m</i> 1.43 <i>m</i>	20.31	1.68 <i>m</i> 1.44 <i>m</i>
12	37.01	1.87 <i>m</i> 1.08 <i>ddd</i> (13.0, 13.0, 4.5)	35.73	2.45 <i>ddd</i> (19.5, 9.0, 1.0) 2.09 <i>ddd</i> (19.5, 9.0, 9.0)
13	42.33	-----	47.49	-----
14	46.96	0.78 <i>ddd</i> (13.5, 11.0, 6.7)	50.84	1.28 <i>m</i>
15	34.91	2.20 <i>m</i> 1.28 <i>ddd</i> (13.5, 13.5, 5.0)	21.74	1.96 <i>m</i> 1.56 <i>m</i>
16	69.83	4.14 <i>ddd</i> (7.7, 7.7, 5.0)	31.27	1.85 <i>ddd</i> (13.0, 4.0, 2.5) 1.27 <i>m</i>
17	80.55	3.35 <i>d</i> (7.7)	220.30	-----
18	11.83	0.83 <i>s</i> (3H)	13.69	0.90 <i>s</i> (3H)
19	17.37	1.17 <i>s</i> (3H)	17.37	1.20 <i>s</i> (3H)

Tab. 6.6: Strukturdaten zu 25-Hydroxy-Vitamin D3 in CDCl₃

	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	31.92	2.36 <i>m</i> 2.18 <i>m</i>
2	36.40	1.96 <i>m</i> 1.22 <i>m</i>
3	69.21	3.92 <i>m</i>
4	45.92	2.56 <i>dd</i> (13.0, 4.0) 2.27 <i>dd</i> (13.0, 7.5)
5	135.00	-----
6	122.45	6.21 <i>d</i> (11.5)
7	117.51	6.01 <i>d</i> (11.5)
8	142.89	-----
9	29.07	2.82 <i>m</i> 1.51 <i>m</i>
10	145.09	-----
11	22.24	1.48 (2H)
12	40.53	1.98 <i>m</i> 1.29 <i>m</i>
13	45.85	-----
14	56.33	1.95 <i>m</i> 1.20 <i>m</i>
15	20.82	1.41 <i>m</i> 1.22 <i>m</i>
16	27.67	1.86 <i>m</i> 1.22 <i>m</i>
17	56.53	1.28 <i>m</i>
18	11.99	0.52 <i>s</i>
19	112.40	5.03 <i>d</i> (2.0) 4.80 <i>d</i> (2.0)
20	35.16	1.51 <i>m</i>
21	18.81	0.92 <i>d</i> (6.5;3H)
22	36.10	1.38 <i>m</i> 1.05 <i>m</i>
23	23.56	1.65 <i>m</i>
24	44.39	1.45 <i>m</i> 1.36 <i>m</i>
25	71.15	-----
26	29.20	1.20 <i>s</i> (3H)
27	29.34	1.20 <i>s</i> (3H)

6.5. Veröffentlichungen und Patente

Brill E., Hannemann F., Zapp J., Brüning G., Jauch J., Bernhardt R.

Identification of a new cytochrome P450 system from *Bacillus megaterium* DSM319 for the hydroxylation of 11-keto- β -boswellic acid (KBA), Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013, (in press) doi:10.1007/s00253-013-5029-0

Brill E., Hannemann F., Zapp J., Bernhardt R.

Ein neuer Biokatalysator zur Produktion von 16 β -Hydroxy-Testosteron mittels rekombinanter *B. megaterium* Stämme, Patent (2013) DE 102013107886.9

Brill E., Hannemann F., Gerber A., Zapp J., Bernhardt R.

Ein neuer Biokatalysator zur Produktion von 25-Hydroxy-Vitamin D3 und anderen Vitamin D3 Derivaten mittels rekombinanter *B. megaterium* Stämme, Patent (2013) DE 102013107885.0

Brill E., Hannemann F., Zapp J., Bernhardt R.

A new biocatalyst for the production of 16 β -hydroxy-testosterone using recombinant *B. megaterium* strains, in preparation

Brill E., Hannemann F., Gerber A., Zapp J., Bernhardt R.

A new biocatalyst for the production of 25-hydroxy-vitamin D3 and other vitamin D3 derivatives using recombinant *B. megaterium* strains, in preparation

Posterpräsentation auf einer internationalen Konferenz:

Brill E., Hannemann F., Bernhardt R.

A new cytochrome P450 system from *Bacillus megaterium* MS941

11th International Symposium on Cytochrome P450, Biodiversity and Biotechnology, Turin (Italien), 22.06. - 26.06.2012

Danksagung

Frau Prof. Dr. Rita Bernhardt danke ich für die Überlassung der interessanten Fragestellung, ihr Interesse am Fortschritt dieser Arbeit, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihre konstruktiven und kritischen Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. Gert-Wieland Kohring danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. Frank Hannemann für die engagierte Betreuung, seine konstruktiven und wertvollen Anregungen, seine stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für das Korrekturlesen von Postern, Veröffentlichungen und der vorliegenden Dissertation.

Ich danke Frau Gerit Brüning und Herrn Prof. Dr. Johann Jauch (Institut für Organische Chemie, Universität des Saarlandes) für die Bereitstellung der 11-Keto- β -Boswelliasäure. Herrn Dr. Josef Zapp (Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität des Saarlandes) danke ich für die Messung und Auswertung der NMR-Spektren. Frau Prof. Dr. Petra Bauer möchte ich für ihre Einführung in die qRT-PCR sowie die Möglichkeit, die qRT-PCR Messungen in ihrem Labor durchzuführen, danken. Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn (Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig) danke ich für die Bereitstellung des *B. megaterium* Stammes MS941. Dr. Rebekka Biedendieck (Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig) sei gedankt für die hilfreichen Hinweise im Umgang mit *B. megaterium*, insbesondere bezüglich der Transformation und der qRT-PCR.

Ein großer Dank geht an Herrn Dr. Michael Ringle für sein Engagement vor allem zu Beginn dieser Arbeit, seine Hilfe bei den HPLC-Messungen und bei chemischen Fragestellungen, seine konstruktiven und motivierenden Anregungen sowie für seine Kritik, seine Offenheit und die informativen und lustigen Gespräche.

Ich danke Alexander Schifrin für seine Hilfsbereitschaft bei chemischen und computertechnischen Problemen. Adrian Gerber danke ich für seine Hilfe bei der HPLC und im Umgang mit Vitamin D3.

Ich bedanke mich bei Frau Gabi Schon für ihre Unterstützung bei diversen Formalitäten und Verwaltungsaufgaben. Frau Katharina Bompais und Herrn Wolfgang Reinle danke ich für die Bereitstellung diverser gereinigter Proteine und ihre Hilfe und Tipps bei technischen Problemen und der Laborarbeit.

Simone, Benni, Lina, Daniela, Antje, Tanja, Simon und Anna danke ich für die lustige und tolle Zeit im Labor und die vielfältigen Aktivitäten außerhalb der Arbeit, die immer eine willkommene Abwechslung waren. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht, mit euch zusammenzuarbeiten!

Ich bedanke mich bei Dr. Kerstin Maria Ewen, Dr. Yogan Khatri, Dr. Sabrina Bleif und Dr. Ming Kwai Giese für ihre konstruktiven Anregungen vor allem zu Beginn dieser Arbeit.

Meinen F-Arbeiterinnen Afua Serwah und Franziska Müller danke ich für ihre Mithilfe beim Screening der Naturstoffbibliothek und bei den kinetischen Analysen.

Allen Mitarbeitern des AK Bernhardt sei gedankt für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Kollegialität, die große Hilfsbereitschaft und die lustige Zeit im Labor.

Ein großer Dank geht an meinen Freund Christian Lensch für seine Unterstützung, seine Geduld, seine Ermutigungen und seine Aufmunterungen. Ich danke ihm, dass er trotz eigenem Stress immer für mich da war.

Meiner ganzen Familie, besonders meinen Eltern Edeltrud und Dr. Wolfgang Brill, danke ich, dass sie mich in jeder nur erdenklichen Weise unterstützt, an mich geglaubt und mich darin bestärkt haben, meinen Weg zu gehen und meine Ziele zu verfolgen. Zudem danke ich meinem Vater für das Korrekturlesen der vorliegenden Dissertation.