

**Umsatz von Harzsäuren durch die bakteriellen  
Cytochrome CYP105A1 und CYP106A2 –  
Strukturelle Grundlagen und potentielle  
Anwendungen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Simon Janocha

Saarbrücken  
2013

Tag des Kolloquiums:	20.12.2013
Dekan:	Prof. Dr. Volkhard Helms
Berichterstatter:	Prof. Dr. Rita Bernhardt Prof. Dr. Roy Lancaster Prof. Dr. Vlada Urlacher
Vorsitz:	Prof. Dr. Uli Müller
Akad. Mitarbeiter:	Dr. Konstantin Schneider

*“Nothing in the world can take the place of persistence.  
Talent will not; nothing is more common than unsuccessful men with talent.  
Genius will not; unrewarded genius is almost a proverb.  
Education will not; the world is full of educated derelicts.  
Persistence and determination alone are omnipotent.”*

*Calvin Coolidge  
(1872-1933)*



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Cytochrome P450 .....	1
1.1.1	Geschichte und Nomenklatur.....	1
1.1.2	Funktion.....	2
1.1.3	Reaktionszyklus .....	4
1.1.4	Elektronentransferpartner .....	6
1.1.5	Strukturaufklärung von Cytochromen P450.....	7
1.1.6	Die dreidimensionale Struktur der Cytochrome P450 .....	9
1.1.7	CYP105A1 aus <i>Streptomyces griseolus</i> ATCC 11796 .....	11
1.1.8	CYP106A2 aus <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 13368.....	13
1.1.9	Cytochrome P450 in der Biotechnologie.....	14
1.2	Terpenoide und Harzsäuren .....	18
1.3	Proteinkristallisation.....	21
1.3.1	Einführung .....	21
1.3.2	Symmetrie von Kristallen .....	22
1.3.3	Diffraktion.....	23
1.3.4	Miller'sche Indizes und reziprokes Gitter.....	23
1.3.5	Fourier-Transformation.....	24
1.3.6	Lösung des Phasenproblems .....	25
1.3.7	Verfeinerung eines Strukturmodells .....	26
1.3.8	Elektronendichtekarten.....	26
1.3.9	B-Faktor .....	27
1.3.10	Ramachandran-Plot.....	27
1.4	Aufgabenstellung.....	28
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.1	Material .....	29
2.1.1	Chemikalien .....	29
2.1.2	Enzyme und Proteine .....	29
2.1.3	Antikörper .....	29
2.1.4	Oligonukleotide .....	29
2.1.5	Vektoren.....	30
2.1.6	Bakterienstämme .....	31

---

2.2	Methoden .....	32
2.2.1	Mikrobiologische und gentechnische Methoden .....	32
2.2.1.1	Kultivierung und Stammhaltung von Zellen.....	32
2.2.1.2	Bestimmung der optischen Dichte.....	32
2.2.1.3	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen und deren Transformation .	32
2.2.1.4	Plasmidpräparation und Konzentrationsbestimmung der DNA .....	32
2.2.1.5	PCR zur Amplifikation der Gene .....	33
2.2.1.6	Ortsgerichtete Mutagenese .....	33
2.2.1.7	SOE-basierte PCR zur Herstellung von pBar_Triple_pombe .....	34
2.2.1.8	Agarosegelelektrophorese und Reisolation der DNA-Fragmente ....	34
2.2.1.9	Restriktionsverdau und Ligation .....	34
2.2.1.10	DNA Sequenzierung .....	35
2.2.2	Proteinexpression und -reinigung .....	35
2.2.2.1	Proteinexpression .....	35
2.2.2.2	Zellaufschluss .....	36
2.2.2.3	Proteinreinigung .....	36
2.2.3	Biochemische und biophysikalische Methoden .....	39
2.2.3.1	UV/vis-Spektroskopie.....	39
2.2.3.2	COD-Spektren.....	39
2.2.3.3	Substratinduzierte Differenzspektroskopie .....	39
2.2.3.4	Bestimmung der Dissoziationskonstanten $K_d$ .....	40
2.2.3.5	Cytochrom P450 abhängiger <i>in vitro</i> Substratumsatz .....	40
2.2.3.6	Bestimmung der Enzymaktivität .....	41
2.2.3.7	Ganzzellumsatz .....	41
2.2.3.8	SDS-Gelelektrophorese .....	42
2.2.3.9	Western Blot .....	42
2.2.3.10	Semipräparative HPLC zur Produktreinigung.....	43
2.2.3.11	HPLC/DC Analytik .....	43
2.2.3.12	Massenspektrometrie mittels MALDI-TOF/TOF .....	44
2.2.3.13	NMR-Spektroskopie .....	44
2.2.3.14	Docking-Studien .....	44
2.2.4	Kristallisation .....	44
2.2.4.1	Ansetzen der Proteinlösungen für die Kristallisation .....	44
2.2.4.2	Screening nach Kristallisationsbedingungen .....	45
2.2.4.3	Überprüfung der Kristallisationsbedingungen.....	45
2.2.4.4	Optimierung der Kristallisationsbedingungen .....	46
2.2.4.5	<i>Seeding</i> von Kristallen .....	46
2.2.4.6	Additiv-Screen.....	47
2.2.4.7	Montieren von Kristallen/Kryobedingungen .....	47
2.2.4.8	Aufnahme von Datensätzen.....	47
2.2.4.9	Datenprozessierung .....	48
2.2.4.10	Lösung des Phasenproblems.....	48
2.2.4.11	Verbesserung der Strukturmodelle .....	48
2.2.4.12	Hinzufügen von Liganden und Lösemittelmolekülen .....	49
2.2.4.13	Qualität und Darstellung der Strukturmodelle .....	49

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
3.1	<i>In vitro</i> Charakterisierung der Harzsäuren mit CYP106A2 .....	50
3.1.1	Typ-I-Differenzspektroskopie .....	51
3.1.2	<i>In vitro</i> Substratumsätze .....	54
3.2	Kristallisation von CYP106A2 .....	57
3.3	Strukturlösung des CYP106A2 .....	62
3.4	<i>In vitro</i> Charakterisierung der Harzsäuren mit CYP105A1 .....	69
3.4.1	<i>In vitro</i> Substratumsätze .....	69
3.4.2	Typ-I-Differenzspektroskopie .....	71
3.4.3	Katalytische Aktivität des CYP105A1 .....	72
3.5	Docking-Studien mit CYP105A1 .....	75
3.6	Ganzzellumsatz in <i>Bacillus megaterium</i> MS941 .....	77
3.7	Etablierung eines Ganzzellsystems für den Umsatz von Harzsäuren in <i>E. coli</i> .....	79
3.7.1	Klonierung .....	80
3.7.2	Ko-Expression der Proteine in <i>E. coli</i> JM109 .....	81
3.8	Optimierung des Ganzzellsystems .....	84
3.8.1	Permeabilisierung der Zellen .....	84
3.8.2	Vergleich des Umsatzes in wachsenden und ruhenden Zellen .....	86
3.8.3	Optimierung der Expressionsbedingungen .....	88
3.8.4	Optimierung der Reaktionsbedingungen und NADPH-Versorgung .....	92
3.8.5	Ganzzellumsatz unter optimierten Bedingungen .....	97
3.9	Kristallisation von CYP105A1 .....	100
3.10	Strukturlösung des CYP105A1 .....	103
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>107</b>
4.1	<i>In vitro</i> Charakterisierung des CYP106A2 .....	107
4.2	Kristallstruktur des CYP106A2 .....	110
4.2.1	Vergleich mit homologen Strukturen .....	110
4.2.2	Flexible Regionen des CYP106A2 und ihre Bedeutung .....	116
4.2.3	Konservierte Struktur motive und struktureller Kern .....	117
4.2.4	Substraterkennungsstellen .....	121
4.2.5	Substratgebundene Form des CYP106A2 .....	122
4.2.6	Hinweis auf das natürliche Substrat .....	127
4.2.7	Nicht-kristallographische Symmetrie der CYP106A2 Kristalle .....	129
4.2.8	Redoxpartner-Interaktion .....	130

4.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen des CYP105A1 .....	133
4.4	Konstruktion und Charakterisierung eines CYP105A1 basierten Ganzzellsystems in <i>E. coli</i> .....	135
4.5	Kristallstruktur des CYP105A1 mit gebundener Abietinsäure .....	139
4.5.1	Aktives Zentrum von CYP105A1 .....	139
4.5.2	Redoxpartner-Interaktion .....	141
4.6	Ausblick .....	145
<b>5</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>148</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>166</b>
6.1	NMR-Daten .....	166
6.2	Aminosäuresequenzen .....	168
6.3	DC-Chromatogramme der Substratumsätze .....	169
6.4	Alignment des CYP106A2 zur Identifikation der SRS .....	171
6.5	Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE .....	172
Publikationen	.....	173
Danksagung	.....	175

## Abkürzungen und Einheiten

15-HPA	15-Hydroperoxyabietinsäure
Å	Ångström
aa	<i>amino acids</i> , Aminosäuren
AdR	Adrenodoxin Reduktase
Adx	Adrenodoxin
Arh1	Adrenodoxin Reduktase Homolog 1
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaare
CoA	Coenzym A
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CYP	Cytochrom P450
$\delta$	Chemische Verschiebung
$\delta$ -Ala	$\delta$ -Aminolävulinsäure
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
DOC	11-Desoxycorticosteron
DTE	Dithioerythritol
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
Etp1 <sup>fd</sup>	<i>Electron Transfer Protein 1, Ferredoxin Domain</i>
Etp1 <sup>skf</sup>	<i>Electron Transfer Protein 1, sehr kurze Form</i> (entspricht Etp1 <sup>fd</sup> (516-618))
Fld	Flavodoxin aus <i>Escherichia coli</i>
Fpr	Ferredoxin-/Flavodoxinreduktase aus <i>Escherichia coli</i>
g	Gramm
G6P	Glucose-6-Phosphat
h	Stunde
HAP	Hydroxylapatit
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-]-ethansulfonsäure
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
IEX	<i>Ion Exchange Chromatography</i> , Ionenaustauschchromatographie
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
Kb	Kilobasen
KBA	Keto-Boswelliasäure
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten Konstante
LbADH	Alkohol Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>
M	Molar
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i> , Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionization
MEP	Methylerythritolphosphat
min	Minute
MR	<i>Molecular Replacement</i> , Molekularer Ersatz

MS	Massenspektrometrie
MW	<i>Molecular Weight</i> , Molekulargewicht
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
Ni-NTA	<i>Nickel-Nitrilotriacetic Acid</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Kernspinresonanz
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Lichtwellenlänge von 600 nm
ori	<i>Origin of Replication</i>
P450	Cytochrom P450
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q-Wert	Reinheitsindex (Quotient $A_{\text{Proteintypisches Absorptionsmaximum}}/A_{276}$ )
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> , Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie
SOE	<i>Splicing by Overlapping Extension</i>
SRS	<i>Substrate Recognition Site</i>
T	Temperatur
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF	<i>Time of Flight</i> , Flugzeit
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV/Vis	Ultravioletter und visueller Wellenlängenbereich
WT	Wildtyp

#### Abkürzungen der 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

#### Abkürzungen der Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

## Zusammenfassung

Harzsäuren sind pflanzliche Sekundärmetabolite mit einer Vielzahl an interessanten biologischen Eigenschaften. Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung des Umsatzes ausgewählter Vertreter dieser Stoffklasse durch die bakteriellen Cytochrome P450 CYP105A1 aus *Streptomyces griseolus* und CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* sowie die Evaluierung möglicher biotechnologischer Anwendungen. Um darüber hinaus die molekularen Mechanismen der Substratbindung aufzuklären, erfolgten die Kristallisation und Strukturaufklärung der beiden Enzyme im Komplex mit der Abietinsäure. Für das CYP105A1 konnten hierdurch interessante Details über den Einfluss des Lösemittels bei der Substratbindung aufgeklärt werden. Im Fall des CYP106A2 stellt diese Arbeit die erste Beschreibung der Struktur des Enzyms überhaupt dar und bildet eine wichtige Grundlage für gezielte Modifikationen dieses biotechnologisch hochinteressanten Cytochroms P450.

Tatsächlich konnte mit der Analyse von Affinität und Aktivität des CYP105A1 gegenüber der Abietinsäure außerdem eine vielversprechende Ausgangsposition für die Nutzbarmachung dieser Biokatalyse etabliert werden. Das Reaktionsprodukt wurde als 15-Hydroxyabietinsäure identifiziert, eine auf chemischen Weg nur sehr schwer zu synthetisierende Substanz, die von großem Interesse für die Allergieforschung ist. Aus diesem Grund wurde ein Ganzellsystem entwickelt und optimiert, welches die Basis für eine industrielle Anwendung dieser Biokatalyse bildet.

**Abstract**

Resin acids are secondary metabolites of plant origin that exhibit a tremendous amount of interesting biological characteristics. The aim of this work was the analysis of conversion of chosen resin acids with the bacterial cytochromes P450 CYP105A1 from *Streptomyces griseolus* and CYP106A2 from *Bacillus megaterium*. Furthermore, possible biotechnological applications of the observed reactions were to be evaluated. To further examine the molecular basics of the substrate binding, both enzymes were crystallized in complex with abietic acid for the purpose of structure determination. The latter resulted in interesting scientific findings about the influence of solvent on substrate binding of CYP105A1. In case of CYP106A2, this work represents the very first description of the crystal structure which can now serve as a molecular basis for site directed modifications of this biotechnologically extremely interesting enzyme.

*In vitro* characterization of binding and conversion of abietic acid with CYP105A1 showed in fact promising results for the utilization of this biocatalysis. The reaction product could be identified as 15-hydroxyabietic acid, a highly interesting substance for the investigation of allergy mechanisms that is very difficult to obtain by chemical means. For this reason, a whole cell system was designed and characterized that forms the basis for an industrial application of this biocatalysis.

# 1 Einleitung

## 1.1 Cytochrome P450

### 1.1.1 Geschichte und Nomenklatur

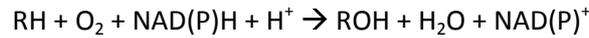
Der Begriff „Cytochrom P450“ wurde 1962 das erste Mal von Omura und Sato in der wissenschaftlichen Literatur verwendet (Omura und Sato 1962). Sie hatten nachgewiesen, dass es sich bei dem bereits vier Jahre zuvor von Klingenberg (Klingenberg 1958) beschriebenen mikrosomalen, Kohlenstoffmonoxid-bindenden Pigment um ein Hämprotein handelt. Der Name rührt vom charakteristischen Absorptionsmaximum bei 450 nm im reduzierten CO-Komplex her, der sich auf den Cysteinrest, über den das Eisenatom des Protoporphyrin IX gebunden ist, zurückführen lässt. Noch bevor Omura und Sato ihre Forschungen 1964 in vollem Umfang veröffentlichten (Omura und Sato 1964*a,b*), wurde die Funktion von Cytochrom P450 als Oxygenase im Steroidmetabolismus durch Estabrook, Cooper und Rosenthal entdeckt (Estabrook *et al.* 1963). Kurze Zeit später wurde außerdem ihre zentrale Rolle bei der Oxidation verschiedener Medikamente in Lebermikrosomen nachgewiesen (Cooper *et al.* 1965). Mit diesen Entdeckungen stieg das wissenschaftliche Interesse an diesen offensichtlich ebenso wichtigen wie vielseitigen Enzymen rapide an. Bereits vor der Veröffentlichung von Studien, die auf das Vorhandensein mehrerer P450-Systeme in der Leber hindeuteten (Hildebrandt *et al.* 1968, Sladek und Mannering 1969), wurde das erste P450-Spektrum in einem Bakterium nachgewiesen (Appleby 1967). Schon im folgenden Jahr erfolgten die Beschreibung und Charakterisierung des P450cam (CYP101A1) und seiner Redoxpartner aus *Pseudomonas putida* (Gunsalus *et al.* 1968). Im Gegensatz zu den mikrosomalen P450-Systemen sind die bakteriellen Systeme nicht in Membranen inseriert, sondern löslich, wodurch sie sich verhältnismäßig leicht isolieren und konzentrieren ließen (Katagiri *et al.* 1968). Bereits im Laufe der 1970er Jahre wurden viele dieser Enzyme erfolgreich gereinigt und charakterisiert. Durch rasche Fortschritte bei der Entwicklung gentechnischer Methoden, wie Klonierung und heterologer Proteinexpression, stieg die Zahl der beschriebenen Cytochrome P450 in den 1980er Jahren rasch so stark an, dass schließlich im Jahr 1987 eine einheitliche Nomenklatur basierend auf Sequenzvergleichen der Gene eingeführt wurde. Ein Gen bzw. Protein wird demnach als CYP (**C**ytochrom **P**450) bezeichnet und einer der CYP-Familien, gekennzeichnet durch eine arabische Zahl, mit einer Sequenzübereinstimmung  $\geq 40\%$  zugeordnet. Unterfamilien, mit einer Sequenzübereinstimmung von  $\geq 55\%$ , werden durch einen Buchstaben gekennzeichnet. Eine weitere arabische Zahl bezeichnet schließlich das individuelle Gen/Enzym (siehe Abbildung 1.1). Auch heute steigt die Zahl der bekannten P450-Gene durch großangelegte Sequenzierungsprojekte immer noch stetig an. So wurden bis zu diesem Zeitpunkt bereits mehr als 18.500 P450-Gene beschrieben (Nelson

2009, Nelson 2013). Vertreter der Superfamilie der Cytochrome P450 wurden in Bakterien, Archaeen, Pilzen, Pflanzen und Tieren gefunden, womit diese Enzyme in allen Domänen des Lebens vertreten sind. Im Jahre 2009 erfolgte sogar die erste Beschreibung eines viralen Cytochroms P450 (Lamb *et al.* 2009).

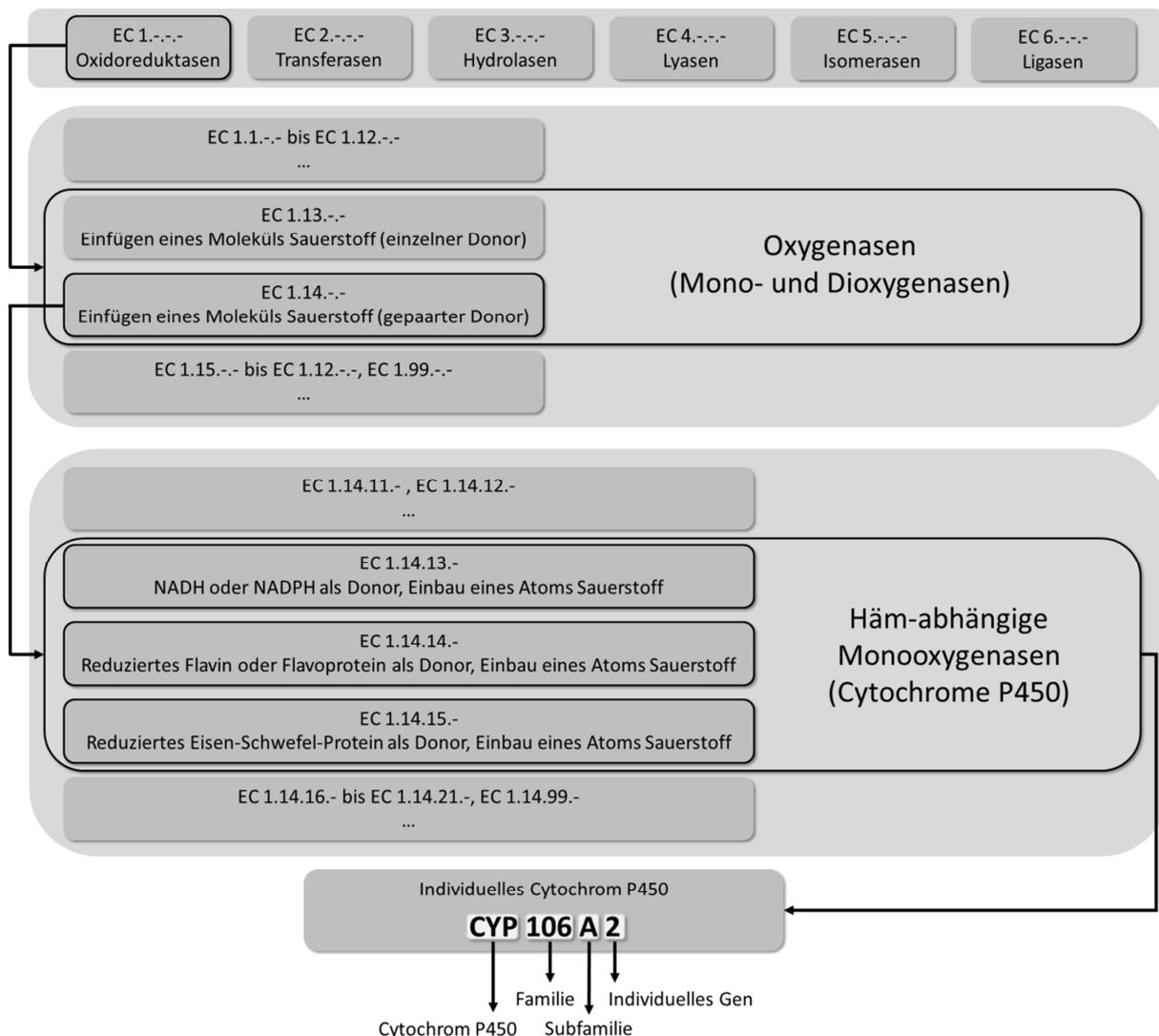
### 1.1.2 Funktion

Aufgrund der zentralen Bedeutung der Cytochrome P450 bei der Metabolisierung endogener Substrate geht man davon aus, dass ein Vorläufer-Gen dieser Enzymfamilie bereits vor 3,5 Milliarden Jahren existiert hat (Nelson *et al.* 1993). Der heute älteste und am weitesten verbreitete Vertreter ist die Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51) (Aoyama *et al.* 1996, Nelson 1999), welche eine wichtige Rolle bei der Bildung von Sterinen spielt. Auf Grund dieser Funktion hat das CYP51 vermutlich einen großen Anteil an der Entstehung von Eukaryoten und multizellulären Lebewesen, dessen Voraussetzung die Änderung der Zusammensetzung der Membran durch den Einbau von Cholesterol war (Nelson 2013). Zwar hat sich im Laufe der Evolution in nahezu allen Lebensformen eine große Vielfalt an Cytochromen P450 entwickelt, im Hinblick auf ihre Funktion lassen sich jedoch generell zwei Gruppen dieser Enzyme unterscheiden. Die eine Gruppe spielt eine zentrale Rolle bei der Biosynthese von teils essentiellen Substanzen, während die andere eine Schlüsselfunktion bei der Biodegradation von Xenobiotika hat. Im menschlichen Organismus und bei anderen Säugetieren sind P450 Enzyme beispielsweise einerseits an der Biosynthese von Steroidhormonen, Prostaglandinen und Vitamin D<sub>3</sub> beteiligt und leisten andererseits einen wichtigen Beitrag bei der Verstoffwechslung von Arznei- und Fremdstoffen in der Leber. Ähnlich verhält es sich bei Pflanzen, wo Cytochrome P450 an der Synthese von terpenoiden Phytohormonen beteiligt sind. Darüber hinaus synthetisieren viele Pflanzen unter Beteiligung von Cytochromen P450 Terpene mit spezialisierten Funktionen im Bereich der Reproduktion, Verteidigung und Symbiose. Auf der anderen Seite ist die Enzymfamilie auch hier an der Degradation von Xenobiotika, vor allem in Form von Herbiziden, beteiligt. Als direkte Folge ihrer sessilen Natur und des sich daraus entwickelten reichen Sekundärmetabolismus besitzen viele Pflanzen eine verhältnismäßig große Zahl an Cytochromen P450. So hat beispielsweise der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) 272 individuelle P450 Gene. Bei der Reispflanze, *Oryza sativa*, sind es sogar 457 (Ortiz de Montellano 2010). Der ausgeprägte Sekundärmetabolismus vieler Organismen sowie die gegenseitige Anpassung führten einerseits dazu, dass sich unabhängig voneinander verschiedene P450-Enzyme mit ähnlicher oder gleicher Funktion entwickeln konnten (Jensen *et al.* 2011) und andererseits P450-Enzyme an der Synthese einer bestimmten Substanz in einem Organismus und andere P450-Enzyme am Abbau derselben Substanz in einem anderen Organismus beteiligt sein können. Als Resultat dieser vielfältigen Funktionen und weiten Verbreitung besitzen die Cytochrome P450 ein nahezu unerschöpfliches Substratspektrum.

Ebenso vielfältig ist die Bandbreite an katalysierten Reaktionen. Neben Hydroxylierungen katalysieren sie ebenfalls N-, O- und S-Desalkylierungen, Sulfoxidierungen, Epoxidierungen, Peroxidierungen, Desulfurierungen, Desaminierungen, Dehalogenierungen sowie die Reduktion von N-Oxiden (Sono *et al.* 1996, Bernhardt 2006). Ein vereinfachtes Reaktionsschema lässt sich wie folgt darstellen:



Neben der Übertragung eines Sauerstoffatoms auf das Substrat wird das zweite Sauerstoffatom zu Wasser reduziert. Aus diesem Grund werden die Enzyme als Monooxygenasen klassifiziert. Da für diese Reaktion ein externer Elektronendonator, wie NADH oder NADPH, nötig ist, spricht man von externen Monooxygenasen. Die genaue Einteilung der Cytochrome P450 in Enzymklassen nach dem *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)* ist in Abbildung 1.1 gezeigt.



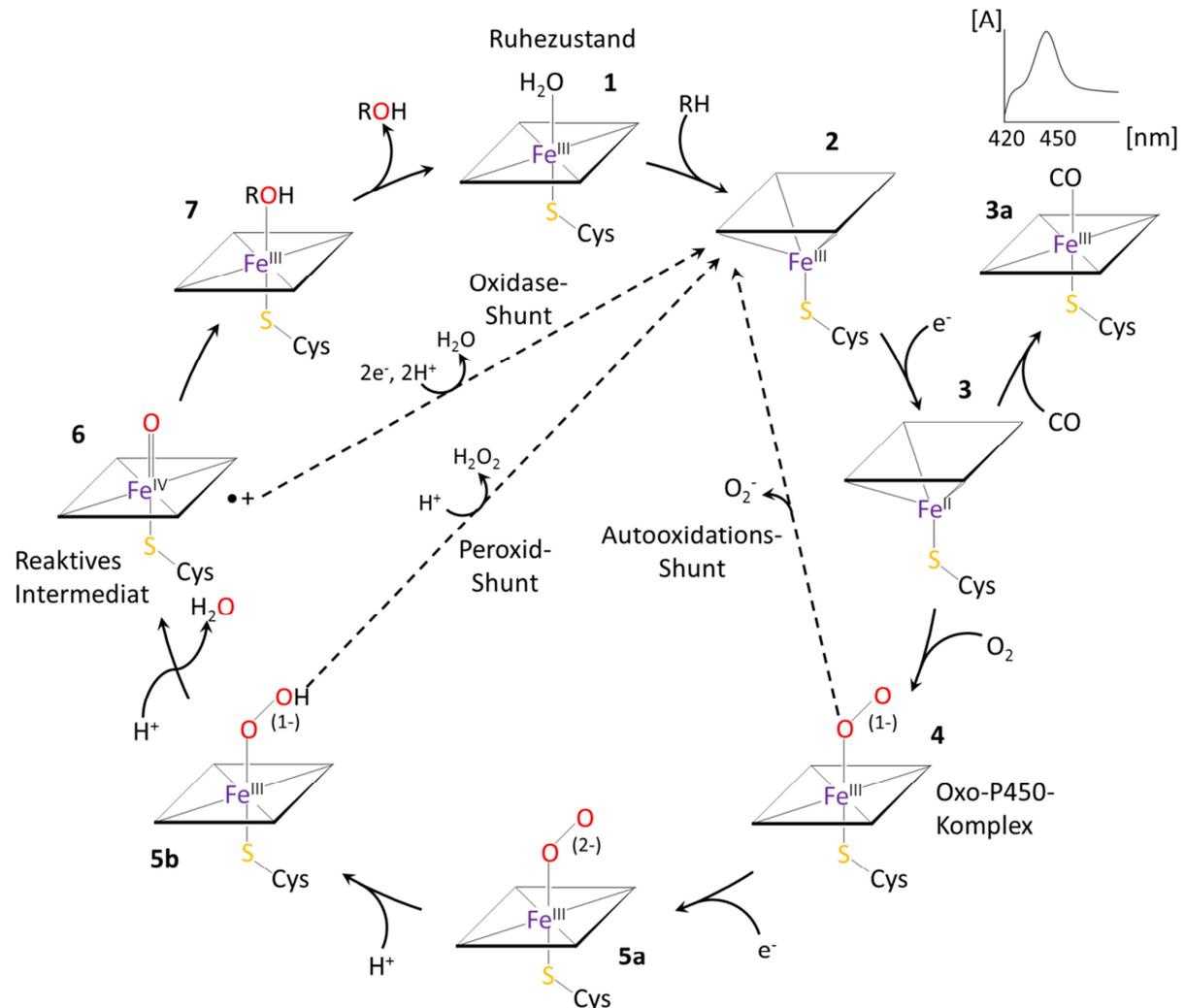
**Abbildung 1.1:** Einordnung von Cytochromen P450 in Enzymklassen und Erläuterung ihrer Nomenklatur.

### 1.1.3 Reaktionszyklus

Der katalytische Reaktionsmechanismus der Cytochrome P450 ist sehr komplex und umfasst nach aktuellem Kenntnisstand acht Zwischenstufen, darunter nur sehr schwer nachzuweisende radikalische Intermediate (Denisov *et al.* 2005). Eine Übersicht über den Reaktionszyklus zeigt Abbildung 1.2. Im Zentrum der Betrachtung stehen dabei das Häm-Eisen und der Sauerstoff. Im Ruhezustand **(1)** herrscht gewöhnlich ein Gleichgewicht zwischen einem mit Wasser hexakoordinierten *low spin* Zustand und einem pentakoordinierten *high spin* Zustand mit dem zentralen Eisenatom in der Ferri-Form. Durch die Bindung eines Substrates wird in der Regel das Wassermolekül verdrängt, was in einer Verschiebung des Spinzustandes hin zum *high spin* resultiert **(2)**. Die Übertragung eines einzelnen Elektrons resultiert in einem Übergang des Eisenatoms in den Fe(II)-Zustand **(3)**, wodurch die Bindung verschiedener Liganden, unter anderem molekularem Sauerstoff und Kohlenstoffmonoxid, erleichtert wird. Die Bindung des letzteren führt zu einer Verschiebung der Soret-Bande hin zu einem Absorptionsmaximum bei 450 nm, der namensgebenden Eigenschaft dieser Enzymfamilie. Im Unterschied dazu kommt es durch die Bindung eines Sauerstoff-Moleküls zur Bildung eines Oxo-P450-Komplexes **(4)**, der letzten relativ stabilen Zwischenstufe im Reaktionszyklus. Eine weitere Reduktion des Komplexes resultiert in einer sehr kurzlebigen aktivierten Sauerstoff-Spezies, dem Peroxo-Intermediat **(5a)**, welches im weiteren Verlauf direkt zum Hydroperoxo-Intermediat **(5b)** protoniert wird. Die nächste Protonierung am distalen Sauerstoffatom und die darauffolgende Spaltung der O-O-Bindung führt zu der Freisetzung eines Wassermoleküls und der Bildung der sogenannten *Compound I* **(6)**, einem Intermediat mit aktiviertem Eisen-Oxo-Komplex. Obwohl die Natur von *Compound I* nicht vollständig aufgeklärt ist, deuten experimentelle Untersuchungen darauf hin, dass es sich hierbei um ein Eisen<sup>4+</sup>-Oxo- $\pi$ -Kation-Radikal handelt. Von diesem wird das Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen **(7)** und der Ausgangszustand wieder hergestellt. Jedoch wird nicht immer der komplette P450-Reaktionszyklus durchlaufen. Es existieren mehrere Abzweigungen, an denen Nebenreaktionen auftreten können. So kann beispielsweise der Oxo-P450-Komplex **(4)** durch Autooxidation und Produktion eines Superoxid-Anions wieder in den Ruhezustand gelangen. Auch das Peroxid- bzw. Hydroperoxidanion **(5a und 5b)** kann unter Wasserstoffperoxidbildung vom Eisen dissoziieren (*Peroxid-shunt*). Beim sogenannten *Oxidase-shunt* reagiert das aktivierte Sauerstoffatom des Eisen-Oxo-Komplexes zu Wasser ab anstatt auf das Substrat übertragen zu werden.

Da sowohl der Oxidations- als auch der Spinzustand des zentralen Häm-Eisenatoms einen Einfluss auf die Absorptionsspektren von P450s haben, steht hiermit ein vielseitiger spektroskopischer Marker zur Verfügung. Mittels Spektroskopie lässt sich nicht nur die Proteinkonzentration bestimmen, sie erlaubt auch allgemeine Aussagen über den Zustand der Enzymintermediate im Reaktionszyklus. Anhand des Einflusses des axialen sechsten Liganden des Häm-Eisens auf das Spektrum lassen sich

beispielsweise Bindung und Affinität von Substraten und Inhibitoren beschreiben. Dem zu Grunde liegt der Einfluss des Spinzustands des Häm-Eisens auf das optische Absorptionsspektrum: Im niedrigen Spinzustand (LS, *low spin*) liegt das Absorptionsmaximum der typischen Soret-Bande bei 415-417 nm, während das Maximum im hohen Spinzustand (HS, *high spin*) bei 390-394 nm liegt. Diese Eigenschaft erlaubt die spektroskopische Untersuchung der Substratbindung von Cytochromen P450. Die Verdrängung eines Wassermoleküls als sechsten Häm-Liganden durch Bindung des Substrats resultiert in einem sogenannten Typ-I-Differenzspektrum mit einem Minimum bei 420 nm und einem Maximum bei etwa 390 nm. Im Gegensatz dazu weisen Typ-II-Differenzspektren ein Maximum zwischen 425 und 440 nm und ein Minimum bei etwa 415 nm auf. Diese werden zumeist von starken Liganden ausgelöst, die ein Stickstoffatom enthalten und als Inhibitoren fungieren.



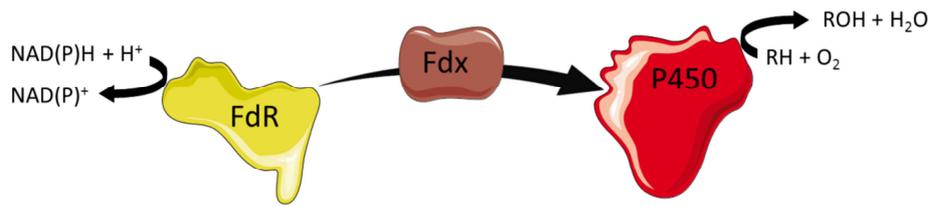
**Abbildung 1.2:** Reaktionszyklus der P450-Enzyme. Abbildung verändert nach Ortiz de Monellano 2004 und Denisov *et al.* 2005.

#### 1.1.4 Elektronentransferpartner

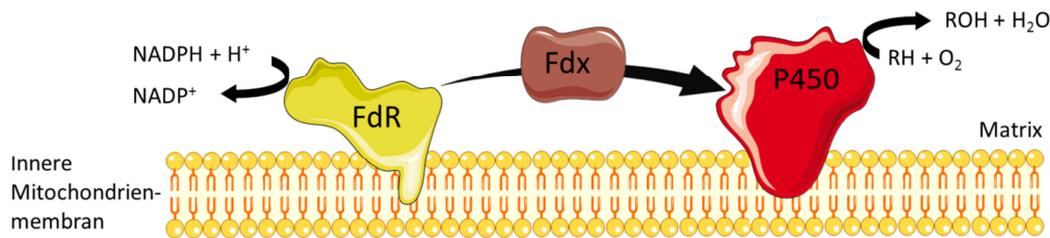
Die für die entsprechenden P450-katalysierten Reaktionen von den externen Monooxygenasen benötigten Elektronen stammen in den meisten Fällen von NAD(P)H und werden über eine Elektronentransportkette auf das Cytochrom übertragen. Unterschiede in diesem Elektronentransportsystem in Form der zusätzlich benötigten Proteine erlauben die Einteilung der Cytochrome P450 in verschiedene Klassen (Hannemann *et al.* 2007). Die beiden Hauptklassen sind in Abbildung 1.3 dargestellt. Bei Systemen der Klasse I erfolgt der Elektronentransport von NAD(P)H über eine FAD-haltige Ferredoxin-Reduktase und ein lösliches Ferredoxin mit einem Eisen-Schwefel-Cluster als Kofaktor zum Cytochrom P450. Innerhalb dieser Klasse differenziert man zwischen dem bakteriellen System, bei dem alle Proteinkomponenten löslich im Cytoplasma vorliegen, und dem mitochondrialen System, bei dem die Ferredoxin-Reduktase an die innere Mitochondrienmembran assoziiert und das Cytochrom in die Membran inkorporiert sind. Im Falle des mikrosomalen Klasse II Systems dagegen erfolgt der Elektronentransfer über ein einzelnes Protein, die ebenfalls membranständige Diflavin-haltige Cytochrom P450-Reduktase mit je einer FAD- und FMN-Domäne. Darüber hinaus wurden insbesondere bei Prokaryoten noch eine Reihe weiterer Systeme mit anderen Proteinvarianten und Fusionsproteinen beschrieben. Ein Beispiel hierfür ist das P450BM3 (CYP102A1), ein Fusionsprotein aus einer P450-Oxygenase Domäne die über einen kurzen Linker mit einer Diflavin-Reduktase Domäne mit je einem FAD und FMN als Kofaktor fusioniert ist (Nurhi und Fulco 1986).

Die Interaktionsdomänen vieler P450s zu ihren jeweiligen Redoxpartnern sind detailliert charakterisiert und weisen einen hohen Konservierungsgrad untereinander auf. Als Folge hiervon sind die Redoxpartner oft austauschbar, womit durchaus heterologe Proteine aus anderen Organismen für die Elektronenübertragung verwendet werden können. Dies ist beispielsweise bei der Charakterisierung von P450-Enzymen von Vorteil, bei denen die Redoxpartner des Wirtsorganismus noch nicht identifiziert werden konnten. Ein weiterer praktischer Nutzen heterologer Redoxproteine ergibt sich bei biotechnologischen Anwendungen durch die Verwendung effektiverer bzw. leichter zu exprimierender Interaktionspartner. Beispiele für häufig verwendete heterologe Redoxsysteme sind die kommerziell erhältlichen Ferredoxin-Reduktase und das Ferredoxin aus der Spinatpflanze (*Spinacea oleracea*) sowie die gut charakterisierten Elektronentransportproteine des P450cam, Putidaredoxin-Reduktase und Putidaredoxin.

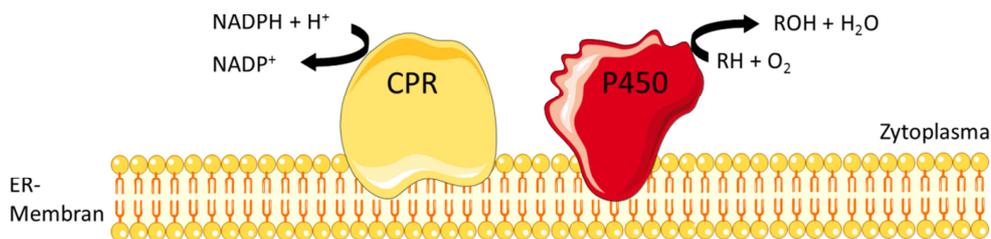
## A) Klasse I – bakterielles System



## B) Klasse I – mitochondriales System



## C) Klasse II – mikrosomales System

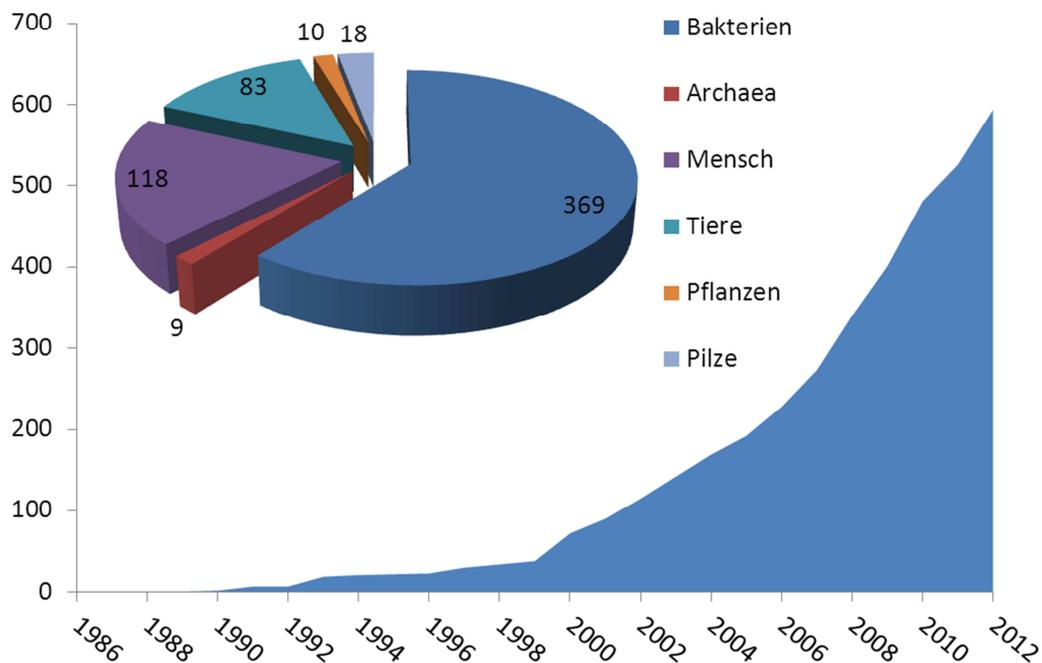


**Abbildung 1.3:** Schematische Übersicht der Einordnung der Cytochrom P450-Systeme nach Hannemann *et al.* 2007. FdR = Ferredoxin-Reduktase, Fdx = Ferredoxin, P450 = Cytochrom P450, CPR = Cytochrom P450-Reduktase, ER = endoplasmatisches Retikulum.

### 1.1.5 Strukturaufklärung von Cytochromen P450

Das erste Cytochrom P450, dessen Kristallstruktur aufgeklärt werden konnte, war das P450cam aus *Pseudomonas putida*. Dieses Enzym konnte bereits 1974 erstmals kristallisiert werden (Yu *et al.* 1974). Die erste Kristallstruktur, im Komplex mit dem Substrat Campher, wurde schließlich 1985 veröffentlicht (Poulos *et al.* 1985). P450cam zählt zu den am besten charakterisierten Cytochromen und dient bis heute in vielen Bereichen als Modell-Enzym. Dies lässt sich auch an der Tatsache erkennen, dass es bis heute in der PDB über 100 Strukturen des P450cam gibt, darunter zahlreiche Mutanten, Intermediate des Reaktionszyklus, offene und geschlossene Konformationen mit verschiedenen Substraten und Inhibitoren etc. Ein weiteres Enzym mit Modell-Charakter ist die Häm-Domäne des natürlichen Fusionsproteins P450BM3. Die verschiedenen Strukturen dieser beiden Enzyme stellen ein Viertel aller bis dato veröffentlichten P450-Strukturen dar. Da es sich bei den bakteriellen P450s um lösliche Proteine handelt, stellt ihre Kristallisation ein geringeres Problem dar

als die der eukaryotischen P450s, welche im Allgemeinen an mikrosomale oder mitochondriale Membranen gebunden sind. Dies spiegelt sich auch in der Zahl der publizierten Kristallstrukturen wider. Während es insgesamt 369 Strukturen von 49 verschiedenen bakteriellen Cytochromen gibt (Stand: März 2013) liegt die Anzahl der eukaryotischen Strukturen mit etwa 230 bei 31 individuellen Cytochromen deutlich niedriger. Für die Kristallisation membrangebundener P450s werden häufig mittels gentechnischer Methoden löslichere Varianten der Enzyme hergestellt (Janocha *et al.* 2011). So wurden beispielsweise im Fall des CYP2C5, der ersten veröffentlichten Struktur eines mikrosomalen P450 aus Säugetieren, mehrere Aminosäuren ausgetauscht, um eine höhere Löslichkeit und bessere Kristallisation des Proteins zu gewährleisten (Williams *et al.* 2000). Inzwischen konnte auch die Struktur von vielen humanen P450 erfolgreich geklärt werden. Dabei liegt ein besonderes Augenmerk auf den Arzneimittel-metabolisierenden Cytochromen der Leber, was man an der Tatsache erkennen kann, dass die CYP2-Familie mit elf kristallisierten Isoenzymen sehr stark vertreten ist. Diese Strukturen sind besonders im Hinblick auf die Analyse der Interaktion von pharmazeutischen Wirkstoffen interessant. Dies trifft auch auf andere humane P450 zu, wie beispielsweise die Aromatase: Anhand ihrer Struktur konnten kürzlich erfolgreich maßgeschneiderte Inhibitoren entwickelt werden (Ghosh *et al.* 2012). Darüber hinaus konnten in vielen Fällen durch die Identifikation der an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren die Selektivität der katalysierten Reaktion und das Substratspektrum beeinflusst werden. Dies ist auch im Hinblick auf bakterielle Cytochrome von besonderem Interesse, da sie ein großes Potential als Biokatalysatoren besitzen. So sind beispielsweise insgesamt 42 Strukturen von P450s aus sieben verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen erfolgreich geklärt worden. Hierbei handelt es sich um wichtige Antibiotika-Produzenten. Abgesehen von der Allenoxid-Synthase (CYP74), bei der es sich wegen ihrem Reaktionsmechanismus ohne Nutzung von molekularem Sauerstoff und NAD(P)H um ein eher untypisches CYP-Enzym handelt (Noordermeer *et al.* 2001), konnte noch keine pflanzliche P450 Struktur geklärt werden. Auch die Strukturen von P450s aus Pilzen und Archaeen sind bislang mengenmäßig stark unterrepräsentiert. Aufgrund vieler interessanter Eigenschaften insbesondere der Cytochrome aus Archaeen besteht jedoch ein großes Interesse an ihrer Strukturaufklärung. Als Beispiel lässt sich hier das thermophile P450 CYP119 nennen, dessen Schmelztemperatur bei etwa 90 °C liegt (Yano *et al.* 2000). Eine allgemeine Übersicht über die Entwicklung und Zugehörigkeit der in der PDB abgelegten Kristallstrukturen von Cytochromen P450 ist in Abbildung 1.4 gezeigt.

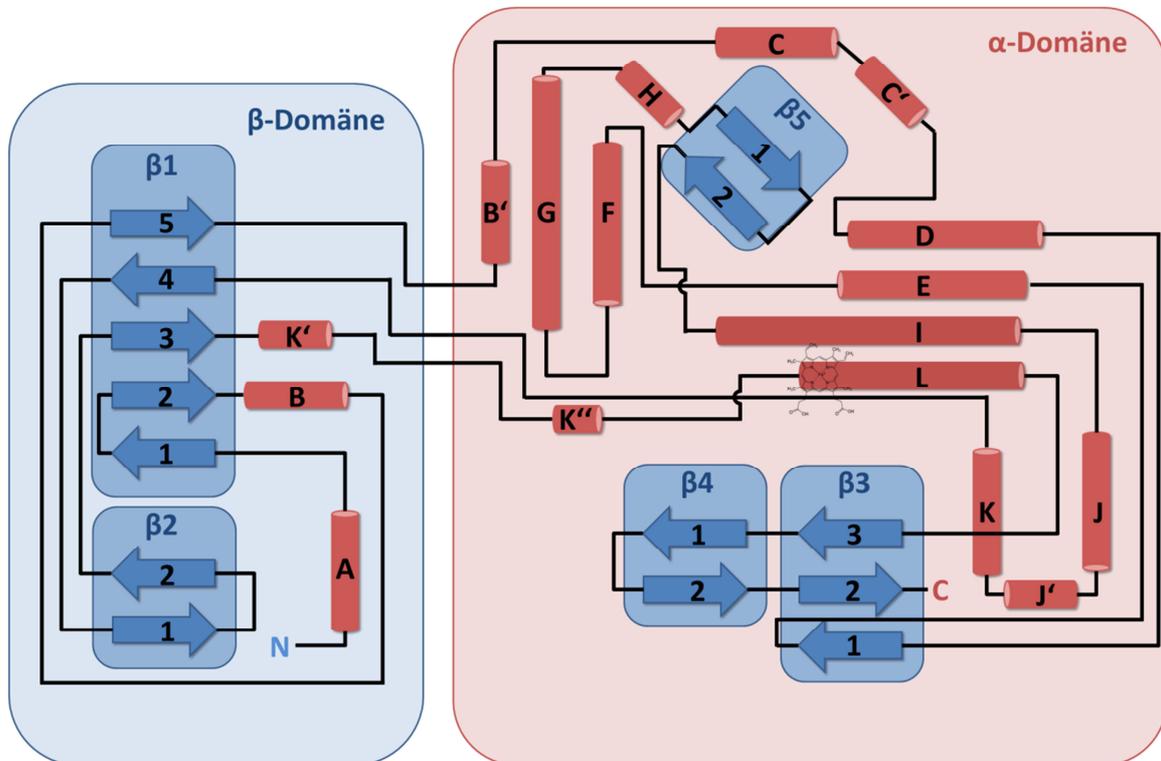


**Abbildung 1.4:** Wichtige Eckpunkte zu den in der *Protein Data Bank* (PDB) abrufbaren Kristallstrukturen von Cytochromen P450. Das Kreisdiagramm zeigt die Zugehörigkeit der etwa 600 veröffentlichten P450-Strukturen zu den Organismen. Das Flächendiagramm gibt die Entwicklung der Gesamtzahl der abgelegten P450-Strukturen in der *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB* (<http://www.rcsb.org/pdb/>) seit Mitte der 80er Jahre an (Stand: März 2013).

### 1.1.6 Die dreidimensionale Struktur der Cytochrome P450

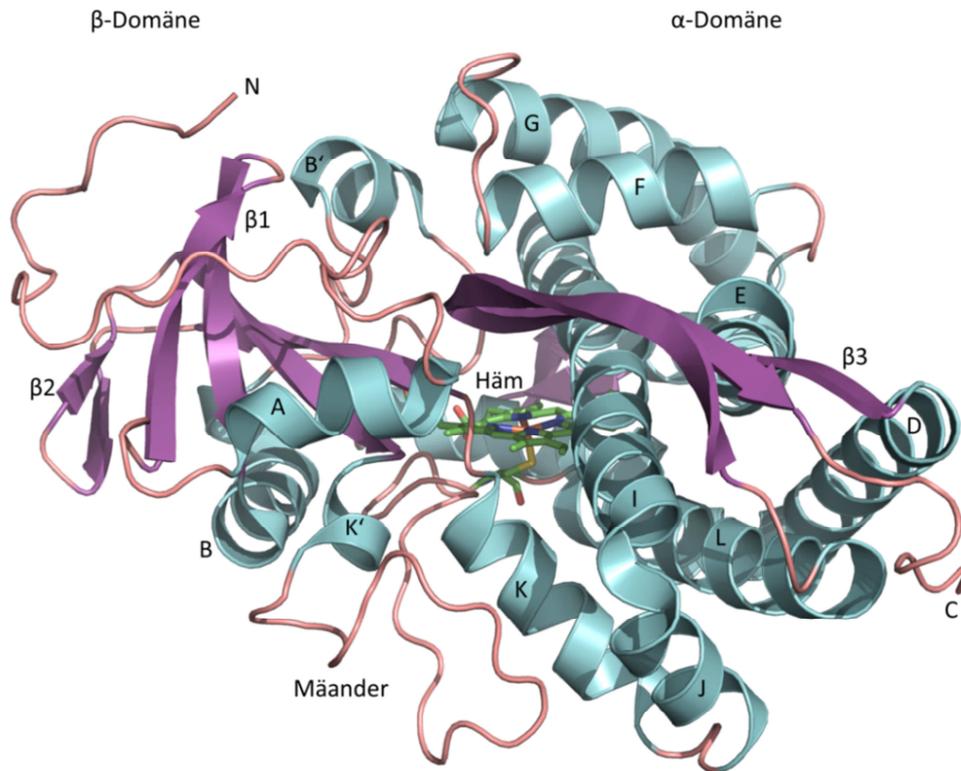
Obwohl die Sequenzidentität über die gesamte Superfamilie betrachtet teilweise unter 20 % liegt, zeigen die verschiedenen P450-Enzyme eine große Übereinstimmung in ihrer Faltung und Topologie (Hasemann *et al.* 1995). Eine Übersicht hierüber geben das in Abbildung 1.5 gezeigte Topologiediagramm der Häm-Domäne des CYP102A1 sowie die beispielartig in Abbildung 1.6 gezeigte Tertiärstruktur des P450cam. Cytochrome P450 weisen im Allgemeinen eine trigonale, prismatische Form (65 Å Länge, 35 Å Breite) mit 14  $\alpha$ -Helices (A-L) und 5  $\beta$ -Faltblättern auf. Dabei bildet ein vier-Helix-Bündel aus den drei parallelen  $\alpha$ -Helices D, L und I sowie der antiparallelen  $\alpha$ -Helix E den konservierten strukturellen Kern (Presnell und Cohen 1989). Die prosthetische Häm-Gruppe befindet sich zwischen den  $\alpha$ -Helices I und L und wird über ein Cystein im Häm-Liganden-Loop mit dem für Cytochrome P450 charakteristischen Sequenz-Motiv FxxGx(H/R)xCxG koordiniert. Dieser Cysteinrest als fünfter Ligand des Häm-Eisens ist über alle P450-Enzyme konserviert. Die lange I-Helix durchspannt nahezu das gesamte Molekül und bildet eine Begrenzung der Substratbindetasche. Eine besondere Bedeutung innerhalb dieser Struktur hat die in der Nähe des Häms gelegene konservierte Aminosäuresequenz (A/G)Gx(E/D)T, die einen Knick in der Mitte der I-Helix hervorruft. Die Aminosäuren in diesem Bereich spielen eine wichtige Funktion beim Katalysemechanismus (Imai *et al.* 1989, Martinis *et al.* 1989). Ein weiteres hochkonserviertes

Strukturmotiv ist der Mäander, eine Schlaufe am C-terminalen Ende der K-Helix, welche durch die konservierte Sequenz ExxR stabilisiert wird. Darüber hinaus weisen ebenfalls das fünfsträngige  $\beta$ 1-Faltblatt sowie das  $\beta$ 2-Faltblatt mit zwei Strängen einen hohen Konservierungsgrad auf.



**Abbildung 1.5:** Topographische Karte der Sekundärstrukturelemente der Cytochrome P450 am Beispiel von P450BM3. Die roten Zylinder stellen  $\alpha$ -Helices und die blauen Pfeile  $\beta$ -Faltblattstränge dar. Die schwarzen Linien repräsentieren *random coil*-Strukturen, über die die einzelnen Sekundärstrukturelemente verknüpft sind. Die Elemente sind in zwei Domänen gruppiert, wie erstmals von Poulos beschrieben (Poulos *et al.* 1987). Die Länge der Sekundärstrukturelemente in der Abbildung entspricht nicht dem Verhältnis in der Primärstruktur. Abbildung verändert nach Peterson und Graham 1998.

Die große Vielfalt der unterschiedlichen Substrate legt nahe, dass trotz einer hoch konservierten Faltung der Cytochrome P450 auch Bereiche mit großer Varianz existieren. Die Strukturelemente mit der größten Variabilität sind die  $\alpha$ -Helices A, B', B, F, G, H, und K' sowie die  $\beta$ -Faltblätter  $\beta$ 3 und  $\beta$ 4 und die Schleifen-Regionen. Von großer Bedeutung sind dabei die sechs sogenannten Substraterkennungsregionen (SRS, *substrate recognition sites*), die an der Erkennung und Bindung von Substraten beteiligt sind (Gotoh 1992). Hierbei handelt es sich um die B'-Helix Region (SRS1), Teile der Helices F und G (SRS2 und SRS3), einen Teil der I-Helix (SRS4), der  $\beta$ 4-Haarnadel-Struktur (SRS5) sowie den Bereich zwischen K-Helix und  $\beta$ 2 (SRS6). Diese Proteinregionen flankieren das aktive Zentrum und sind sehr flexibel. Kristallstrukturen von Cytochromen P450 mit Liganden belegen die wichtige Funktion dieser Regionen und zeigen außerdem die strukturelle Umordnung des Proteins nach Bindung von Substraten oder Inhibitoren, entsprechend dem von Koshland vorgeschlagenen Modell des *induced fit* (Koshland 1958).



**Abbildung 1.6:** Kristallstruktur von P450cam (PDB-Eintrag 2CPP). Die  $\alpha$ -Helices (gekennzeichnet durch Großbuchstaben) sind in blau dargestellt, die  $\beta$ -Faltblattstränge (nummeriert) in lila und die *random coil*-Strukturen in orange. N- und C-Terminus sind beschriftet. Das Häm als Stäbchenmodell befindet sich im Zentrum des Moleküls.

### 1.1.7 CYP105A1 aus *Streptomyces griseolus* ATCC 11796

Mitte der 1980er Jahre wurde durch Romesser und Brown das erste Mal gezeigt, dass das Bodenbakterium *Streptomyces griseolus* in der Lage ist, Chlorsulfuron, ein Herbizid auf Sulfonylharnstoff-Basis, zu transformieren (Romesser und Brown 1985). Wie sich nach weiteren Forschungen mit dem Organismus herausstellte, war diese Reaktion induzierbar und ging mit einem erhöhten Gehalt an Cytochrom P450 im Zellextrakt einher (Romesser und O'Keefe 1986). In detaillierten Studien konnte nachgewiesen werden, dass *Streptomyces griseolus* zwei unterschiedliche, induzierbare Cytochrome P450 exprimiert, die im Folgenden P450-SU1 (CYP105A1) und P450-SU2 (CYP105B1) genannt wurden (O'Keefe *et al.* 1988). Die Gene konnten isoliert und kloniert und die Proteine heterolog in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden (Omer *et al.* 1990). Zwar konnten außerdem zwei Ferredoxine identifiziert werden, die in der Lage sind, Elektronen sowohl auf CYP105A1 als auch auf CYP105B1 zu übertragen, jedoch wurde bisher keine zugehörige Reduktase isoliert (O'Keefe *et al.* 1991). Die katalytische Aktivität beider Cytochrome lässt sich jedoch sowohl mit dem Ferredoxin-System aus Spinat als auch mit Putidaredoxin und Putidaredoxin-Reduktase rekonstituieren (O'Keefe *et al.* 1987). Eine potentielle Anwendung des CYP105A1 wurde durch die Expression in Tabakpflanzen getestet, erwies sich jedoch aufgrund der Aktivierung von Pro-

Herbiziden als eher nachteilhaft (O'Keefe *et al.* 1994). Erste Untersuchungen hinsichtlich der Eignung von CYP105A1 als Biokatalysator wurden von Hussain und Ward unternommen, die sowohl CYP105A1 als auch CYP105B1 zusammen mit ihren homologen Ferredoxinen und einer Ferredoxin-Reduktase aus *Streptomyces coelicolor* in *E. coli* und *S. lividans* exprimierten und den Ganzzellumsatz des P450-Aktivitätsmarkers 7-Ethoxykumarin zu 7-Hydroxykumarin beobachten konnten (Hussain und Ward 2003). Auch die Norisoprenoide  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ionon konnten, wenn auch mit sehr geringen Umsatzraten, erfolgreich in einem *E. coli* basierten Ganzzellsystem hydroxyliert werden (Celik *et al.* 2005). Als besonders interessant erwies sich der Umsatz von Vitamin D<sub>3</sub> in die physiologisch aktive Form 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Sawada *et al.* 2004). Die durch diese Ergebnisse motivierten Forschungen in der Gruppe um Prof. Sakaki resultierten in der Herstellung von CYP105A1 Mutanten mit erhöhter Aktivität gegenüber Vitamin D<sub>3</sub> (Hayashi *et al.* 2008). Darüber hinaus wurden Kristallisationsexperimente durchgeführt, und im Jahre 2008 konnte die dreidimensionale Struktur des Enzyms erfolgreich aufgeklärt werden (Sugimoto *et al.* 2008).

Durch weitergehende Forschungen in unserer Arbeitsgruppe bezüglich des biotechnologischen Potentials von CYP105A1 konnte der Umsatz der Antidiabetika Glimepirid und Glibenclamid gezeigt werden (Kleser *et al.* 2012). Darüber hinaus wurden verschiedene heterologe Redoxketten untersucht. Diese Untersuchungen ergaben, dass die Elektronentransfer-Proteine Arh1 und Etp1 aus *Schizosaccharomyces pombe* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Lage sind, effektiv Elektronen auf CYP105A1 zu übertragen. Im Zuge dieser Arbeiten wurde außerdem ein Ganzzellsystem für den Substratumsatz mit CYP105A1 in *Bacillus megaterium* etabliert (Kleser *et al.* 2012). Ferner deuteten erste Untersuchungen darauf hin, dass mit dem Diterpen Abietinsäure offensichtlich eine weitere Substanzklasse umgesetzt werden kann. Eine Übersicht der bisher identifizierten Substrate des CYP105A1 gibt Tabelle 1.1.

**Tabelle 1.1:** Übersicht der bisher identifizierten Substrate von CYP105A1.

Substrat	Referenz
Chlorsulfuron	Romesser und Brown 1985
Sulfometuron-Methyl	Romesser und O'Keefe 1986
Chlorimuron-Ethyl (DPX-F6025)	Romesser und O'Keefe 1986
W5822	Harder <i>et al.</i> 1991
R7402	Harder <i>et al.</i> 1991
7-Ethoxycumarin	Hussain und Ward 2003
Vitamin D <sub>2</sub>	Sawada <i>et al.</i> 2004
Vitamin D <sub>3</sub>	Sawada <i>et al.</i> 2004
25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub>	Sawada <i>et al.</i> 2004
1 $\alpha$ -Hydroxyvitamin D <sub>2</sub>	Sawada <i>et al.</i> 2004
1 $\alpha$ -Hydroxyvitamin D <sub>3</sub>	Sawada <i>et al.</i> 2004
$\alpha$ -Ionon	Celik <i>et al.</i> 2005
$\beta$ -Ionon	Celik <i>et al.</i> 2005
Glimepirid	Kleser <i>et al.</i> 2012
Glibenclamid	Kleser <i>et al.</i> 2012

### 1.1.8 CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368

Steroidhydroxylierungen in Mikroorganismen sind seit den frühen 1950er Jahren bekannt und wurden seitdem intensiv erforscht (Peterson *et al.* 1952, Fried *et al.* 1952). Bereits 1958 wurde die Hydroxylierung von Progesteron in 15 $\beta$ -Position durch *Bacillus megaterium* beschrieben (McAleer *et al.* 1958), wobei der Nachweis, dass es sich hierbei um eine Cytochrom P450-abhängige Reaktion handelt, erst viele Jahre später durch Berg *et al.* erbracht wurde (Berg *et al.* 1975). In der Folgezeit wurden die Bestandteile des Steroid-Hydroxylase-Systems identifiziert und teilweise charakterisiert (Berg *et al.* 1976), das Cytochrom gereinigt und charakterisiert (Berg *et al.* 1979a, 1979b) und die katalytischen Eigenschaften des Enzyms näher untersucht (Berg und Rafter 1981). Die Klonierung, Sequenzierung und heterologe Expression von CYP106A2 erfolgten schließlich Anfang der 1990er Jahre (Rauschenbach *et al.* 1993). Dies ebnete den Weg für neue Möglichkeiten wie die Anwendung von Methoden der molekularen Evolution in der Erforschung dieses Cytochroms (Virus und Bernhardt 2008). Neben neuen Ergebnissen in der Grundlagenforschung zeigt die wachsende Zahl an Publikationen über effektive Ganzzellsysteme (Hannemann *et al.* 2006, Bleif *et al.* 2012), dass dieses Enzym über ein großes Potential als Biokatalysator verfügt.

CYP106A2 ist ein lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 47 kDa und besteht aus 410 Aminosäuren. Die Redoxpartner aus dem Wirtsorganismus *Bacillus megaterium* ATCC 13368 konnten bislang nicht kloniert werden. Inzwischen wurden jedoch mehrere heterologe Elektronentransportsysteme, wie das bovine System aus Adrenodoxin-Reduktase und Adrenodoxin, beschrieben. Während das oder die natürlichen Substrate von CYP106A2 weiterhin unbekannt sind, wächst die Liste der Substanzen, die durch dieses Enzym hydroxyliert werden können, stetig an. Früher wurden hauptsächlich 3-oxo- $\Delta^4$ -Steroide als potentielle Substrate getestet und beschrieben, inzwischen sind aber eine große Zahl weiterer Substrate, darunter viele Terpene und Terpenoide, bekannt. Eine Übersicht der Substanzen, die von CYP106A2 umgesetzt werden können, zeigt Tabelle 1.2.

Obwohl die Aufklärung der Kristallstruktur von CYP106A2, nicht zuletzt aufgrund der Instabilität des Enzyms bei längerer Lagerung, bisher nicht erfolgreich war (Simgen 2000, Virus *et al.* 2006), konnten durch eine Vielzahl von Untersuchungen wichtige Erkenntnisse über den Reaktionsmechanismus und die Substratbindung gewonnen werden. Studien zur Änderung der Regioselektivität (Nguyen *et al.* 2012) stützen sich dabei auf ein Homologie-Modell des Enzyms (Lisurek *et al.* 2008).

Mit der Sequenzierung und Klonierung wurden auch die ersten Ganzzellsysteme für CYP106A2 beschrieben (*Bacillus subtilis*, Rauschenbach *et al.* 1993). Die ersten Versuche zur Optimierung eines Ganzzellsystems mit CYP106A2 wurden von Dror und Freeman unternommen (Dror und Freeman 1995). Genau wie Chatterjee verwendeten sie hierfür den Wirtstamm. Inzwischen wurden auch

Ganzellsysteme in *E. coli* und *P. putida* beschrieben (Hannemann *et al.* 2006, Ruijsenaars *et al.* 2007).

**Tabelle 1.2:** Übersicht der bisher identifizierten Substrate von CYP106A2.

Substrat	Referenz
Progesteron	Berg <i>et al.</i> 1976, Berg <i>et al.</i> 1979a
Desoxycorticosteron (DOC)	Berg <i>et al.</i> 1976, Berg <i>et al.</i> 1979a
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron	Berg <i>et al.</i> 1976, Berg <i>et al.</i> 1979a
20 $\alpha$ -Dihydroprogesteron	Berg <i>et al.</i> 1976, Berg <i>et al.</i> 1979a
Androstendion	Berg <i>et al.</i> 1976, Berg <i>et al.</i> 1979a
Testosteron	Berg <i>et al.</i> 1976, Berg <i>et al.</i> 1979a
Corticosteron	Berg <i>et al.</i> 1976, Berg <i>et al.</i> 1979a
Anilin	Berg und Rafter 1981
6-Fluor-16-Methyl-DOC	Rauschenbach <i>et al.</i> 1993
Betulinsäure	Chatterjee <i>et al.</i> 2000
6 $\beta$ -Hydroxyprogesteron	Lisurek 2004
15 $\beta$ -Hydroxyprogesteron	Lisurek 2004
Cholestenon	Lisurek 2004
Spironolacton	Lisurek 2004
11-Desoxycortisol	Virus 2006
4-Pregnen-20 $\beta$ -ol-3-on	Bleif 2007
11-Keto- $\beta$ -boswelliasäure	Bleif 2007
Dihydrochinopimarsäure	Bleif 2007
Ethisteron	Bleif 2007
17 $\alpha$ -Methyltestosteron	Bleif 2007
4-Pregnen-17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ ,21-triol-3-on	Bleif 2007
Abietinsäure	Bleif 2012
Oleanolsäure	Bleif 2012
Ursolsäure	Bleif 2012
Glycyrrhetinsäure	Bleif 2012
Digitoxigenin	Schmitz 2013
Prednison	Schmitz 2013
Dexamethason	Schmitz 2013
Dehydroepiandrosteron (DHEA)	Schmitz 2013
Pregnenolon	Schmitz 2013
Dipterocarpol	Schmitz 2013
Betulin	Schmitz 2013

### 1.1.9 Cytochrome P450 in der Biotechnologie

Für den Einbau von molekularem Sauerstoff in nicht aktivierte Kohlenstoffatome werden bei chemischen Synthesemethoden oft starke Oxidationsmittel benötigt, wobei sich ein regio- bzw. enantioselektiver Vorgang nur sehr schwer kontrollieren lässt (Loughlin 2000). Im Unterschied dazu sind Cytochrome P450 in der Lage, diese Art von Reaktion stereo- und regioselektiv bei neutralem pH-Wert und moderaten Temperaturen durchzuführen. Aus diesem Grund stellen P450s interessante Biokatalysatoren mit einem hohen Potential für biotechnologische Anwendungen dar, deren vielfältige Funktionen durch ein breit gefächertes Substratspektrum komplettiert werden (Bernhardt

1996, 2006). Ein möglicher Einsatz dieser Enzyme ist die Produktion von Feinchemikalien, beispielsweise durch die Oxidation von Terpenen, deren Derivate wichtige Verbindungen in der Geschmacks- und Geruchsstoff-Industrie sind. Eine weitere Anwendung ist die Biosynthese von Intermediaten des menschlichen Arzneimittel-Metabolismus, denn die Pharmakokinetik von P450-derivatisierten Stoffwechselprodukten und Studien bezüglich ihrer Toxizität sind ein wichtiges Forschungsfeld. Darüber hinaus gibt es vielversprechende Ansatzpunkte für den Einsatz von P450-basierten Systemen zur biologischen Dekontamination. So wurden bereits transgene Pflanzen hergestellt, die in der Lage sind, selektiv den Sprengstoff 1,3,5-Trinitro-1,3,5-triazinan (RDX) abzubauen (Rylott *et al.* 2006). Auch ein Einsatz solcher Systeme für die Behandlung von Industrieabwässern ist denkbar.

Der Grund für den nach heutigem Stand noch überschaubaren Einsatz von Cytochromen P450 für biotechnologische Zwecke liegt in einigen Herausforderungen, die der Einsatz dieser Enzyme mit sich bringt. Hierzu gehören die Abhängigkeit von Redoxpartnern und dem teuren Kofaktor NAD(P)H, die geringe Stabilität der Proteine unter Prozessbedingungen sowie eine im Vergleich zu anderen biotechnologisch genutzten Enzymen geringe Aktivität (Julsing *et al.* 2008). Als generelle Strategie für die biotechnologische Anwendung von P450-Systemen hat sich aus diesem Grund der Einsatz von Ganzzellsystemen bewährt (Schmid *et al.* 2001). Zwar gilt es hierbei ebenfalls, potentiell limitierende Faktoren wie Substrataufnahme durch die Zelle, Produkttransport, Toxizität von Substrat bzw. Produkt und teilweise niedrige Substratlöslichkeiten in Wasser zu beachten, dennoch lassen sich im Allgemeinen eine erhöhte Stabilität und Aktivität der Proteine erreichen. Ein weiterer Vorteil liegt in der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten durch den Zellmetabolismus des Wirtes (Urlacher und Eiben 2006). Um die Effizienz und Produktausbeuten eines Ganzzellsystems weiter zu steigern, kann eine Optimierung auf drei unterschiedlichen Stufen erfolgen: der Enzymebene, der Zellebene und der Reaktionsebene. Das Reaktions-Engineering umfasst einerseits die Optimierung von Parametern wie pH-Wert, Temperatur und Sauerstoffgehalt und andererseits die Evaluation bestimmter Prozessbedingungen wie intermittierende Beschickung und der Einsatz von Zwei-Phasen-Systemen. In den Bereich des Zell-Engineering fallen beispielsweise die Auswahl des für den jeweiligen Zweck optimalen Expressionswirts, die Evaluation verschiedener Redoxpartner sowie die Ko-Expression von Chaperonen und weiteren Proteinen für eine enzymgekoppelte Kofaktor-Regenerierung. Die vielfältigsten Einflussmöglichkeiten eröffnen sich jedoch durch das Enzym-Engineering von Cytochromen P450. Neben einfachen Methoden wie dem Einsatz von heterologen Signalsequenzen oder der Anpassung der *Codon-Usage* an den Expressionswirt stehen mit der gerichteten Evolution mittels Zufallsmutagenese und dem rationalen Proteindesign über ortsgerechte Mutagenese zwei leistungsfähige Methoden zur gezielten Veränderung der Enzymeigenschaften zur Verfügung (Urlacher und Girhard 2012). In der Praxis wurden beide Methoden vielfach erfolgreich zur

Generierung von Mutanten mit veränderter Selektivität eingesetzt. Darüber hinaus sind aber auch Mutanten mit erhöhter Stabilität im Proteinerückgrat und verbesserter Aktivität in gemischten Lösemitteln erzeugt worden. Außerdem sind Mutanten beschrieben, die durch bessere Kopplungsraten eine erhöhte Aktivität bzw. Effektivität aufweisen (Dietrich *et al.* 2009). Ein ebenfalls häufiger Ansatzpunkt ist die Erzeugung von Fusionsenzymen aus Redoxprotein und Hämdomäne (Robin *et al.* 2009, Sabbadin *et al.* 2010). Dass ein solches System den löslichen Komponenten prinzipiell überlegen ist, zeigt sich an der Tatsache, dass die höchsten bekannten Umsatzraten von P450BM3, einem natürlichen Fusionsprotein aus NAD(P)H- und Hämdomäne, erreicht werden können (Warman *et al.* 2005). Dementsprechend hat sich dieses P450 zu einem vielseitigen Modellenzym für die Erforschung des biotechnologischen Potentials dieser Enzymfamilie entwickelt, und es existiert eine große Zahl von Arbeiten über die Erweiterung des Substratspektrums, Änderung der Selektivität und Aktivität und Umsetzungen mit Ganzzellsystemen.

Generell sind bakterielle Enzyme besser für biotechnologische Umsetzungen geeignet als ihre eukaryotischen Gegenstücke. Die Gründe hierfür liegen in ihrer Löslichkeit und den meist höheren Umsatzraten. Bereits heute ist eine Vielzahl von Cytochromen P450 bekannt, die biotechnologisch interessante Eigenschaften mitbringen und äußerst interessante Reaktionen zu katalysieren vermögen. Besonders Mikroorganismen mit einem ausgeprägten Sekundärmetabolismus, wie beispielsweise die Gattung *Streptomyces*, bieten eine interessante Quelle für potentielle Biokatalysatoren. Ständig weiterentwickelte Methoden wie *Substrat-Screenings* und *Genome-mining* resultieren in einem stetig wachsenden Fundus an Biokatalysatoren. Deren Möglichkeiten zur Anwendung wird durch die Herstellung von Mutanten mit maßgeschneiderten Eigenschaften noch beträchtlich erweitert, so dass auch auf chemischem Wege schwer oder gar nicht zu synthetisierende Verbindungen hergestellt werden können. Da eine wesentliche Voraussetzung für eine solche Optimierung die Kenntnis der Struktur des entsprechenden Enzyms ist, stellt die Aufklärung der Struktur von Cytochromen P450 ein wichtiges Forschungsgebiet dar.

Letztendlich sind die oftmals niedrigen Produktionsraten der limitierende Faktor für den Einsatz von Cytochromen P450 in industriellen Produktionsprozessen. Die minimale Raum-Zeit-Ausbeute für die industrielle Produktion von Feinchemikalien beträgt 0,1 g/l/h bei einer minimalen Endproduktkonzentration von 1 g/l (Ruinatscha *et al.* 2006, Straathof *et al.* 2002). Bei pharmazeutischen Substanzen betragen die geschätzten Werte 0,001 g/l/h für die Raum-Zeit-Ausbeute und 0,1 g/l für die Produktkonzentration. Aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten zur Optimierung der Umsatzraten gibt es aber vermehrt Beispiele für erfolgreich in der Industrie implementierte P450-basierte Synthesen. Tabelle 1.3 führt beispielartig einige dieser Reaktionen auf. Ein Fernziel wäre zum Beispiel die Klonierung von vollständigen biochemischen Synthesewegen, was die Herstellung interessanter Substanzen aus einfachen Kohlenstoffquellen erlauben würde. Ein

Beispiel ist die Produktion von Cortisol in Hefe (Szczepara *et al.* 2003) oder die Kombination von Biosynthesewegen zur Herstellung und Funktionalisierung von Terpenen.

**Tabelle 1.3:** Beispiele für industriell genutzte Biotransformationen mit der Beteiligung von Cytochromen P450. Verändert nach Julsing *et al.* 2008.

Reaktion	Biokatalysator	Ausbeute
n-Tridecan → $\alpha,\omega$ -Tridecansäure	<b>CYP52A1</b> ( <i>Candida tropicalis</i> )	166 g/l
Compactin → Pravastatin	<b>CYP105A3</b> ( <i>Streptomyces</i> sp. Y-110)	1 g/l
Simvastatin → 6 $\beta$ -Hydroxymethylsimvastatin	<b>Unbekanntes P450</b> ( <i>Nocardia autotropica</i> )	0,8 g/l
Amorpha-4,11-dien → Artemisininsäure	<b>CYP71AV1</b> ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	0,12 g/l
11-Desoxycortisol → Hydrocortison	<b>z.B. P450<sub>lun</sub></b> (z.B. <i>Curvularia lunata</i> )	k.A.

## 1.2 Terpenoide und Harzsäuren

In den meisten Fällen des Einsatzes von Cytochromen P450 in biotechnologischen Produktionsprozessen handelt es sich bei den Substraten um Naturstoffe. Dabei spielen Funktionalisierungen an der strukturell sehr breiten Stoffklasse der Terpenoide eine große Rolle, für die es auf Grund ihrer vielfältigen Eigenschaften diverse Anwendungen gibt. Als Beispiel sei die Umsetzung von Valencen in den hochpreisigen Aromastoff Nootkaton durch verschiedene P450s (Gavira *et al.* 2013) sowie die zentrale Rolle des CYP71AV1 bei der Herstellung des Anti-Malaria-Mittels Artemisinin (Ro *et al.* 2006) genannt.

Der Grundbaustein aller Terpenoide ist der ungesättigte Kohlenwasserstoff Isopren, weswegen auch der Name Isoprenoide gebräuchlich ist. In Abhängigkeit von der Anzahl an Isoprenuntereinheiten unterscheidet man zwischen Hemi- (C5), Mono- (C10), Sesqui-(C15), Di-(C20), Tri-(C30) und Tetraterpenen (C40). Dabei wird zwischen Terpenen und Terpenoiden differenziert, wobei letztere funktionelle Gruppen enthalten, während es sich bei den Terpenen um reine Kohlenwasserstoffe handelt. Konservative Schätzungen gehen davon aus, dass in der Natur mindestens 8.000 verschiedene Terpene und mehr als 30.000 Terpenoide vorkommen. Viele dieser Stoffe sind essentiell für Wachstum, Entwicklung und Stoffwechsel von Pflanzen (Croteau *et al.* 2000). Darüber hinaus spielen sie auch eine bedeutende Rolle bei der Interaktion von Pflanzen mit ihrer Umwelt und anderen Organismen, wie beispielsweise im Zuge von Reproduktion, Verteidigung oder Symbiose (Gershenzon und Dudareva 2007). Am Anfang der Terpenoid-Synthese in Pflanzen stehen das Dimethylallylpyrophosphat und sein Isomer Isopentenylpyrophosphat. Bei diesen Verbindungen handelt es sich faktisch um aktiviertes Isopren und sie werden entweder aus Acetyl-CoA im Mevalonat-Syntheseweg oder aber in seltenen Fällen aus Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat und Pyruvat im Methyl-Erythritol-4-Phosphat (MEP)-Syntheseweg gebildet. Durch das Zusammenfügen mehrerer dieser C5-Einheiten entstehen Geranylpyrophosphat (C10), Farnesylpyrophosphat (C15) und Geranylgeranylpyrophosphat (C20). Diese Verbindungen stellen wiederum die Substrate für eine Vielzahl von Terpensynthasen dar und bilden somit die Vorläufer der Mono-, Sesqui-, und Diterpenoide. Durch paarweise Kondensation von FPP und GGPP entstehen die Grundgerüste der Tri- und Tetraterpenoide. Alle diese Terpenklassen können durch nachfolgende Syntheseschritte, häufig unter der Beteiligung von Cytochromen P450, weiter funktionalisiert werden. Eine Übersicht der Terpenoidsynthese in Pflanzen zeigt Abbildung 1.6. Dabei ist beispielartig die Synthese der Abietinsäure in Koniferen durch Mitglieder der CYP720B-Familie dargestellt (Hamberger und Bohlmann 2006).

Pflanzen sind ein wichtiges biologisches System für die Produktion und Speicherung von Terpenen, die als biologisches Ausgangsmaterial für die chemische Industrie verwendet werden können (Bohlmann und Keeling 2008). So produzieren beispielsweise die verschiedenen Kiefernarten nicht

nur eine große Vielfalt an unterschiedlichen Monoterpenen, sondern auch große Mengen an diterpenoiden Harzsäuren. Hierbei handelt es sich um trizyklische Diterpene mit Carbonsäurefunktion und Doppelbindungen als funktionelle Gruppen. Sie lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen. Einerseits die Abietane, welche konjugierte Doppelbindungen besitzen und eine Isopropylgruppe am C13 tragen, sowie andererseits die Pimarane, die kein konjugiertes Doppelbindungssystem aufweisen und am C13 einen Methyl- und Vinylsubstituenten tragen. Zusammen mit anderen Monoterpenen und kurzkettigen Alkanen bilden sie die Hauptbestandteile des Baumharzes, das als Teil des Verteidigungssystems der Bäume den Organismus vor Schädlingsbefall und Pathogenen schützen soll (Keeling und Bohlmann 2006a,b). Aufgrund ihrer mikrobiellen Wirkung wurden die biologischen und pharmakologischen Eigenschaften dieser Substanzen intensiv erforscht. Neben inhibierenden Effekten gegenüber Viren, Bakterien und Pilzen (Ohtsu *et al.* 2001, Feio *et al.* 2002) wurden außerdem antitumorale, antimutagene, antiproliferierende und NO-inhibierende (Gigante *et al.* 2003) sowie entzündungshemmende Effekte (Fernández *et al.* 2001) für die Abietinsäure und viele strukturell ähnliche Substanzen beschrieben. Auf der anderen Seite wurden Derivate der Abietinsäure auch als die Hauptkontaktallergene von Kolophonium identifiziert (Karlberg *et al.* 1988). Darüber hinaus zeigen die meisten Harzsäuren eine große Wassertoxizität, mit LC<sub>50</sub>-Werten von 0,4-1,1 µg/l gegenüber der Regenbogenforelle nach 96 Stunden (Leach und Thakore 1977). Dies ist vor allem in Abwässern von Papier- und Zellstofffabriken ein großes Problem, dem man auch durch die Dekontaminierung mittels Mikroorganismen beizukommen versucht (Liss *et al.* 1997). Es gibt eine Reihe von Bakterienstämmen, die in der Lage sind, Abietinsäure zu transformieren und in einigen Fällen sogar als Kohlenstoffquelle zu benutzen (Cross und Myers 1968, Mohn *et al.* 1999, Smith *et al.* 2004, 2008). In vielen Fällen der mikrobiellen Umsetzung von Abietinsäuren wurde ebenfalls die Beteiligung von Enzymen der Cytochrom P450 Superfamilie beschrieben (Morgan und Wyndham 2002, Smith *et al.* 2008).

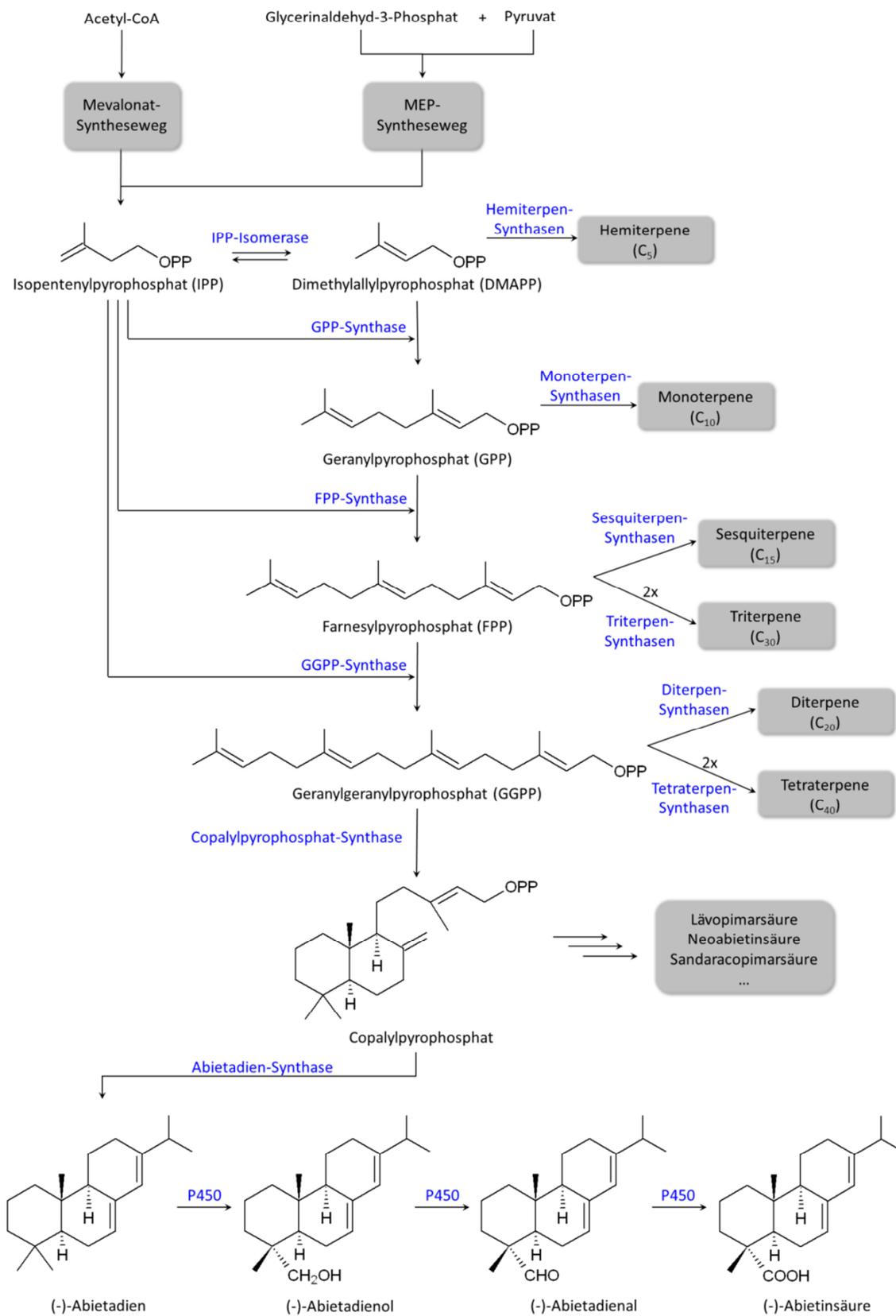


Abbildung 1.7: Übersicht der Terpenoid-Biosynthese in Pflanzen.

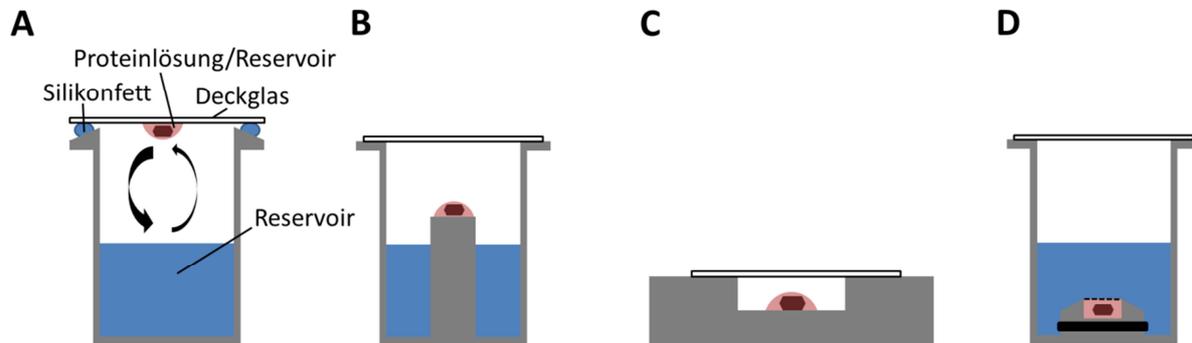
## 1.3 Proteinkristallisation

### 1.3.1 Einführung

Biomoleküle und insbesondere Enzyme als hochspezifische Biokatalysatoren weisen eine enge Verknüpfung zwischen Struktur und Funktion auf. Aus diesem Grund spielt die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eine fundamentale Rolle bei der Erforschung von Enzymen. Da es mit herkömmlichen mikroskopischen Methoden nicht möglich ist, den molekularen Aufbau von Proteinen zu untersuchen, ist die heutzutage am häufigsten angewandte Untersuchungsmethode die Kristall- bzw. Röntgenstrukturanalyse. Hierbei lässt sich durch die Beugung (Diffraktion) kurzwelliger Strahlung an einem Kristall die Struktur desselben auf atomarer Ebene beschreiben. Eine grundlegende Voraussetzung für diese Art der Strukturaufklärung von Proteinen ist daher das Vorhandensein von Proteinkristallen. Um Kristalle zu bilden, muss das lösliche Protein in einer übersättigten Lösung durch kontrollierte Veränderung der Lösungsmittel-Zusammensetzung in den kristallinen Zustand überführt werden. Da die Löslichkeit eines Proteins von der Wechselwirkung polarer und ionischer Gruppen an dessen Oberfläche mit Wasser- bzw. Puffermolekülen des Lösungsmittels abhängt, kann dies entweder durch die Entzug von Lösemittel (Wasser), dem Hinzufügen von Fällungsmitteln oder einer Kombination aus beidem erreicht werden (Rupp 2010). Als Fällungsmittel dienen dabei entweder Salze, organische Lösungsmittel oder Polymere wie Polyethylenglykol (PEG). Darüber hinaus haben außerdem der pH-Wert, die Temperatur und die Konzentration der Proteinlösung einen Einfluss auf die Löslichkeit eines Proteins. Sobald die Löslichkeitsgrenze des Proteins überschritten ist und sich ein Nukleationskeim gebildet hat, werden die Proteinmoleküle aus der Lösung in einen kristallinen Zustand überführt und bilden unter günstigen Bedingungen Einkristalle.

Einige der in der Praxis angewandten Methoden zur Kristallisation von Proteinen sind in Abbildung 1.8 schematisch dargestellt. Die am weitesten verbreiteten Kristallisationstechniken beruhen auf dem Prinzip der Dampfdiffusion. Bei der Methode des hängenden Tropfens (Abbildung 1.8 A) wird die Proteinlösung auf einem Glasplättchen, meistens mit dem gleichen Volumen einer Kristallisationslösung vermischt und luftdicht abgeschlossen, über einem Reservoir aus reiner Kristallisationslösung platziert. In diesem geschlossenen System diffundiert Wasserdampf aus dem Tropfen in das Reservoir, welches eine etwa doppelt so hohe Konzentration des Fällungsmittels enthält. Hierdurch geht das Protein in eine übersättigte Lösung über, und im Idealfall kommt es zur Bildung von Proteinkristallen. Die Methode des sitzenden Tropfens basiert auf denselben Prinzipien, mit dem Unterschied, dass der Tropfen auf eine Auslage neben bzw. auf eine Brücke, umgeben von der Kristallisationslösung, gegeben wird. Im Gegensatz dazu werden bei der *batch*-Methode Protein und Fällungsmittel in hoher Konzentration direkt miteinander vermischt, wodurch zunächst meist

Protein in Form von Präzipitat ausfällt, das sich während der Einstellung eines Gleichgewichtes jedoch häufig zu Gunsten größerer Kristalle wieder auflöst. Bei der Dialyse wird die Proteinlösung durch eine Dialysemembran von der Reservirolösung getrennt. Diese Membran kann von Wasser und kleineren Moleküle passiert werden, während das Protein zurückgehalten wird.



**Abbildung 1.8:** Schematische Übersicht der verschiedenen Kristallisationstechniken. A) Methode des hängenden Tropfens B) Methode des sitzenden Tropfens C) *batch*-Methode D) direkte Diffusion durch Dialyse.

### 1.3.2 Symmetrie von Kristallen

Ein Kristall ist ein Körper, dessen mikroskopischer Aufbau durch den periodischen, repetitiven Aufbau einzelner Bausteine in drei Raumrichtungen gekennzeichnet ist. Im Fall von Proteinkristallen liegt ein geordnetes, dreidimensionales Gitter aus Proteinmolekülen vor, die durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Die kleinste für den gesamten Kristall repräsentative Volumeneinheit ist die Elementarzelle (auch: Einheitszelle). Aus ihr lässt sich durch die Verschiebung in die drei Richtungen des Kristallgitters, also durch den Symmetrieeoperator Translation, der komplette Kristall aufbauen. Die Elementarzelle selbst wird durch die Gitterkonstanten  $a$ ,  $b$  und  $c$  (die Beträge der Basisvektoren) und die drei zwischen den Basisvektoren aufgespannten Winkel  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  charakterisiert. Der Inhalt einer Elementarzelle kann auch eine interne Symmetrie aufweisen, bei der sich Teile der Elementarzelle durch weitere Symmetrieeoperationen wie Drehung, Punktspiegelung, Drehinversion, Schraubung und Gleitspiegelung sowie Kombinationen dieser Operationen ineinander überführen lassen. Das Volumenelement, aus dem sich unter Verwendung aller Symmetrieeoperationen der gesamte Kristall abbilden lässt, nennt man asymmetrische Einheit. Die Menge aller Symmetrieeoperationen eines Kristalls bilden seine Raumgruppe. Durch Kombination von Gitter- und Symmetrie-Eigenschaften lassen sich insgesamt 230 Raumgruppen beschreiben. In Kristallen aus biologischen Makromolekülen sind diese jedoch durch den Wegfall der Symmetrieeoperationen Inversion und Spiegelung aufgrund chiraler Gruppen auf 65 reduziert.

### 1.3.3 Diffraction

Beugung oder Diffraction bezeichnet allgemein die Ablenkung von Wellen an einem Hindernis. Trifft beispielsweise Röntgenstrahlung auf einen Kristall, so wird ein gewisser Teil der Strahlung durch den Kristall abgelenkt. Der Grund hierfür ist, dass die einfallende Strahlung mit den Elektronen der Atome im Kristall in Wechselwirkung tritt und gemäß dem Huygens'schen Prinzip von diesen Hindernissen Strahlung in Form von kugelförmigen Wellen ausgeht. Unter bestimmten Bedingungen kommt es zu einer positiven Überlagerung bzw. Interferenz dieser entstehenden Kugelwellen. Dies lässt sich durch das Bragg'sche Gesetz erklären (Abbildung 1.9).

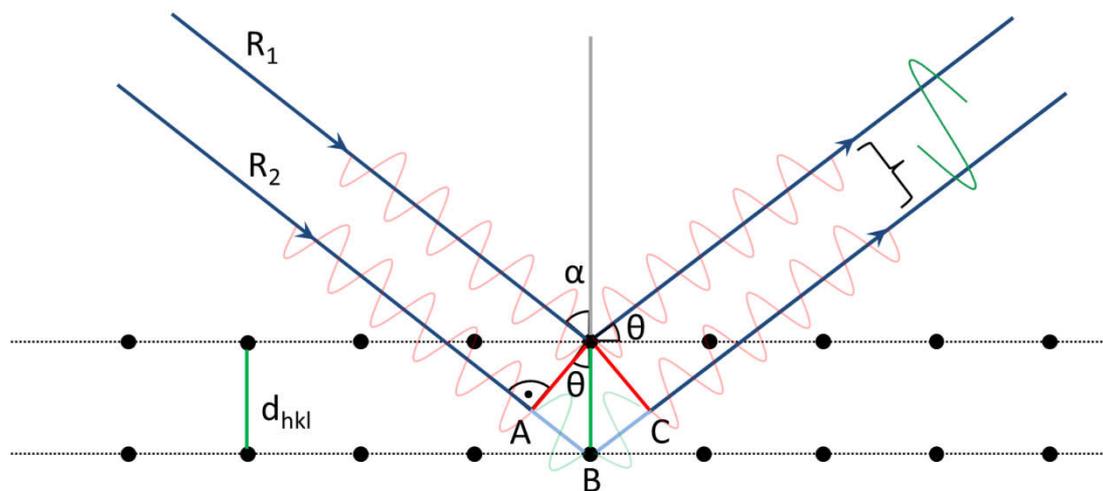


Abbildung 1.9: Schema zur Beugungsgeometrie an zwei parallelen Gitterebenen nach Bragg.

Konstruktive Interferenz tritt dann auf, wenn der Gangunterschied, also die Differenz der Wege paralleler Röntgenstrahlen, die an einer Schar paralleler Gitterebenen gebeugt werden, einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge  $\lambda$  entspricht. Für den halben Gangunterschied ergibt sich gemäß Abbildung 1.9 der Zusammenhang  $\overline{AB} = d \sin(\theta)$ . Hiermit lässt sich das Bragg'sche Gesetz

$$2 d_{hkl} \sin(\theta) = n \lambda \quad (1)$$

formulieren. Treffen Röntgenstrahlen also unter einem bestimmten Winkel auf eine Ebenenschar, so kommt es zu einer konstruktiven Interferenz. Auf einem röntgensensitiven Detektor, welcher hinter dem Kristall platziert ist, können sogenannte Reflexionen beobachtet werden.

### 1.3.4 Miller'sche Indizes und reziprokes Gitter

Die Ebenen, an denen eine solche Reflexion stattfindet, nennt man Netzebenen und die Charakterisierung ihrer Orientierung im Kristallgitter erfolgt anhand der Miller'schen Indizes. Dabei

bilden die drei ganzzahligen Indizes  $h$ ,  $k$  und  $l$  das Zahlentriplett ( $hkl$ ), welches eine spezifische Ebene bezeichnet. Auf diese Weise können einzelne Reflexionen den entsprechenden Gitterebenen zugeordnet werden.

Ist die Elementarzelle eines Kristalls bekannt, können alle möglichen Netzebenen ( $hkl$ ) konstruiert und über ihre Netzebenenabstände  $d$  die Beugungswinkel der zugehörigen Reflexe  $hkl$  berechnet werden. Soll zum Zweck der Strukturbestimmung die Vermessung möglichst vieler Reflexe erfolgen, muss für jeden die Orientierung des Kristalls zum Röntgenstrahl entsprechend der räumlichen Lage der Netzebene so eingestellt werden, dass die Bragg'sche Bedingung erfüllt ist und das ausfallende Strahlenbündel das Detektorsystem trifft (Massa 2009).

Ein wichtiges Hilfsmittel zur Veranschaulichung der Lage der Netzebenen und ihrer Röntgeninterferenzen ist das reziproke Gitter. Jede Netzebenenchar eines Kristalls wird durch einen Punkt des reziproken Gitters dargestellt (Borchardt-Ott 2008). Um den realen und den reziproken Raum miteinander zu verknüpfen und die Bragg-Bedingung für konstruktive Interferenz bei der Streuung an einem Kristall anschaulich darzustellen, eignet sich die Ewald-Kugel als Hilfskonstruktion. Sie erlaubt beispielsweise die Vorhersage von Diffraktionsmustern. Eine detaillierte Beschreibung der hier angesprochenen Zusammenhänge findet sich in der Fachliteratur (Rhodes 2000, Messerschmidt 2007).

### 1.3.5 Fourier-Transformation

Als Maß für das Streuvermögen kann jedem Beugungsreflex ein Strukturfaktor  $F_{hkl}$  zugeordnet werden, der die Gesamtergebnisse aller in einer Richtung eines  $hkl$ -Reflexes gebeugten Wellen ist. Dabei ist die gemessene Intensität  $I$  proportional zum Quadrat des Strukturfaktors  $F$ .

Bei der Röntgenstrukturanalyse wird zunächst ein Diffraktionsbild bestehend aus Reflexionen des zu untersuchenden Kristalls erzeugt. Hierbei handelt es sich im Prinzip um die Fourier-Transformation des Kristalls, was bedeutet, dass sich dieses Abbild durch eine inverse Fourier-Transformation wieder in das reale Abbild des Kristalls zurücktransformieren lässt. Während bei Abbildungen mit Licht im sichtbaren Bereich für diese Rücktransformation Glaslinsen verwendet werden, um wieder ein reales Bild zu erzeugen, ist dies bei der Röntgendiffraktion nicht möglich. Der Grund hierfür ist, dass keine geeigneten Linsen für Röntgenstrahlung existieren. Daher muss die Rücktransformation auf mathematischem Wege mit Hilfe eines Computers erfolgen.

Der Strukturfaktor ist die Fouriertransformierte der Elektronenverteilung innerhalb einer Elementarzelle. Um also letztendlich die Elektronendichte  $\rho_{xyz}$  im Kristall zu erhalten, muss eine Rücktransformation aller Strukturfaktoren  $F_{hkl}$  nach folgender Gleichung erfolgen:

$$\rho_{xyz} = \frac{1}{V} \sum_{hkl} F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} e^{-i\alpha_{hkl}} \quad (2)$$

Hierbei ist die Elektronendichteverteilung  $\rho_{xyz}$  die gesuchte Größe des Experiments.  $V$  bezeichnet das Volumen der Einheitszelle. Ein Problem ergibt sich daraus, dass die Strukturfaktoren nicht auf direktem Wege gemessen werden können. Es handelt sich bei ihnen um periodische Funktionen bestehend aus Amplitude, Phase und Wellenlänge. Letztere ist bekannt, da es sich um gebeugte Röntgenstrahlung handelt, deren Wellenlänge mit der verwendeten Röntgenstrahlung identisch ist. Die Amplitude ist proportional zum Quadrat der gemessenen Intensität der Reflexe. Die Information über die Phase geht jedoch im Verlauf des Experiments verloren, da es keinen Detektor gibt, der die zeitliche Veränderung der Amplitude verfolgen könnte. Dies bezeichnet man in der Röntgenstrukturanalyse als das sogenannte Phasenproblem.

### 1.3.6 Lösung des Phasenproblems

Zur Bestimmung der Phasen der Strukturfaktoren über Umwege existieren verschiedene Möglichkeiten. Die am häufigsten angewandten Methoden sind die Anomale Dispersion (SAD/MAD, *single/multiple wavelength anomalous dispersion*), der isomorphe Ersatz (SIR/MIR, *single/multiple isomorphous replacement*) sowie der molekulare Ersatz (MR, *molecular replacement*). Da alle Strukturen in dieser Arbeit mit Hilfe des molekularen Ersatzes gelöst wurden, wird im Folgenden nur auf diese Methode näher eingegangen. Für weitere Informationen über die anderen Methoden sei auf die einschlägige Literatur verwiesen (Drenth 1994, Rhodes 2000).

Beim molekularen Ersatz werden die Phasen der Strukturfaktoren auf indirektem Wege bestimmt. Hierzu werden die Strukturen von Proteinen mit ausreichender Ähnlichkeit herangezogen. Die Strukturfaktoren  $F_{hkl}$  werden in einen Amplitudenanteil und einen Phasenanteil aufgeteilt:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\alpha_{hkl}} \quad (3)$$

Während der Amplitudenanteil bereits experimentell bestimmt wurde, kann der Phasenanteil über die Koordinaten der ähnlichen Struktur berechnet werden. Hierzu muss das Referenzmodell durch Translation und Rotation in die richtige Orientierung gebracht werden. Von Hilfe ist hierbei die Patterson-Funktion, bei der es sich um eine Fourier-Transformation ohne Phasenwert und mit Intensitäten  $|F_{hkl}^2|$  an Stelle der Amplituden handelt:

$$P_{uvw} = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{hkl}^2| e^{-2\pi i(hu+kv+lw)} \quad (4)$$

Als Folge hiervon gehen die Informationen über die absoluten Positionen der Atome verloren; es können nur noch die relativen Abstände zwischen den Atomen ermittelt werden. Dafür kann die Patterson-Funktion direkt aus den gemessenen Daten ermittelt werden. Die Ortsunabhängigkeit der

Funktion erlaubt außerdem eine unabhängige Rotations- bzw. Translationsuche der zu lösenden Struktur mit dem Referenzmodell.

### 1.3.7 Verfeinerung eines Strukturmodells

Die experimentell bestimmten Strukturfaktor-Amplituden  $|F_{obs}|$  stimmen meistens nicht exakt mit den aus dem Strukturmodell berechneten Strukturfaktor-Amplituden  $|F_{calc}|$  überein. Aus diesem Grund wird im Zuge der Strukturverfeinerung das Modell so lange verändert, bis eine maximale Übereinstimmung erreicht ist. Als Maß für die Qualität des Modells dient dabei der kristallographische R-Faktor  $R_{cryst}$ , welcher die Übereinstimmung von  $|F_{obs}|$  mit  $|F_{calc}|$  darstellt:

$$R_{cryst} = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum_{hkl} |F_{obs}|} \quad (5)$$

Dabei zeigt ein kleiner werdender R-Faktor im Verlauf der Strukturverfeinerung eine Verbesserung des Modells an. Jedoch kann es auch zu einer Überverfeinerung kommen, d.h. zu einem Modell mit sehr niedrigem R-Faktor aber ohne physikalische Relevanz. Eine Vermeidungsstrategie ist die Berechnung des freien R-Faktors  $R_{free}$ . Hierzu werden zufällig 5 % der experimentellen Daten aus der Verfeinerung herausgenommen und mit diesen wird analog der  $R_{cryst}$  ermittelt (Brünger 1992). Der  $R_{free}$  liegt typischerweise etwa 2-5 % über dem  $R_{cryst}$ .

Die Verfeinerungszyklen werden so lange durchgeführt, bis sich die R-Faktoren nicht weiter reduzieren lassen. Die Größe der R-Faktoren ist unter anderem auch von der Auflösungsgrenze des Datensatzes abhängig und beträgt <25 % für gute und <20 % für sehr gute Strukturen.

### 1.3.8 Elektronendichtekarten

Um Abweichungen vom Strukturmodell zu den experimentell ermittelten Daten zu analysieren, wird eine Differenzkarte  $F_{obs} - F_{calc}$  verwendet. Hierzu werden die aus dem Strukturmodell berechneten Strukturfaktoramplituden  $F_{calc}$  von den experimentell bestimmten Strukturfaktoramplituden subtrahiert. Im Unterschied dazu zeigt die  $2F_{obs} - F_{calc}$  Dichtekarte, eine Kombination aus einer  $F_{obs}$  und einer  $F_{obs} - F_{calc}$  Dichtekarte, einen verringerten Einfluss des Strukturmodells. Dies bedeutet, dass die  $2F_{obs} - F_{calc}$  Dichtekarte besser der realen Elektronendichte im Kristall entspricht. Hierdurch lassen sich sowohl Bereiche erkennen, in denen die Elektronendichte falsch interpretiert wurde, als auch solche Bereiche, in denen die Elektronendichte noch nicht mit Atomen interpretiert wurde.

### 1.3.9 B-Faktor

Eine wichtige Größe bei der Beschreibung von Strukturdaten ist der Temperatur- oder B-Faktor. Er ist ein Maß für die atomare Bewegung und beschreibt die Abweichung eines Atoms von der mittleren Lage. Je größer der Faktor ist, desto schlechter ist das Atom in der experimentell bestimmten Elektronendichtekarte definiert. Der Grund für eine Abweichung kann statischer Natur sein, d.h. die Ursache liegt in leicht unterschiedlichen Konformationen des Proteins innerhalb der Elementarzellen, es kann aber auch eine dynamische Unordnung, beispielsweise in Folge flexibler Proteinregionen, hierfür verantwortlich sein.

### 1.3.10 Ramachandran-Plot

Ein weiteres Kriterium für die Überprüfung der Qualität des Strukturmodells ist der Ramachandran-Plot (Ramachandran *et al.* 1963). In diesem Diagramm ist die statistische Verteilung der Diederwinkel  $\phi$  und  $\psi$  im Rückgrat eines Proteins dargestellt. Abhängig von den verschiedenen Sekundärstrukturelementen eines Proteins sind nur bestimmte Winkelkombinationen möglich. Man unterscheidet deshalb hierbei zwischen erlaubten und verbotenen Bereichen. Auf diese Weise lässt sich überprüfen, ob sich die Polypeptidkette in einer physikalisch sinnvollen Konformation befindet. Zwar gibt es durch ungewöhnliche Faltungszustände und besondere Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren bedingte Ausnahmen, jedoch sollten bei einer guten Struktur mindestens 90 % der Aminosäurereste in den erlaubten Bereichen liegen.

## 1.4 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung des Umsatzes verschiedener Diterpen-Harzsäuren durch die bakteriellen Cytochrome P450 CYP105A1 und CYP106A2. Mit der Keto-Boswelliasäure (KBA) und der Abietinsäure wurden kürzlich verschiedene Terpenoide als neue Substrate des CYP106A2 beschrieben und charakterisiert (Bleif 2012). Wie in Voruntersuchungen herausgefunden wurde, zeigt das CYP105A1 aus *Streptomyces griseolus* ebenfalls eine Aktivität gegenüber der Abietinsäure.

Für detaillierte Analysen sollten die Enzyme zunächst exprimiert und gereinigt und mit verschiedenen *in vitro* Methoden in Bezug auf Bindung und Produktbildung der Harzsäuren charakterisiert werden. Zum Erkenntnisgewinn über die Mechanismen der Bindung potentieller Substrate standen außerdem analoge Vorläufer der Substanzen mit verschiedenen funktionellen Gruppen zur Verfügung. Ihre Untersuchung sollte die Identifizierung essentieller Struktur motive für potentielle Substrate ermöglichen. Da funktionalisierte Diterpenoide eine Vielzahl interessanter biologischer Eigenschaften aufweisen, wurde ein Hauptaugenmerk auf die Analyse der Enzymaktivität und Produkte zum Zweck der Evaluierung potentieller biotechnologischer Anwendungen gelegt. Für das CYP106A2 existiert bereits ein Ganzzellsystem für den Umsatz verschiedener Terpenoide. Im Rahmen dieser Arbeit sollte entsprechend ein System für den Ganzzellumsatz dieser Substrate mit CYP105A1 entwickelt werden. Neben der einfachen Herstellung ausreichender Produktmengen für NMR-analytische Zwecke stellt ein solches System den ersten Schritt zur biotechnologischen Nutzbarmachung des Enzyms dar.

Tieferegehende Untersuchungen sollten sich außerdem mit der interessanten Ausgangsposition beschäftigen, dass zwei unterschiedliche Cytochrome mit verhältnismäßig geringer Sequenzidentität (etwa 30 %) das gleiche Substrat umsetzen. Zur Aufklärung der molekularen Grundlagen der Abietinsäure-Bindung war deshalb ein weiteres Ziel der Arbeit die Strukturaufklärung der beiden Enzyme im substratgebundenen Zustand mittels Röntgenkristallographie. Dabei ist vor allem die Struktur des CYP106A2 von großem Interesse, das trotz langjähriger intensiver Studien bisher nicht kristallisiert werden konnte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien stammten, sofern nicht anders angegeben, aus Standardbezugsquellen und waren von analytischer Reinheit. Die Substanzbibliothek der Diterpenoide wurde dankenswerterweise von Herrn Prof. Jörg Bohlmann, Michael Smith Laboratories, University of British Columbia (Vancouver, Kanada) zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2 Enzyme und Proteine

Die Reinigung von boviner AdR und bovinem Adx<sub>4-108</sub> aus rekombinanten *E. coli* Bakterien erfolgte in der Arbeitsgruppe des Lehrstuhls durch Herrn Wolfgang Reinle und Frau Katharina Bompais, wie in Sagara *et al.* 1993 und Uhlmann *et al.* 1992 beschrieben.

#### 2.1.3 Antikörper

Die Antikörper gegen Arh1 und CYP105A1 stammten von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland). Der Etp1-Antikörper wurde von BioGenes (Berlin, Deutschland) hergestellt.

#### 2.1.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Eine Liste mit der Nukleotidsequenz und dem jeweiligen Verwendungszweck ist in Tabelle 2.1 aufgeführt.

**Tabelle 2.1:** Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Primer. Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind fett dargestellt, Start- und Stopp-Codons sind kursiv gedruckt und eingeführte Basenaustausche sind unterstrichen.

Bezeichnung	Beschreibung	Sequenz (5' → 3')
ETP1skfpBarFor	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Etp1skf mit <i>KpnI</i> -Schnittstelle	CCC <b>CGG TAC CAA</b> GAA GGA GAT ATA
ETP1skfpBarRev	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von Etp1 <sup>skf</sup> mit <i>EcoRI</i> -Schnittstelle sowie Deletion einer zweiten <i>EcoRI</i> -Schnittstelle	CCA TGG GTA CAG GTA TCA AA CCC <b>CGA ATT CCC</b> GGG TTA AGG <u>GAT</u> TCG TAC ACG GAT GCC ATC CAA
ArhpBarFor	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Arh1_A18G mit <i>NdeI</i> -Schnittstelle	GGG <b>CAT ATG</b> TCT ACT CAA ACT TCT
ArhpBarRev	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von Arh1_A18G mit <i>KpnI</i> -Schnittstelle	TCA CCT GTA GTC GGC ATC ATC GGT CCC <b>CGG TAC CTT</b> ATT TTT TAC CGG
SOE_for	Primer für die SOE-basierte PCR zur Amplifikation des Arh1_A18G/Etp1 <sup>skf</sup> -Konstrukts sowie Deletion einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle	GAT ATA TTA GTT TAA TC AAG AGA CTG GGA AT <u>C</u> CCA GGG GAG GAC TTG TCA GGT GTT TAT AGT GCG
SOE_rev	Primer für die SOE-basierte PCR zur Amplifikation des Arh1_A18G/Etp1 <sup>skf</sup> -Konstrukts sowie Deletion einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle	CAA GTC CTC CCC TGG <u>GAT</u> TCC CAG TCT CTT GTC CCC AGC AGC TCC ATA

### 2.1.5 Vektoren

Als *E. coli* Expressionsplasmide wurden pKKHC, pACYC, pTrc99A und pBar benutzt. Tabelle 2.2 gibt eine Übersicht über den jeweiligen Verwendungszweck der Vektoren.

**Tabelle 2.2:** Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pTrc99A	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , P <sub>trc</sub> , MCS, rrnB, Ap <sup>r</sup> , pMB1 ori, lacI <sup>q</sup>	Amman <i>et al.</i> 1988
pKKHC	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , P <sub>trc</sub> , MCS enthält u.a. <i>NcoI</i> und <i>HindIII</i> Erkennungssequenz, Ap <sup>r</sup> , pBR322 ori	Porter und Larson 1991
pACYC	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Cytochrom P450 ( <i>NcoI</i> , <i>HindIII</i> ), Cm <sup>r</sup>	Hannemann <i>et al.</i> 2006, vorliegende Dissertation
pBarTwin	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Ferredoxin-Reduktase ( <i>NdeI</i> , <i>KpnI</i> ) und Ferredoxin ( <i>KpnI</i> , <i>EcoRI</i> ), Ap <sup>r</sup>	Hannemann <i>et al.</i> 2006, vorliegende Dissertation
pBarTriple	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Insertion von <i>LbADH</i> in pBarTwin ( <i>EcoRI</i> , <i>Sall</i> ), Ap <sup>r</sup>	Bleif 2012, diese Arbeit
pSMF	Expressionsvektor für <i>B. megaterium</i>	Kleser 2011, Bleif 2012

### 2.1.6 Bakterienstämme

Für die Klonierungsarbeiten wurde der *E. coli* Stamm TOP10 verwendet. Die heterologe Expression der Proteine erfolgte in den Stämmen BL21 und JM109. Für die Ganzzellumsätze kam ebenfalls der Stamm JM109 zum Einsatz.

Der Ganzzellumsatz mit *B. megaterium* wurde im Stamm MS941 durchgeführt. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen ist in Tabelle 2.3 gegeben.

**Tabelle 2.3:** Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen.

<i>E. coli</i>	Genotyp	Referenz
JM109	<i>F' traD36 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV44 e14<sup>-</sup> gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i>	NEB (2010)
BL21	F- ompT hsdS(r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -) gal dcm	Novagen Katalog 2006/2007
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG	Invitrogen (2010)
<i>B. megaterium</i>	Genotyp	Referenz
MS941	Mutante von DSM319, Δ <i>nprM</i>	Wittchen und Meinhardt 1995
MS941 MK-0	MS941, transformiert mit pSMF	Kleser 2011
MS941 MK-1	MS941, transformiert mit pSMF-CYP105A1wt	Kleser 2011

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische und gentechnische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von Zellen

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in Nährbouillon (NB), Luria-Bertani (LB) und Terrific Broth (TB) Flüssigmedien bei 37 °C und einem Schüttelradius von ¼ Zoll. Zur Selektion wurden die Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol in Konzentrationen von 100 µg/ml bzw. 50 µg/ml eingesetzt. Für die kurz- bis mittelfristige Lagerung wurden die Zellen auf NB-Agarplatten ausgestrichen und bei 4° C aufbewahrt. Die Lagerung der Zellen über einen längeren Zeitraum erfolgte in Aliquots zu 1 ml in sterilen Kryoröhrchen bei -80 C°. Hierzu wurde eine frische Flüssigkultur zunächst mit 87 % Glycerin im Verhältnis 1:1 gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefrostet.

Zur Kultivierung von *Bacillus megaterium* wurde ein Komplexmedium bestehend aus Hefeextrakt (24 g), Soyton (12 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (12,54 g), KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,31 g) und Glycerin (4 ml) in destilliertem Wasser (1000 ml) bei einer Anzuchttemperatur von 30 °C verwendet. Für die Selektion wurde das Antibiotikum Tetracyclin in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Die Lagerung der Zellen erfolgte wie bei *E. coli*.

#### 2.2.1.2 Bestimmung der optischen Dichte

Die spektroskopische Bestimmung des Zellwachstums in den Flüssigkulturen erfolgte über die Messung der optischen Dichte der Kulturen gegen unbeimpftes Kulturmedium im Zweistrahlphotometer (UV-2101 PC, Shimadzu, Kyoto, Japan). Die *E. coli*-Kulturen wurden bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) vermessen, im Fall von *B. megaterium* erfolgte die Messung bei 578 nm (OD<sub>578</sub>).

#### 2.2.1.3 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen und deren Transformation

Die Herstellung von chemisch- und elektrokompetenten *E. coli* Zellen sowie deren Transformation erfolgten nach Standard-Protokollen basierend auf den Methoden von Sambrook (Sambrook und Russell 2001). Für die Klonierungsarbeiten wurde der *E. coli* Stamm TOP10 verwendet, bei dem die Transformation mittels Elektroporation durchgeführt wurde. Im Fall der Bakterienstämme BL21 und JM109, welche sowohl für die heterologe Proteinexpression als auch für die Ganzzellumsätze benutzt wurden, erfolgte die Transformation über die Hitzeschockmethode.

#### 2.2.1.4 Plasmidpräparation und Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus den *E. coli* Zellen wurde unter Verwendung des *NucleoSpin Plasmid QuickPure* oder *NucleoBond Plasmid Purification AX 100 kit* der Firma Macherey-Nagel

(Düren, Deutschland) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum der stickstoffhaltigen DNA Basen. In erster Näherung entspricht eine Absorption von 1 hierbei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook und Russell 2001).

### 2.2.1.5 PCR zur Amplifikation der Gene

Die für die Klonierung der Vektoren des Ganzzellsystems benötigten Gene (*Etp1<sup>skf</sup>*, *Arh1* und *CYP105A1*) wurden mittels PCR unter Anwendung spezifischer Primer aus den entsprechenden Expressionsplasmiden amplifiziert (Bureik *et al.* 2002, Ewen *et al.* 2008, Kleser *et al.* 2012). Für die PCR-Ansätze wurden die *Pfu*-Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) und folgendes Pipettierschema verwendet:

1,0 µl	Template DNA (10 ng/µl)
10,0 µl	Puffer HF (5x)
2,0 µl	dNTPs (5 mM)
2,5 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)
2,5 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)
0,5 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase (2 U/µl)
31,5 µl	ddH <sub>2</sub> O

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s	1
Denaturierung	95 °C	10 s	35
Anlagern	65 °C	45 s	
Verlängerung	72 °C	60 s	
Finale Verlängerung	72 °C	10 min	1
Ende	10 °C	Unendlich	1

### 2.2.1.6 Ortsgerichtete Mutagenese

Um gezielt Nukleotidaustausche in die Plasmide einzuführen, wurde eine ortsgerechte Mutagenese nach dem Protokoll des *QuikChange<sup>TM</sup> site directed mutagenesis kit* (Stratagene, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Hierzu wurde die *Phusion* Polymerase (Finnzymes, Vantaa, Finnland) eingesetzt und folgendes Pipettierschema und PCR-Programm angewendet:

10,0 µl	Template DNA (5-20 ng/µl)
4,0 µl	Puffer (5x)
2,0 µl	dNTPs (5 mM)
1,0 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)
1,0 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)
1,0 µl	<i>Phu</i> -Polymerase
1,0 µl	ddH <sub>2</sub> O

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	2 min	1
Denaturierung	98 °C	30 s	17
Anlagern	68 °C	1 min	
Verlängerung	72 °C	10 min	
Finale Verlängerung	72 °C	10 min	1
Ende	10 °C	Unendlich	1

### 2.2.1.7 SOE-basierte PCR zur Herstellung von pBar\_Triple\_pombe

In der vorliegenden Arbeit wurde nur mit der Mutante Arh1A18Ghis gearbeitet (Ewen 2009), die im Folgenden zur Vereinfachung als Arh1 bezeichnet wird.

Zur Entfernung einer unerwünschten *EcoRI*-Schnittstelle innerhalb der Sequenz von Arh1 wurde für die Herstellung des Vektors pBar\_Triple\_pombe eine *splicing by overlapping extension* (SOE)-basierte PCR-Methode angewendet. Hierzu wurden mit den unter Punkt 2.2.1.5 angegebenen Bedingungen und dem Vektor pBar\_Twin\_pombe zunächst zwei lineare Fragmente mit den Primer-Paaren ArhpBarFor/SOE\_rev und SOE\_for/ETP1skfpBarRev amplifiziert. Diese Fragmente wurden in einer zweiten PCR zusammen mit dem Primer-Paar ArhpBarFor/ETP1skfpBarRev eingesetzt und ergaben die lineare cDNA von Arh1 und Etp1, die unter Verwendung der *NdeI* und *EcoRI*-Schnittstellen in den Vektor pBar-Triple kloniert wurde.

### 2.2.1.8 Agarosegelelektrophorese und Reisolation der DNA-Fragmente

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 1 %igen Agarosegelen. Für die Isolierung der DNA wurde das *NucleoSpin Extract 2 in 1 kit* der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet.

### 2.2.1.9 Restriktionsverdau und Ligation

Die für die Klonierung und zur Überprüfung der ortsgerichteten Mutagenese verwendeten Restriktionsendonukleasen stammten von Promega (Madison, WI, USA) und New England BioLabs Inc. (Ipswich, MA, USA) und wurden gemäß Herstellerangaben eingesetzt.

Nach der Inkubation der DNA-Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsenzymen erfolgte die Ligation unter Verwendung des *FastLink™ DNA Ligation kit* von Epicentre (Madison, WI, USA) mit folgendem Inkubationsschema:

Temperatur	Zeit
16 °C	15 min
20 °C	15 min
70 °C	15 min
4 °C	Unendlich

### 2.2.1.10 DNA Sequenzierung

Um die Basenabfolge der DNA-Konstrukte zu überprüfen, wurden die Plasmide bzw. Inserts sequenziert. Dies erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland). Zur Auswertung der Sequenzierdaten wurde die Software *Chromas Lite 2.01* (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australien) benutzt.

## 2.2.2 Proteinexpression und -reinigung

### 2.2.2.1 Proteinexpression

Die heterologe Proteinexpression erfolgte in frisch transformierten *E. coli* Zellen des Stammes JM109 (CYP105A1, CYP106A2, Arh1) oder BL21 (Etp1<sup>skf</sup>). Mit den Zellen wurde zunächst eine Vorkultur in 50 ml LB Flüssigmedium und dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 Upm im Schüttelinkubator (Innova 4230, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) inkubiert. Die jeweilige Hauptkultur wurde mit 1/100 Volumen der Vorkultur beimpft und ebenfalls bis zum Erreichen der spezifischen OD<sub>600</sub> bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch die Zugabe von IPTG. Für die Expression von CYP105A1 und CYP106A2 wurde dem Kulturmedium außerdem zur gleichen Zeit das Häm-Vorläufermolekül  $\delta$ -Aminolävulinsäure in einer Konzentration von 0,5 mM hinzugegeben. Nach dem Ende der Expressionszeit erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation der Kulturen bei 4000g für 20 min. Die Zellen mit den für die Kristallisationsexperimente exprimierten Proteinen wurden direkt weiterverarbeitet, andernfalls erfolgte die Lagerung der Bakterienpellets bei -20 °C. Die jeweiligen Expressionsbedingungen der einzelnen Proteine sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

**Tabelle 2.4:** Expressionsbedingungen der Proteine.

Protein	CYP105A1	CYP106A2	Arh1	Etp1 <sup>skf</sup>
Temperatur	25 °C	30 °C	30 °C	37 °C
Expressionsdauer	42 h	48 h	72 h	24 h
Medium	TB ohne Glycerin	TB	TB	NB
Kulturvolumen	1 l	300 ml	250 ml	1 l
Kolbenart	2 l Erlenmeyer	Fernbach	2 l Schikane	2 l Erlenmeyer
Induktions-OD	0,9	0,8	0,9	0,9
Schütteldrehzahl	200 Upm	200 Upm	150 Upm	200 Upm
$\delta$ -Ala-Konz.	0,5 mM	0,5 mM	---	---
IPTG-Konz.	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
<i>E. coli</i> -Stamm	JM109	JM109	JM109	BL21
Vektor	pKKHC	pKKHC	pTrc99A	pTrc99A
Referenz	Kleser 2011	Lisurek 2004	Ewen <i>et al.</i> 2008	Schiffler <i>et al.</i> 2004

### 2.2.2.2 Zellaufschluss

Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit dem Ultraschallhomogenisator Sonoplus H3200 der Firma Bandelin (Berlin, Deutschland) unter der Verwendung der Sonode TT13. Die Zellen wurden hierfür zunächst im jeweiligen Lysepuffer resuspendiert und mit 1 mM (Endkonzentration) des Serin-Proteaseinhibitors PMSF versetzt. Die anschließende Ultraschallbehandlung erfolgte unter ständiger Kühlung und stetigem Rühren für 15 min mit einer Pulsdauer von 15 s und einer Ratio von 1 bei 15 % Amplitude. Nach erneuter Zugabe von PMSF wurde das Lysat für 35 min bei 35.000 Upm (Ultrazentrifuge Hitachi himac CP75 $\beta$ , Rotor P45) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den heterolog exprimierten Proteinen wurde den nachfolgend beschriebenen chromatographischen Reinigungsschritten unterzogen.

### 2.2.2.3 Proteinreinigung

Die Zusammensetzung der für die Zellyse und Proteinreinigung verwendeten Puffer ist in Tabelle 2.5 angegeben. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4 °C mit Hilfe eines Äkta Prime Chromatographiesystems (Pharmacia, GE Healthcare) durchgeführt, wobei der Verlauf durch die Aufzeichnung der UV-Absorption bei 280 nm verfolgt wurde. Tabelle 2.6 gibt einen Überblick der unterschiedlichen Reinigungsschritte der einzelnen Proteine. Die sukzessive Konzentrierung der Zielproteine wurde nach jedem Chromatographieschritt anhand des jeweiligen Reinheitsindex (Q-Wert) bewertet (siehe Abschnitt 2.2.3.1).

**Tabelle 2.5:** Übersicht der Zusammensetzung der bei der Zellyse und chromatographischen Proteinreinigung verwendeten Puffer.

<b>Arh1</b>	
Lyse-/Waschpuffer	20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
Elutionspuffer	50 mM Natriumacetat, 300 mM NaCl, pH 4,0
Verdünnungspuffer	100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4
Laufpuffer SEC	50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4
<b>Etp1<sup>skf</sup></b>	
Lysepuffer	20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4
Waschpuffer IEX	20 mM Tris/HCl, pH 7,5
Elutionspuffer IEX	20 mM Tris/HCl, 400 mM NaCl, pH 7,5
Laufpuffer SEC	50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4
<b>CYP106A2</b>	
Lysepuffer	20 mM Tris, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, pH 8,0
Waschpuffer IEX	20 mM Tris, 0,1 mM DTT, pH 7,5
Elutionspuffer IEX	20 mM Tris, 400 mM NaCl, 0,1 mM DTT, pH 7,5
Waschpuffer HAP	10 mM Kaliumphosphat-Puffer, 0,1 mM DTT, pH 7,4
Elutionspuffer HAP	100 mM Kaliumphosphat-Puffer, 0,1 mM DTT, pH 7,4
Laufpuffer SEC	50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4

## Fortsetzung Tabelle 2.5

CYP105A1	
Lyse-/Waschpuffer (Cobalt)	20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,4
Elutionspuffer (Cobalt)	20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 130 mM Imidazol, pH 7,4
Lyse-/Waschpuffer (Ni-NTA)	50 mM Kaliumphosphat-Puffer, 300 mM NaCl, pH 7,4
Elutionspuffer (Ni-NTA)	50 mM Kaliumphosphat-Puffer, 300 mM NaCl, 40 mM Histidin, pH 7,4
Laufpuffer SEC	50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4

**Tabelle 2.6:** Übersicht der für die jeweiligen Proteine angewandten Chromatographie-Methoden zur Reinigung.

CYP105A1	CYP106A2	Arh1	Etp1 <sup>skf</sup>
IMAC (Cobalt/Nickel) SEC	IEX SEC HAP-Chromatographie	IMAC (Cobalt) SEC	IEX SEC

**Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)**

Im Falle der mit einem Histidin-*tag* exprimierten Proteine CYP105A1 und Arh1 bestand der erste Reinigungsschritt in einer Affinitätschromatographie mit dem *TALON™ Metal Affinity Resin* der Firma Clontech (Mountain View, CA, USA). Hierzu wurde das Zelllysate nach der Ultrazentrifugation mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die zuvor mit drei Säulenvolumina des jeweiligen Waschpuffers äquilibrierte IMAC-Säule geladen. Es folgte das Spülen mit Waschpuffer bis die UV-Absorption wieder die Basislinie erreicht hatte. Für die Elution der Proteine wurde im Fall von CYP105A1 ein imidazolhaltiger Elutionspuffer verwendet. Im Unterschied dazu erfolgte die Elution von Arh1 über die Erniedrigung des pH-Wertes. Die Fraktionen wurden jeweils zu 3 ml gesammelt, wobei im Falle der pH-Elution ein gleiches Volumen an Verdünnungspuffer vorgelegt wurde, um das Protein möglichst kurz den für die Elution nötigen niedrigen pH-Werten auszusetzen. Anschließend erfolgte die spektroskopische Untersuchung der Fraktionen. Nach der Vereinigung der Fraktionen mit dem gewünschten Protein wurden diese durch Zentrifugation bei 4000g und 4 °C in *Amicon Ultra-15* Zentrifugeneinheiten (Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland) mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa auf ein Volumen von 0,5 - 1 ml eingengt.

Für die Kristallisationsexperimente erfolgte die Reinigung von CYP105A1 über *Protino Ni-NTA Agarose* von Machery-Nagel (Düren, Deutschland). Da Imidazol an der Hämgruppe von Cytochromen P450 binden kann, was ein mögliches Hindernis bei der Ko-Kristallisation mit Substrat ist, wurde das Protein mit Histidin in einer Konzentration von 40 mM eluiert.

**Ionenaustauschchromatographie (IEX, *ion exchange chromatography*)**

Der erste Reinigungsschritt bei den nicht mit einem Affinitäts-*tag* exprimierten Proteinen CYP106A2 und Etp1<sup>skf</sup> bestand in einer Ionenaustauschchromatographie mit der Anionenmatrix *Source Q30* (GE Healthcare). Hierzu erfolgte zunächst die Äquilibrierung der Säule mit drei Säulenvolumen

Waschpuffer. Nach dem Beladen der Säule mit dem Zellysat unter einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min erfolgte ein Waschschriff mit dem dreifachen Säulenvolumen an Waschpuffer. Die Elution der Proteine erfolgte jeweils über einen Gradienten mit ansteigender Natriumchlorid-Konzentration wie in Tabelle 2.7 gezeigt. Die Proteine wurden in Fraktionen zu 3 ml gesammelt und photometrisch vermessen. Diejenigen Proben mit einem geeigneten Reinheitsindex wurden vereinigt und mit Zentrifugenfiltern wie oben beschrieben eingeeengt.

**Tabelle 2.7:** Übersicht der Elutionsgradienten von Etp1<sup>skf</sup> und CYP106A2 für die Anionenaustauschchromatographie.

Etp1 <sup>skf</sup>		CYP106A2	
Elutionsvolumen [ml]	Elutionspuffer [%]	Elutionsvolumen [ml]	Elutionspuffer [%]
20	0	20	0
40	20	30	10
80	50	100	50
120	80	130	50
150	100	150	100
200	100	200	100

### Größenausschluss-Chromatographie (SEC, size exclusion chromatography)

Der zweite Schritt bei der Reinigung aller Proteine bestand in einer Größenausschluss-Chromatographie mit dem Säulenmaterial *Superdex 75 prep grade* (GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland). Hierzu wurde die auf 0,5 - 1 ml eingeeengte Probe manuell mittels Pipette auf die Säule geladen und anschließend mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min mit 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) getrennt. Nach der spektroskopischen Ermittlung der Reinheitsindizes wurden die geeigneten Fraktionen vereinigt, konzentriert und bei -20 °C gelagert bzw. im Fall von CYP105A1 sofort für die Kristallisation eingesetzt.

### Hydroxylapatit-Chromatographie (HAP)

Der letzte Reinigungsschritt für das CYP106A2 bestand in einer HAP-Chromatographie mit Hydroxylapatit der Firma BioRad (Hercules, CA, USA). Die nach der Größenausschluss-Chromatographie erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt und mit einem 1:1 Gemisch aus Waschpuffer und destilliertem Wasser 5-fach verdünnt. Das Beladen der Säule erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 1,5 ml/min. Nach einem Waschschriff mit dem dreifachen Säulenvolumen Waschpuffer und einem Gradienten von 0-40 % Elutionspuffer erfolgte die Elution des Proteins durch Erhöhung des Gradienten auf 80 % Elutionspuffer. Nach dem Einengen der Proteinfaktionen mit ausreichendem Reinheitsindex und dem Einstellen auf die gewünschte Konzentration wurde das Protein entweder direkt für die Kristallisationsexperimente eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

## 2.2.3 Biochemische und biophysikalische Methoden

### 2.2.3.1 UV/vis-Spektroskopie

Die Aufnahme von Absorptionsspektren der Proteine im UV/Vis Bereich erfolgte an einem UV-2101PC Zweistrahlphotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Dabei wurden die Proteine gegen den jeweiligen Puffer in einem Wellenlängenbereich von 200 – 700 nm vermessen. Als Maß für den Reinheitsgrad der Proteine wurde der Q-Wert bestimmt, der als Quotient aus der allgemeinen Proteinabsorption bei 276 nm und der jeweils spezifischen Absorption bei der für das entsprechende Protein typischen Wellenlänge definiert ist. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte über das Lambert-Beer'sche Gesetz mit den jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten. Die Quotienten zur Berechnung der Q-Werte sowie die Extinktionskoeffizienten der Proteine sind in Tabelle 2.8 zusammengefasst.

**Tabelle 2.8:** Berechnung der Q-Werte und zur Konzentrationsbestimmung der Proteine eingesetzte Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit gereinigten Proteine.

Protein	Q-Wert	Extinktionskoeffizient [ $M^{-1} cm^{-1}$ ]
Cytochrom P450 (CYP105A1 und CYP106A2)	$A_{417nm}/A_{276nm}$	$\epsilon_{450nm}=91.000^{*1}$
Reduktase (Arh_A18G)	$A_{276nm}/A_{450nm}$	$\epsilon_{450nm}=11.300^2$
Ferredoxin (Etp1 <sup>skf</sup> )	$A_{415nm}/A_{276nm}$	$\epsilon_{415nm}=9.800^3$

\*Die Konzentrationsbestimmung der Cytochrome erfolgte im reduzierten Komplex mit CO bei einer Wellenlänge von 450 nm, wie unten beschrieben. Referenzen: <sup>1</sup>Omura und Sato 1963, <sup>2</sup>Ewen *et al.* 2008, <sup>3</sup>Schiffler *et al.* 2004.

### 2.2.3.2 COD-Spektren

Die Aufnahme von CO-Differenzspektren erfolgte nach der Methode von Omura und Sato (Omura und Sato 1964b). Hierzu wurde die Proteinlösung im Verhältnis 1:200 in Puffer verdünnt (CYP106A2: 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, CYP105A1: 1 M Kaliumphosphat-Puffer, beide pH 7,4) und durch Zugabe einer Spatelspitze Natriumdithionit reduziert. Anschließend wurde die Probe auf zwei Küvetten aufgeteilt, wobei eine Probe als Referenz diente, während die andere für 30 s mit einer Geschwindigkeit von 2 Blasen/Sekunde mit CO begast wurde. Danach erfolgte die Aufnahme eines Differenzspektrums mit dem Zweistrahlphotometer.

### 2.2.3.3 Substratinduzierte Differenzspektroskopie

Substratinduzierte Differenzspektren wurden wie von Jefcoate (Jefcoate 1978) beschrieben aufgenommen. Es wurden Tandem-Quarzküvetten verwendet, die jeweils in einer Kammer 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) enthielten und in der anderen zusätzlich zum Puffer das entsprechende Cytochrom in einer Konzentration von 5  $\mu$ M. Zu der proteinhaltigen Probe in der Messküvette sowie dem Puffer in der Referenzküvette wurden Aliquots einer 100  $\mu$ M Substratlösung

pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens an Lösemittel zu der proteinhaltigen Probe der Referenzküvette sowie dem Puffer in der Messküvette, und nach 2 Minuten wurde ein Spektrum aufgenommen.

#### 2.2.3.4 Bestimmung der Dissoziationskonstanten $K_d$

Die Ermittlung der Dissoziationskonstanten der einzelnen Substrate zu CYP105A1 und CYP106A2 erfolgte durch Substrattitration über Typ-I-Spektren. Hierzu wurde zunächst wie unter Punkt 2.2.3.3 beschrieben verfahren. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug 3  $\mu\text{M}$  im Fall von CYP105A1 und 5  $\mu\text{M}$  im Fall von CYP106A2. Die jeweiligen Substrate wurden in steigender Konzentration hinzu pipettiert. Zwischen den einzelnen Substratzugaben und der Messung lagen immer zwei Minuten. Die Ermittlung der Dissoziationskonstanten  $K_d$  erfolgte durch die Auftragung der Konzentration gegen die  $\Delta$  Absorptionswerte ( $A_{(\text{high spin Zustand})} - A_{(\text{low spin Zustand})}$ ) und anschließender hyperbolischer Regression ( $f(x) = y_0 + ax/(b + x)$ ) mit dem Rechenprogramm *Origin 8.5* (OriginLab Corporation, MA, USA). Lag der  $K_d$ -Wert im gleichen oder unter dem Konzentrationsbereich des eingesetzten Proteins, wurde mit einer quadratischen Gleichung für die Beschreibung fester Bindungen gefittet:  $A_{\text{obs}} = (A_{\text{max}}/(2E_t))(S + E_t + K_d) - (((S + E_t + K_d)^2 - 4SE_t)^{0,5})$  (Murataliev und Feyereisen 2000).

#### 2.2.3.5 Cytochrom P450 abhängiger *in vitro* Substratumsatz

Zur Überprüfung des Substratumsatzes wurde ein *in vitro* Aktivitätstest mit den beiden Cytochromen durchgeführt. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tabelle 2.9 aufgeführt.

**Tabelle 2.9:** Zusammensetzung der *in vitro* Substratumsätze mit den Cytochromen CYP105A1 und CYP106A2.

CYP105A1		CYP106A2	
P450	1 $\mu\text{M}$	P450	0,5 $\mu\text{M}$
Etp1 <sup>skf</sup>	20 $\mu\text{M}$	Adx <sub>4-108</sub>	10 $\mu\text{M}$
Arh1	3 $\mu\text{M}$	AdR	1 $\mu\text{M}$
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Glucose-6-Phosphat	5 mM	Glucose-6-Phosphat	5 mM
G6P-Dehydrogenase	1 U	G6P-Dehydrogenase	1 U
Substrat	100 $\mu\text{M}$	Substrat	100 $\mu\text{M}$
NADPH	1 mM	NADPH	100 $\mu\text{M}$
Puffer (50 mM Kaliumphosphat- Puffer + 0.05 % Tween 20, pH 7,4)	ad 500 $\mu\text{l}$	Puffer (50 mM Kaliumphosphat- Puffer + 0.05 % Tween 20, pH 7,4)	ad 500 $\mu\text{l}$

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von NADPH gestartet und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 30 °C mit 500  $\mu\text{l}$  Ethylacetat gestoppt. Es folgte eine zweifache Extraktion der Proben mit Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen wurden bis zur Trockne an einem Vakuum-Konzentrator eingedampft und entweder für die HPLC-Untersuchung in 200  $\mu\text{l}$  Fließmittel

(Methanol/Wasser 80:20) oder für die DC-Untersuchung in 20 µl mobiler Phase (Hexan/Ethylacetat 70:30) resuspendiert.

### 2.2.3.6 Bestimmung der Enzymaktivität

Zur Bestimmung der Enzymaktivität von CYP105A1 gegenüber den Substraten Abietinsäure, Dehydroabietinsäure und Isopimarsäure wurde das unter Punkt 2.2.3.5. beschriebene rekonstituierte *in vitro* System verwendet. Im Unterschied dazu betrug das Reaktionsvolumen der einzelnen Ansätze jedoch lediglich 250 µl und die Enzymkonzentrationen wurden auf 0,5 µM CYP105A1, 5 µM Etp1<sup>skf</sup> und 1,5 µM Arh1 halbiert. Die eingesetzten Substratkonzentrationen lagen zwischen 1-40 µM (Abietinsäure) oder 2-100 µM (Dehydroabietinsäure und Isopimarsäure). Die Reaktionsdauer für die Umsätze mit Abietinsäure betrug 1 Minute und für Dehydroabietinsäure sowie Isopimarsäure 3 Minuten. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte wie unter Punkt 2.2.3.5 beschrieben. Jede Reaktion wurde dreimal durchgeführt und die Daten wurden nach erfolgter HPLC-Analyse mittels hyperbolischer Regression mit der Software *Origin 8.5* ausgewertet und hieraus die Kenngrößen der Michaelis-Menten Kinetik bestimmt.

### 2.2.3.7 Ganzzellumsatz

#### ***B. megaterium:***

Eine 50 ml Vorkultur in 300 ml Schikanekolben wurde mit dem Aliquot eines Glycerinstocks von *B. megaterium* MS941 MK-1 (Kleser *et al.* 2012) angeimpft. Die Inkubation der Zellen erfolgte über Nacht bei 30 °C und 180 Upm. Die Hauptkultur wurde mit 1/100 Volumen der Vorkultur angeimpft, und die Induktion der Proteinexpression erfolgte beim Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0,4 mit 5 mg/ml Xylose. Nach einer Expressionszeit von 24 Stunden erfolgte die Substratzugabe entweder direkt oder nach Zentrifugieren der Zellen bei 4000g und anschließender Resuspendierung im gleichen Volumen 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4. Zur Produktisolierung wurde die Kultur zweimal mit Ethylacetat extrahiert.

#### ***E. coli:***

Chemisch kompetente *E. coli* JM109 Zellen wurden mit den Plasmiden pACYC\_CYP105A1 und pBar\_Twin\_pombe bzw. pBar\_Triple\_pombe kotransformiert und auf Agarplatten ausgestrichen. Für die Vorkultur wurden 50 ml TB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Chloramphenicol) in 300 ml Schikanekolben mit einer einzelnen Kolonie oder dem Aliquot eines Glycerinstocks angeimpft und für 16 h bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur (250 ml TB-Medium und die entsprechenden Antibiotika in einem 2 l Schikanekolben) mit 1/100 Volumen der Vorkultur angeimpft und ebenfalls bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Sobald die optische Dichte der Kultur den Wert 0,6 erreicht hatte, wurde die Proteinexpression durch die Zugabe von IPTG

gestartet. Zeitgleich wurde die Hämvorstufe  $\delta$ -Ala in einer Endkonzentration von 0,5 mM zur Kultur gegeben und die Temperatur wurde auf den für das jeweilige Experiment benötigten Wert abgesenkt. Nach der in den verschiedenen Experimenten festgelegten Expressionszeit erfolgte die Zugabe des Peptidantibiotikums Polymyxin B und des Substrats. Für die Substratumsätze mit ruhenden Zellen wurden die Kulturen bei 4000g pelletiert, in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) resuspendiert und anschließend analog zu den Umsätzen in wachsenden Zellen behandelt. Um den Verlauf der Reaktion verfolgen zu können, wurden in regelmäßigen Abständen Proben von 500  $\mu$ l genommen, die wie unter Punkt 2.2.3.5 beschrieben mit Ethylacetat extrahiert und mittels HPLC oder DC analysiert wurden.

### 2.2.3.8 SDS-Gelelektrophorese

Die Überprüfung der Reinheit der Proteine erfolgte über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in 12 % denaturierenden Gelen nach Laemmli (Laemmli 1970). Hierfür wurde eine vertikale *Mighty Small II SE 250* Elektrophoresekammer (Hoefer Scientific Instruments, Holliston, MA, USA) benutzt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 100 °C denaturiert. Die Trennung erfolgte bei 20 mA. Zur Färbung der Gele wurde der Farbstoff Coomassie Blue R250 verwendet und als Größenstandard diente der Protein-Marker IV der Firma pepLab (Erlangen, Deutschland). Die Zusammensetzungen der eingesetzten Puffer und Gele sind im Anhang aufgeführt.

### 2.2.3.9 Western Blot

Zum Nachweis der Proteinexpression wurden Aliquots der Kultur genommen und bei 4000g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Pellets wurden mit 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) auf eine Konzentration von 30 g/l Feuchtzellmasse eingestellt. Danach erfolgte der Aufschluss der Zellen wie unter Punkt 2.2.2.2 beschrieben. Die Zelltrümmer wurden durch erneute Zentrifugation (15 Minuten, 10.000g, 4 °C) abgetrennt und das Lysat 1:1 mit SDS-Probenpuffer verdünnt. Mit 10  $\mu$ l dieser Lösungen wurde eine Gelelektrophorese in 12 % Acrylamid-Gelen, wie unter Punkt 2.2.3.8 beschrieben, durchgeführt.

Für die Western Blot-Analyse wurden die Gele auf *hybond-ECL* Nitrocellulose-Membranen (Amersham, GE Healthcare, England) übertragen. Die Membranen wurden über Nacht mit 3 % Milchpulver in 30 ml TBS (50 mM Tris-Cl pH 7,5, 400 mM NaCl, 0,15 % Tween 20) inkubiert. Nach drei Waschschritten in 30 ml TBS für 15 Minuten erfolgte die Inkubation der Membran mit dem entsprechenden primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in 30 ml TBS für 2 Stunden. Vor der Zugabe des sekundären Antikörpers wurde die Membran erneut dreimal in 30 ml TBS (15 Minuten) gewaschen. Der sekundäre Meerrettich-Peroxydase gekoppelte Ziege anti-Kaninchen-

Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark) wurde 1:3000 in 30 ml PBS (10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4, 150 mM NaCl) verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurden die Membranen dreimal mit PBS gewaschen. Die Antigen-Antikörper-Konjugate wurden durch die Zugabe von 4-Chloro-1-Naphthol (2 ml, 3 mg/ml in Ethanol) in 25 ml PBS mit 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sichtbar gemacht.

#### 2.2.3.10 Semipräparative HPLC zur Produktreinigung

Die Herstellung größerer Mengen der Produkte für die folgenden NMR-Untersuchungen erfolgte entweder in *B. megaterium* oder in *E. coli* Zellen wie unter Punkt 2.2.3.7 beschrieben in einem Kulturvolumen von 500 ml. Nach einer Umsatzzeit von 24 Stunden wurde die Kultur zweimal mit 500 ml Ethylacetat extrahiert und die organische Phase im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft. Die Produktreinigung erfolgte an einer HPLC der 2000er Baureihe Jasco (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) mittels einer Nucleodur 100-5 C18 250 mm x 8 mm Säule (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) mit einer Fließgeschwindigkeit von 3 ml/min bei 40 °C. Als Fließmittel diente Methanol/Wasser im Verhältnis 85:15 mit 0,1 % Essigsäure. Die entsprechenden Produktfraktionen wurden über einen CHF122SB-Fraktionssammler der Firma Advantec (Dublin, CA, USA) gesammelt, vereinigt, am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft und mittels NMR-Spektroskopie untersucht.

#### 2.2.3.11 HPLC/DC Analytik

Die HPLC-Analysen wurden an einem Jasco System der 2000er Baureihe (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) durchgeführt. Für die Trennung der Substanzen wurde eine Nucleodur 100-3 C18 125 mm x 4 mm Säule (Machery-Nagel) verwendet. Als Fließmittel diente Methanol/Wasser im Verhältnis 80:20 mit 0,05 % Essigsäure. Das Wasser wurde über eine MilliQ Biocel Anlage (Millipore, Bedford, MA, USA) gereinigt und die mobile Phase wurde vor der Anwendung entgast. Die Geschwindigkeit des Fließmittels betrug 1 ml/min, und die Säulentemperatur wurde auf 40 °C eingestellt. Die Detektion der Substanzen erfolgte bei 240 bzw. 210 nm. Es wurde ein Probenvolumen von 50  $\mu$ l injiziert und die Chromatogramme wurden über einen Zeitraum von 20 Minuten aufgenommen.

Einige der untersuchten Substanzen besitzen aufgrund des Fehlens konjugierter Doppelbindungen kein Absorptionsmaximum im UV/Vis Bereich. Die Analyse dieser Stoffe erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC). Hierzu wurden die Analyten auf eine 4 cm x 8 cm Kieselgel-Platte (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) aufgetragen. Die Trennung erfolgte in einem Lösemitteltank mit einem Gemisch aus Hexan/Ethylacetat im Verhältnis 70:30 mit 1 % Essigsäure als mobile Phase. Zur Detektion wurden die DC-Platten in einem Anisaldehyd Tauchbad (2 % 4-Methoxybenzaldehyd in Essigsäure/Schwefelsäure/Ethanol 1,5:5:93,5) angefärbt und anschließend mit einem Heißluftfön erhitzt.

### 2.2.3.12 Massenspektrometrie mittels MALDI-TOF/TOF

Das Massenspektrum von CYP106A2 wurde an einem ProteomicsAnalyzer 4800™ MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer von Applied Biosystems (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) am Institut für technische Biochemie der Universität des Saarlandes aufgenommen. Für die Messung wurde ein einzelner Kristall gefischt, der in 10 mM HEPES-Puffer gewaschen und gelöst wurde. Anschließend erfolgte die Zentrifugation mit 10.000g für 30 min bei 4 °C in *Amicon Ultra-0.5* Zentrifugeneinheiten (Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa zur Entfernung von PEG-Rückständen. Als Matrix bei der Messung diente Sinapinsäure.

### 2.2.3.13 NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Josef Zapp (Institut für pharmazeutische Biologie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken) durchgeführt. Die NMR-Spektren wurden mit einem Bruker DRX 500 NMR Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) in CDCl<sub>3</sub> aufgenommen. Alle chemischen Verschiebungen sind auf der Standard  $\delta$ -Skala in parts per million relativ zu CHCl<sub>3</sub> bei  $\delta_H = 7.24$  ppm und  $\delta_C = 77.00$  ppm angegeben. Die 2D NMR Spektren wurden als gs-HH-COSY, gs-NOESY, gs-HSQC und gs-HMBC aufgezeichnet.

### 2.2.3.14 Docking-Studien

Das Substratdocking erfolgte mit der Kristallstruktur des CYP105A1 aus *Streptomyces griseolus* (PDB Eintrag 2ZBX). Die vier in der Struktur nicht definierten Aminosäurereste wurden mit Hilfe des SWISS-Model Servers modelliert. Die Experimente wurden mit AUTODOCK Version 4.00 (Morris *et al.* 1998, Huey *et al.* 2007) nach der Präparation der Liganden mit der Windows Version von AutoDockTools Version 1.5.2 (Sanner 1999) durchgeführt. Insgesamt wurden 100 Docking-Läufe für jeden Liganden gemacht. Bis auf die Mutationsrate, welche auf 0,05 heraufgesetzt wurde, erfolgten die Untersuchungen mit Standardeinstellungen.

## 2.2.4 Kristallisation

### 2.2.4.1 Ansetzen der Proteinlösungen für die Kristallisation

Für die Kristallisation wurde entweder frisch gereinigtes oder bei -20 °C gelagertes Protein in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) eingesetzt. Zur Entfernung grober Verunreinigungen und größerer Aggregate wurden die Proteinlösungen zunächst filtriert (Sartorius Stedim Minisart® Porengröße 0,20  $\mu$ m). Anschließend erfolgte die Einstellung auf eine Konzentration von 20-25 mg/ml ( $\approx$  420-570  $\mu$ M P450-Lösung) mittels *Amicon Ultra-15* Zentrifugeneinheiten (Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland) mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa. Für die Ko-Kristallisation mit Substrat oder Inhibitor erfolgte die Zugabe der entsprechenden in DMSO gelösten Substanzen in 3-10 fach

molarem Überschuss. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf Eis wurden die Proteinlösungen für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 14.000g zentrifugiert und nach dem Überführen in unbenutzte Reaktionsgefäße für die Kristallisation eingesetzt.

#### 2.2.4.2 Screening nach Kristallisationsbedingungen

Das Austesten initialer Kristallisationsbedingungen erfolgte mit der sogenannten *sparse matrix* Technik. Diese Methode beruht auf der systematischen Testung möglichst unterschiedlicher Bedingungen und wurde 1991 erstmals mit den präzisen Angaben zur Herstellung 50 wässriger Lösungen verschiedener Salze, Puffer und Fällungsmittel veröffentlicht (Jancarik und Kim 1991). Aufgrund der hohen Erfolgsaussichten dieser Technik sind heutzutage eine Vielzahl kommerzieller Sätze erhältlich, die verschiedenste bereits erfolgreich zur Kristallisation eingesetzte Pufferlösungen beinhalten. In vorliegender Arbeit wurde das *Crystal Screen HT kit* der Firma Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA) mit 96 verschiedenen Formulierungen verwendet. Der Ansatz erfolgte nach der Methode des sitzenden Tropfens. Hierzu wurden mit dem Kristallisations-Roboter *Phoenix\RE* der Firma Art Robbins Instruments (Sunnyvale, CA, USA) jeweils 50 µl der Lösungen des Satzes in die Reservoirs von 96 Well Platten vorgelegt (*The MRC Crystallisation Plate™* aus Polystyrene, Molecular Dimensions, Newmarket, UK). Anschließend wurden jeweils 200 nl der entsprechend vorbereiteten Proteinlösung in die Vertiefungen der Platte pipettiert und mit 200 nl Reservoirlösung gemischt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 18 °C und 30 % relativer Luftfeuchte in einem automatisierten Inkubationsschrank (*CrystalMation™* von Rigaku, Sevenoaks, England). Die Tropfen wurden über einen Zeitraum von mehreren Wochen in regelmäßigen Abständen photographisch dokumentiert und auf die Bildung von Proteinkristallen untersucht. Hierbei war die durch den Häm-Kofaktor verursachte rote Färbung der Proteine von Vorteil, da sie eine einfache Differenzierung zwischen Salz- und Proteinkristallen in den jeweiligen Ansätzen ermöglichte.

#### 2.2.4.3 Überprüfung der Kristallisationsbedingungen

Die Überprüfung der im ersten Screening gefundenen Bedingungen erfolgte nach der Methode des hängenden Tropfens mit selbst hergestellten Kristallisationslösungen. Hierzu wurden Stammlösungen der einzelnen Komponenten in einer Konzentration von 1 M in Wasser aus einer MilliQ Biocel Anlage (Millipore, Bedford, MA, USA) angesetzt und sterilfiltriert (Sartorius Stedim Minisart® Porengröße 0,20 µm). Die PEG-Stammlösungen wurden in einer Konzentration von 60 % (w/v) angesetzt. Nach dem Zusammenpipettieren der Lösungen wurden diese erneut sterilfiltriert. Die Ansätze erfolgten in *24 Well VDX Greased Plates* (Hampton Research, Wellkapazität 3,5 ml). Zunächst wurden entweder 500 µl oder 1 ml der jeweiligen Reservoirlösungen in die Vertiefungen pipettiert. Anschließend wurde 1 µl der Proteinlösung auf ein Deckgläschen (Ø 20 mm, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) pipettiert

und mit 1  $\mu$ l der ReservoirLösung vermischt. Danach wurde das Deckgläschen auf die vorgefetteten Ränder der Vertiefung gesetzt und angedrückt, so dass die Kammer luftdicht abgeschlossen war. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 18 °C in *Vinothek* Weintemperierschränken von Liebherr (Biberach an der Riss, Deutschland).

#### 2.2.4.4 Optimierung der Kristallisationsbedingungen

Die Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurde wie oben beschrieben in 24 Well-Platten nach der Methode des hängenden Tropfens durchgeführt. Hierzu wurden zunächst verschiedene Mischungsverhältnisse von Protein- zu ReservoirLösung (1:1, 1:2, 2:1) sowie unterschiedliche Gesamtvolumina der Tropfen ausgetestet (1-4  $\mu$ l). Außerdem wurden in einem Raster-Screening die Parameter Salz- sowie Präzipitanz-Konzentration und pH-Wert optimiert.

#### 2.2.4.5 *Seeding* von Kristallen

Bei der Proteinkristallisation unterscheiden sich die bestmöglichen Bedingungen für Nukleation und Wachstum der Kristalle teilweise deutlich voneinander. Dies liegt daran, dass eine spontane Keimbildung am ehesten dann auftritt, wenn der Übersättigungsgrad der Proteinlösung sehr hoch ist. Im Gegenzug ist für das langsame und geordnete Wachstum von Kristallen eine niedrigere Konzentration von Vorteil. Durch *Seeding*, das Beimpfen einer Kristallisationslösung mit Kristallfragmenten, welche als Nukleationskeime dienen, ist es möglich, Nukleation und Wachstum voneinander zu trennen und somit bessere Bedingungen für die Bildung geordneter Proteinkristalle zu schaffen (Stura und Wilson 1990, 1991). Prinzipiell stehen hierfür drei verschiedene Techniken zur Verfügung: *Macroseeding*, *Microseeding* und *Streakseeding*. Der Unterschied zwischen *Macro*- und *Microseeding* liegt in der Größe des eingebrachten Kristallkeims. Beim *Streakseeding* wird ein bestehender Kristall mit einem dünnen Gegenstand berührt, so dass mikroskopisch kleine Kristallite an der Oberfläche haften bleiben und in eine andere Lösung überführt werden können. In dieser Arbeit kamen das *Microseeding* und das *Streakseeding* zum Einsatz.

Für das *Microseeding* wurde eine in der Literatur beschriebene Methode (Luft und DeTitta 1999) mit leichten Abwandlungen benutzt. Hierzu erfolgte zunächst die Herstellung einer Stabilisierungslösung bestehend aus Proteinlösung (20 mg/ml) und Kristallisationslösung im Mischungsverhältnis 1:1. Anschließend wurde ein einzelner Kristall aus einem Tropfen gefischt, in Puffer gewaschen und in die Stabilisierungslösung überführt. Danach erfolgte das Auseinanderbrechen des Kristalls durch starkes Vortexen. Die auf diese Weise entstandene Stammlösung für die *Seeding*-Experimente mit den Kristallfragmenten wurde in fünf Schritten sukzessive 1:10 mit Stabilisierungslösung verdünnt. Die einzelnen Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an Kristallbestandteilen wurden für weitere Kristallisationsexperimente eingesetzt.

Für das *Streakseeding* wurde zunächst, wie oben beschrieben, Stabilisierungslösung hergestellt. In einer 24-Well Platte wurde Reservoir-Lösung vorgelegt. 3  $\mu\text{l}$  der Stabilisierungslösung wurden auf Deckgläser pipettiert und die Wells wurden versiegelt. Die so präparierten Platten wurden zur Äquilibration für 1 h bei 18 °C inkubiert. Anschließend wurde ein unter Standardbedingungen gezüchteter Kristall mit einem Pferdehaar berührt (Bergfors 2003), welches dann zügig nacheinander durch sechs Tropfen der vorbereiteten *Seeding*-Platte gezogen wurde.

#### 2.2.4.6 Additiv-Screen

Additive sind kleine Moleküle (Salze, Detergenzien, Polymere, organische Lösemittel), die einen Einfluss auf die Protein-Protein- sowie Protein-Lösungsmittel-Interaktionen haben, was sich positiv auf die Löslichkeit und Kristallisation einer Probe auswirken kann. In dieser Arbeit wurde das *Additive Screen HT* (Hampton Research) für die Optimierung der CYP106A2 Kristalle getestet. Die Ansätze wurden unter den optimierten Kristallisationsbedingungen gemäß Herstellerangaben pipettiert.

#### 2.2.4.7 Montieren von Kristallen/Kryobedingungen

Zur Minimierung von Strahlenschäden an den Proteinkristallen durch die energiereiche Röntgenstrahlung erfolgte die Messung unter Kryobedingungen ( $T=100\text{ K}$ ). Dabei müssen die Kristalle vor Schäden durch die Bildung von Eiskristallen während des Schockfrierens geschützt werden. Dies geschah, indem die Kristalle in eine glasartig gefrierende Kryolösung übertragen und in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Hierzu wurden die Kristalle mit kleinen Nylon-Schleifen, sogenannten *CryoLoops*<sup>™</sup> (Hampton Research), aus dem Tropfen entnommen und in eine entsprechende kryoprotektanthaltige Lösung überführt. Diese Kryolösungen setzten sich aus der jeweiligen Kristallisationslösung und PEG 400 bzw. Glycerin in unterschiedlichen Endkonzentrationen zusammen (McFerrin und Snell 2002). Bei Bedarf wurde den Lösungen außerdem Substrat in den jeweiligen Konzentrationen zugefügt. Im Anschluss wurden die Kristalle in flüssigen Stickstoff ( $-196\text{ °C}$ ) getaucht und darin bis zur Vermessung gelagert.

#### 2.2.4.8 Aufnahme von Datensätzen

Erste kristallographische Untersuchungen an den P450-Kristallen erfolgten am Lehrstuhl für Strukturbiologie (Prof. Lancaster, Universität des Saarlandes, Homburg) an einer Heimröntgenquelle (Super Nova<sup>™</sup> von Oxford Diffraction, Wembley, England) mit einer Kupferdrehanode bei einer Wellenlänge von 1,5418 Å.

Für die Aufnahme kompletter Datensätze waren die Intensität der Röntgenstrahlung der Heimanlage sowie das Beugungsverhalten der Kristalle nicht ausreichend. Um höher aufgelöste Beugungsdaten zu erhalten, wurden die Kristalle deshalb an der Beamline ID14-4 der *European Synchrotron*

*Radiation Facility* (ESRF) in Grénoble (Frankreich) vermessen. Die Intensität der Synchrotronstrahlung ist um mehrere Größenordnungen höher, was deutlich niedrigere Belichtungszeiten erlaubt. Durch die geringere Wellenlänge von  $<1 \text{ \AA}$  können außerdem Datensätze mit höherer Auflösung gewonnen werden. Zur Ermittlung der optimalen Strategie bei der Datensammlung wurden Referenzbilder der Kristalle aufgenommen und mit dem Rechenprogramm EDNA (Incardona *et al.* 2009) analysiert. Je höher die Symmetrie der Laue-Gruppe eines Kristalls ist, desto kleiner ist der Bereich, der für eine vollständige Beschreibung des Kristalls vermessen werden muss. Für die Datensätze des CYP105A1 wurde ein Bereich von  $100^\circ$  erfasst, während die Datensätze des CYP106A2 über einen Bereich von  $400^\circ$  aufgenommen wurden. Der Rotationswinkel betrug jeweils  $0,5^\circ$ . Weitere Messparameter sind im Ergebnisteil beschrieben.

#### **2.2.4.9 Datenprozessierung**

Für die Prozessierung der Daten wurde das CCP4 Programmpaket (Collaborative Computational Project, Number 4 1994) verwendet. Die Bestimmung der Symmetrie sowie die Vorbereitung der Daten für die Skalierung erfolgten mit Pointless (Evans 2006). Zur Indizierung der Reflexe, Skalierung und Konvertierung wurde iMOSFLM (Leslie und Powell 2007, Battye *et al.* 2011) in Kombination mit Scala/Truncate (Evans 2006) aus dem CCP4-Programmpaket benutzt.

#### **2.2.4.10 Lösung des Phasenproblems**

Die Lösung des Phasenproblems der in dieser Arbeit analysierten Strukturdaten erfolgte durch die Methode des molekularen Ersatzes. Hierfür wurde das Programm MOLREP (Vagin und Teplyakov 1997) aus dem CCP4-Programmpaket verwendet. Als Modelle dienten dabei die Struktur des wt-CYP105A1 in Komplex mit Imidazol (PDB-Eintrag 2ZBX) für das CYP105A1 sowie die Struktur des CYP119 mit gebundenem Phenylimidazol (PDB-Eintrag 1F4T) für das CYP106A2.

#### **2.2.4.11 Verbesserung der Strukturmodelle**

Da das durch den molekularen Ersatz positionierte Strukturmodell in vielen Bereichen noch nicht mit der realen Struktur übereinstimmt, muss dieses initiale Modell weiter den experimentellen Daten angepasst werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Strukturverfeinerung. Hierzu erfolgte zunächst eine Energieminimierung mit dem Programm Refmac5 (Murshudov *et al.* 1997). Danach wurden das Strukturmodell und die berechneten Elektronendichtekarte mit dem Programm Coot (Emsley und Cowtan 2004) dargestellt und übereinandergelegt. Es erfolgte eine visuelle Kontrolle der Übereinstimmung von Modell und Elektronendichte und fehlerhafte Bereiche wurden manuell korrigiert. Zu diesen Korrekturen gehörten das Ergänzen von Aminosäuren, die richtige Orientierung von Aminosäureseitenketten und Korrekturen im Verlauf des Polypeptid-Rückgrats. Nach jeder

manuellen Strukturverfeinerung des Modells erfolgte eine erneute Energieminimierung mittels Refmac5. Diese Schritte wurden so lange wiederholt, bis sich der R-Faktor nicht mehr änderte. Eine Kontrolle dabei war der freie R-Faktor, dessen Berechnung unter Ausschluss von 5 % der Reflexe erfolgte (siehe Abschnitt 1.3.7).

#### **2.2.4.12 Hinzufügen von Liganden und Lösemittelmolekülen**

Das Einfügen von Wassermolekülen erfolgte zunächst automatisch mittels Coot. Anschließend wurden die Moleküle einzeln überprüft. Überschritt ihr Temperaturfaktor einen gewissen Wert, wurden sie wieder gelöscht. Die gefundenen Lösemittelmoleküle waren mit ihren jeweiligen Koordinaten und Geometrieparametern in der Programmbibliothek von Coot enthalten. Die Topologie-Daten des Substrats Abietinsäure wurden mit dem PRODRG-Server erstellt (Schüttelkopf und van Aalten 2004).

#### **2.2.4.13 Qualität und Darstellung der Strukturmodelle**

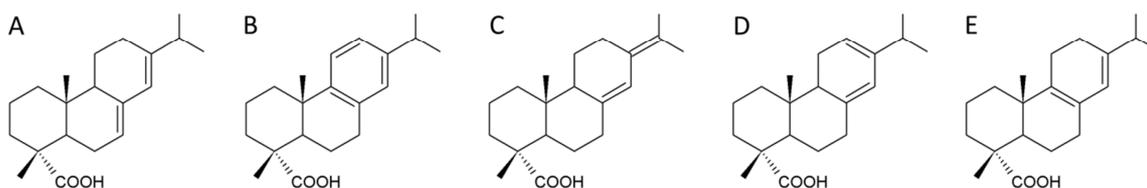
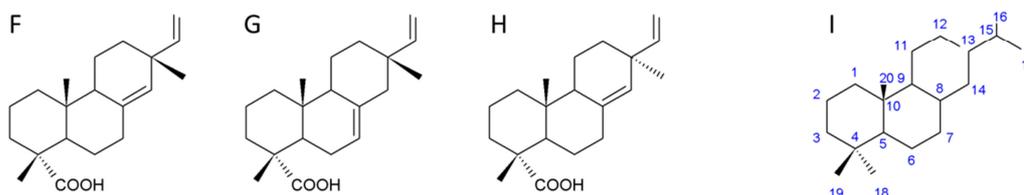
Die Qualität der Strukturen wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.* 1993) überprüft. Für die graphische Darstellung von Strukturmodell und Elektronendichte-Karten wurde das Rechenprogramm PyMol (DeLano 2002) benutzt. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Elektronendichte-Karten mit dem Programm FFT (Read und Schierbeek 1988) berechnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 In vitro Charakterisierung der Diterpenoide mit CYP106A2

Seit den 1970er Jahren wurde eine Vielzahl von Substraten, zunächst vorwiegend 3-oxo- $\Delta^4$ -Steroide, für das CYP106A2 beschrieben. Die ersten Hinweise auf sekundäre Pflanzenstoffe als potentielle Substrate des CYP106A2 wurden durch die 15-Hydroxylierung von Betulinsäure, einer Triterpen-Carbonsäure, mit dem Wirtstamm *B. megaterium* ATCC 13368 erbracht (Chatterjee *et al.* 2000). In unserer Arbeitsgruppe konnten kürzlich weitere Terpen-Substrate wie die pentazyklische Triterpensäure 11-Keto- $\beta$ -boswelliasäure (KBA) und die Diterpensäure Abietinsäure beschrieben werden (Bleif *et al.* 2011).

Um tiefere Einblicke in die Substratspezifität und -bindung des CYP106A2 zu gewinnen, sollten deshalb weitere strukturverwandte Verbindungen untersucht werden. Hierfür wurden die acht häufigsten in Baumharz von Koniferen vorkommenden Harzsäuren des Abietan- und Pimarantyps ausgewählt (Keeling und Bohlmann 2006b, Hamberger *et al.* 2011). Diese Verbindungen sind aus biologischer Sicht äußerst interessant, da sie ein breites Spektrum an pharmakologischen und toxischen Eigenschaften aufweisen, die durch die Funktionalisierung mit Cytochromen P450 beeinflusst werden könnten. Ein für die Untersuchung der Bindung im aktiven Zentrum von P450s interessanter Aspekt bietet sich außerdem dadurch, dass sie als Tricyclophytane zwar das gleiche Grundgerüst aufweisen, sich jedoch in distinkten Strukturmotiven unterscheiden. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, den Einfluss einzelner funktioneller Gruppen auf die Substratbindung zu evaluieren. Neben der bereits als Substrat beschriebenen Abietinsäure enthielt die Substanzbibliothek die Abietan-Harzsäuren Neoabietinsäure, Palustrinsäure, Lävopimarsäure und Dehydroabietinsäure sowie die Pimaran-Harzsäuren Pimarsäure, Sandaracopimarsäure und Isopimarsäure. Während die Abietane sich durch die Position und Anzahl der konjugierten Doppelbindungen in den Ringen B und C sowie der Isopropylgruppe voneinander unterscheiden, besitzen die Pimarane keine konjugierten Doppelbindungen. Ferner tragen sie an Stelle der Isopropylgruppe am C13 eine Methyl- und eine Vinylgruppe. Da bereits von Dr. Bleif in ihrer Dissertation gezeigt werden konnte, dass die Carbonsäurefunktion eine wichtige Rolle bei der Bindung des Substrates im aktiven Zentrum von CYP106A2 spielt (Bleif 2012), sollte außerdem ihr Einfluss näher untersucht werden. Hierfür standen die entsprechenden Vorläufer in der Biosynthese der Harzsäuren zur Verfügung, die an Stelle der Säuregruppe am C4 des Diterpengerüsts eine Methyl-, Alkohol- oder Aldehydgruppe tragen. Die Strukturformeln der einzelnen Verbindungen sind in Abbildung 3.1 gezeigt.

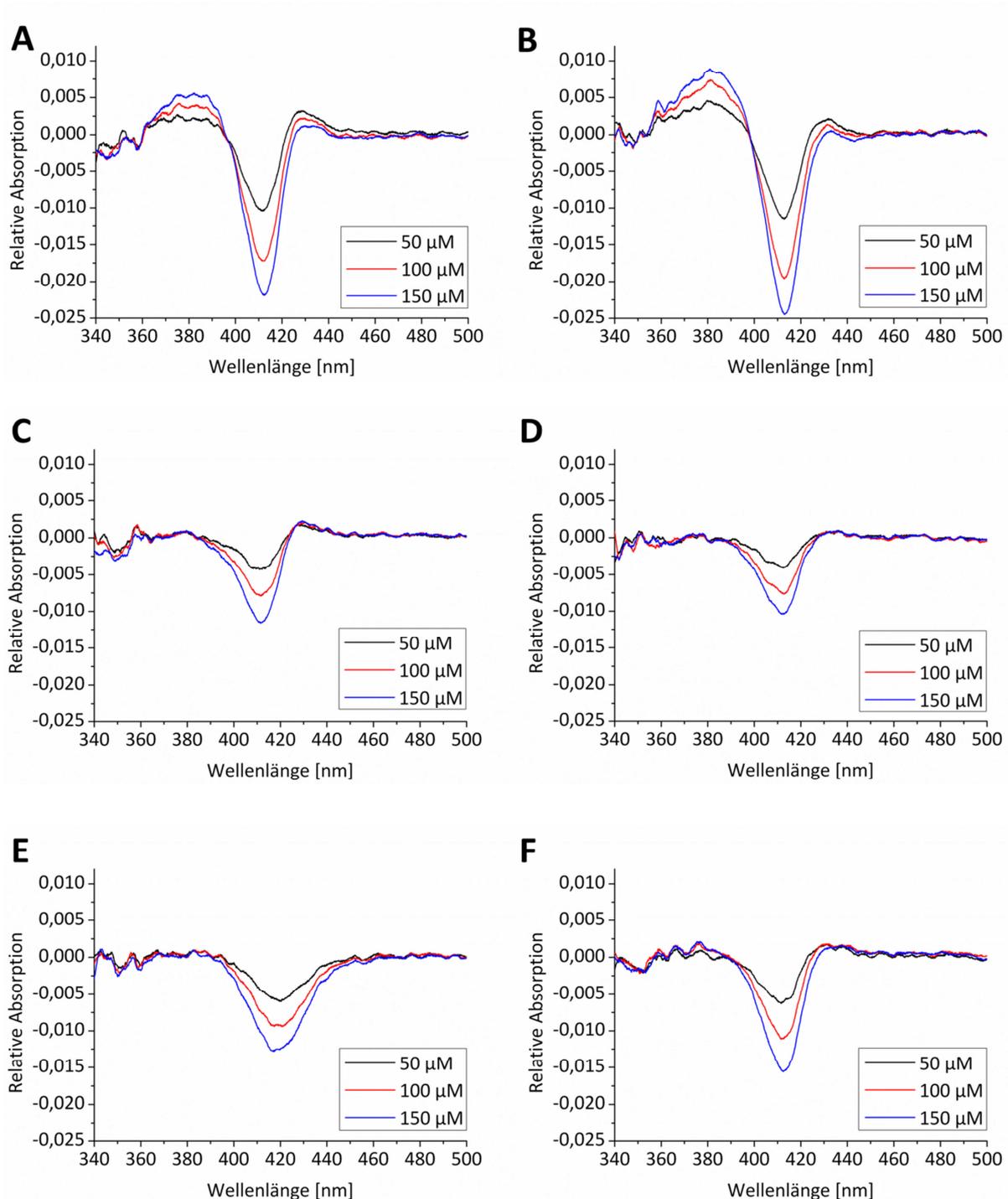
**Abietane****Pimarane**

**Abbildung 3.1:** Strukturformeln der acht häufigsten Diterpen-Harzsäuren des Abietan- und Pimaran-Typs. A) Abietinsäure B) Dehydroabietinsäure C) Neoabietinsäure D) Lävopimarsäure E) Palustrinsäure F) Pimarsäure G) Isopimarsäure H) Sandaracopimarsäure I) C-Atom-Nummerierung des Abietan-Grundgerüsts. Die analogen Vorläufer enthalten statt der Säurefunktion am C4 eine Methyl- ( $\text{CH}_3$ ), Alkohol- ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ) oder Aldehydgruppe ( $\text{CHO}$ ).

**3.1.1 Typ-I-Differenzspektroskopie**

Eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung potentieller Substrate eines Cytochroms P450 ist die Differenzspektroskopie, bei der die Verschiebung des Absorptionsmaximums der Soretbande als Marker für die Bindung im aktiven Zentrum herangezogen wird. Grundlage hierfür ist die Verdrängung eines Wassermoleküls aus dem Ligandenfeld des zentralen Eisenatoms im Häm-Kofaktor durch das Substrat. Hieraus resultiert der Übergang des Häm-Eisens von einem hexakoordinierten *low spin* Zustand mit einem Absorptionsmaximum bei 417 nm in den pentakoordinierten *high spin* Zustand mit einem Absorptionsmaximum zwischen etwa 380 und 390 nm (Jefcoate 1978, Schenkman und Jansson 1998). Allerdings ist das Auslösen dieses sogenannten *spin shifts* keine notwendige Bedingung für den Substratumsatz. Gerade für das CYP106A2 waren lange Zeit nur wenige *high spin shift* induzierende Substrate bekannt. Da jedoch die meisten von Bleif im Rahmen ihrer Dissertation untersuchten pentacyclischen Triterpensäuren in der Lage waren, einen solchen *spin shift* auszulösen, wurden mit den Diterpen-Harzsäuren ebenfalls differenzspektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse für Sandaracopimarsäure, Pimarsäure, Dehydroabietinsäure, Palustrinsäure, Neoabietinsäure und Lävopimarsäure sind in Abbildung 3.2 gezeigt. Hierbei lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Harzsäuren des Pimaran-Typs und des Abietan-Typs erkennen: Während sowohl die Sandaracopimarsäure als auch die Pimarsäure einen typischen Typ-I-shift auslösten (Abbildung 3.2 A und B), konnte für die vier gezeigten Abietan-Säuren kein *spin shift* festgestellt werden (Abbildung 3.2 C - F). Zwar kam es auch hier zu einer Abnahme der Absorption bei etwa 417 nm, jedoch war diese deutlich geringer als bei den Pimaran-Säuren und ging nicht mit der konzentrationsabhängigen Ausbildung eines Maximums

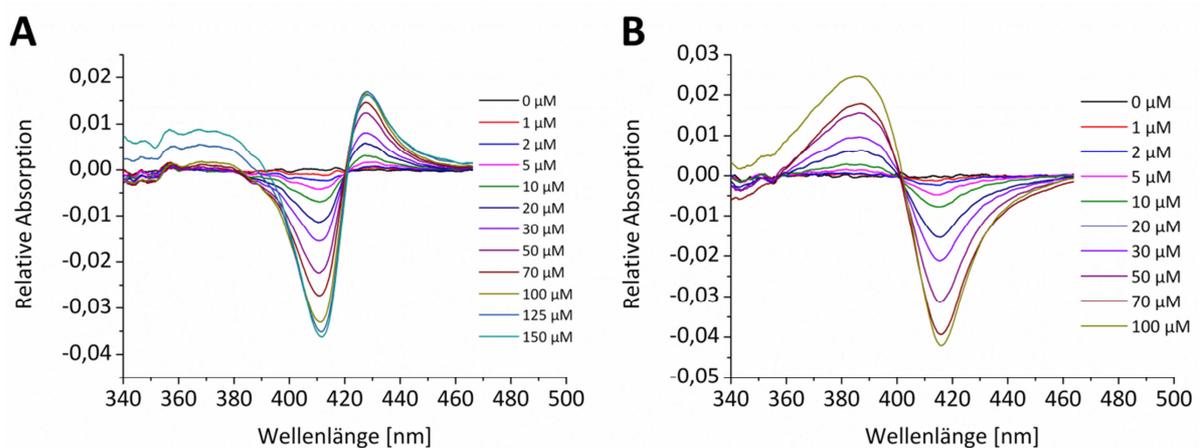
zwischen 380 und 390 nm einher. Diese Beobachtung lässt sich somit durch Verdünnungseffekte erklären.



**Abbildung 3.2:** Differenzspektren von A) Sandaracopimarsäure B) Pimarsäure C) Palustrinsäure D) Dehydroabietinsäure E) Neoabietinsäure F) Lävopimarsäure. Die Substrate wurden jeweils in den Konzentrationen 50 μM, 100 μM und 150 μM zu 5 μM CYP106A2 in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer titriert.

Ein interessanter Sonderfall ergab sich bei der Titration der Abietinsäure zum CYP106A2. Wie in Abbildung 3.3 A zu erkennen ist, ließ sich hierbei eindeutig ein *spin shift* nachweisen. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, bei denen kein *spin shift* beobachtet werden

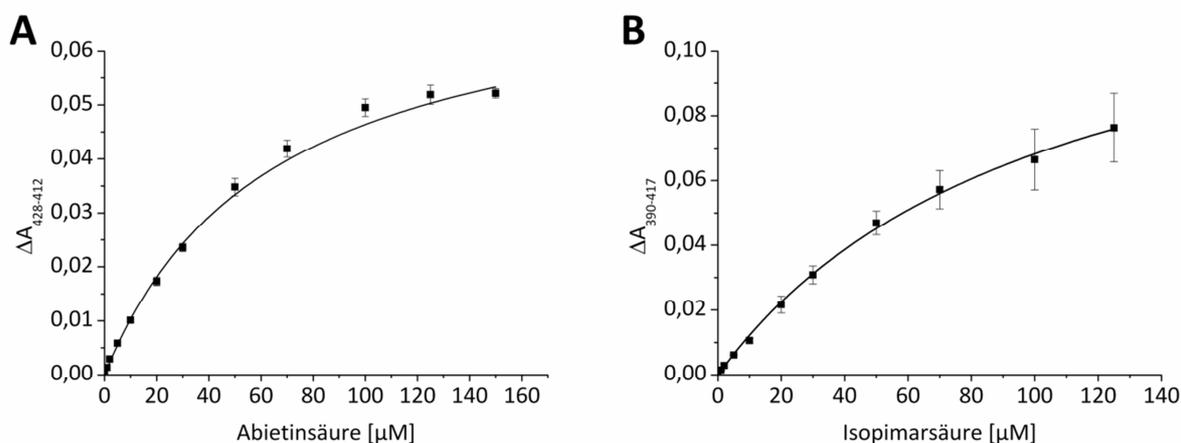
konnte (Bleif 2012). Der Vergleich mit dem Typ-I-Substrat Isopimarsäure (Abbildung 3.3 B) zeigt außerdem, dass im Gegensatz zu diesem bei der Titration mit Abietinsäure ein Maximum bei einer Wellenlänge von 428 nm und ein Minimum bei einer Wellenlänge von 412 nm beobachtet werden konnte. Diese Werte sind charakteristisch für einen Typ-II-shift mit einem Peak zwischen 425 und 435 nm sowie einem Tiefpunkt im Bereich von 390 bis 413 nm (Schenkman *et al.* 1967, Kumaki *et al.* 1978, Ahlström und Zamora 2008). Diese Art von Differenzspektrum wird üblicherweise in Folge der Verdrängung des sechsten Liganden am Häm-Eisen durch einen stärkeren Liganden, in den meisten Fällen einem stickstoffhaltigen Heteroaromaten, hervorgerufen. Aufgrund ihrer festen Bindung stellen solche Substanzen in der Regel Inhibitoren dar. Insofern ist das spektroskopische Verhalten bei der Titration mit Abietinsäure in doppelter Hinsicht bemerkenswert: Einerseits, weil mit dieser Substanz bereits eine Produktbildung gezeigt werden konnte und es sich somit nicht um einen Inhibitor handelt, und andererseits, weil sie strukturell von den bisher beschriebenen Typ-II-Substraten abweicht, da sie kein Stickstoffatom enthält. Darüber hinaus ergab sich der interessante Umstand, dass verschiedene Vertreter der Harzsäuren trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit offenbar deutliche Unterschiede in der Bindung zum CYP106A2 aufweisen.



**Abbildung 3.3:** Differenzspektren von CYP106A2 mit A) Abietinsäure und B) Isopimarsäure. 5  $\mu\text{M}$  CYP106A2 in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) wurden mit steigenden Mengen der jeweiligen Verbindung versetzt. Die Aufnahme der Differenzspektren erfolgte jeweils nach 2-minütiger Inkubationszeit.

Mittels Differenzspektroskopie lassen sich auch die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten ( $K_d$ -Werte) zur Bestimmung der Bindungsaffinität eines Liganden zum Cytochrom P450 bestimmen (Podust *et al.* 2007). Dies erfolgte für die Abietinsäure und die Isopimarsäure, indem steigende Mengen der Substanzen zum CYP106A2 hinzu titriert und anschließend die Differenz der Absorption zwischen Spitze und Tal gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen wurde. Auf diese Weise wurden die in Abbildung 3.4 gezeigten Substratsättigungskurven erhalten. Die über

hyperbolische Regression ermittelten Dissoziationskonstanten sowie die entsprechenden Regressionskoeffizienten sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.



**Abbildung 3.4:** Substratsättigungskurven von CYP106A2 mit A) Abietinsäure und B) Isopimarsäure. Die Bestimmung erfolgte durch das Auftragen der Absorptionsdifferenzen in Abhängigkeit der eingesetzten Substratkonzentration und anschließende hyperbolische Regression gemäß der Funktion  $f(x)=y_0+ax/(b+x)$ . Jede Titration wurde dreimal durchgeführt, und die entsprechenden Mittelwerte wurden bestimmt.

**Tabelle 3.1:** Dissoziationskonstanten und Regressionskoeffizienten der getesteten Verbindungen mit CYP106A2.

Verbindung	Dissoziationskonstante $K_d$ [ $\mu\text{M}$ ]	Regressionskoeffizient $R^2$
Abietinsäure	$63,84 \pm 3,91$	0,998
Isopimarsäure	$104,02 \pm 7,88$	0,998

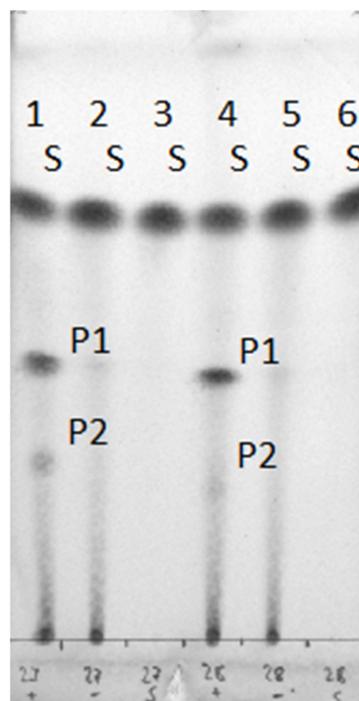
Die Abietinsäure zeigt mit einer Dissoziationskonstanten von  $63,84 \pm 3,91 \mu\text{M}$  eine höhere Affinität zu CYP106A2 als die Isopimarsäure mit einem  $K_d$ -Wert von  $104,02 \pm 7,88 \mu\text{M}$ . Für die anderen Harzsäuren des Abietan-Typs wie die Dehydroabietinsäure ließen sich aufgrund fehlender Differenzspektren keine  $K_d$ -Werte bestimmen. Insgesamt betrachtet ist die Affinität der Diterpen-Harzsäuren zu CYP106A2 zwar etwas niedriger als die der zuvor getesteten pentazyklischen Triterpene (Bleif 2012), liegt aber noch in der gleichen Größenordnung. Diese Ergebnisse deuten an, dass bereits geringe strukturelle Unterschiede dieser potentiellen Substrate einen deutlichen Einfluss auf die Affinität und Art der Bindung im aktiven Zentrum haben.

### 3.1.2 In vitro Substratumsätze

Zwar gibt die Ausbildung eines Typ-I-shifts einen ersten Hinweis darauf, ob eine bestimmte Substanz von einem Cytochrom umgesetzt werden kann, liefert aber noch keinen Beweis dafür. Aus diesem Grund wurden zur genaueren Untersuchung *in vitro* Assays durchgeführt, bei denen der Substratumsatz mit einem rekonstituierten System, bestehend aus CYP106A2 und seinen heterologen Redoxpartnern  $\text{Adx}_{4-108}$  und AdR, getestet wurde. Zusätzlich enthielten die Ansätze ein NADPH-regenerierendes System auf Basis der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Da viele der

getesteten Verbindungen keine chromophore Gruppe aufwiesen und eine Detektion bei 210 nm aufgrund zu hoher Eigenabsorption des Laufmittels in diesem Wellenlängenbereich nicht erfolgreich war, wurden die Reaktionsansätze im Anschluss an die Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie analysiert.

Die Umsetzung von Abietinsäure zu den beiden Produkten 12 $\alpha$ - und 12 $\beta$ -Hydroxyabietinsäure konnte bereits früher gezeigt werden (Bleif *et al.* 2011). Die hier durchgeführten Untersuchungen konzentrierten sich daher auf die strukturell ähnlichen Harzsäuren, um somit Erkenntnisse über eventuell essentielle Struktur motive für die Bindung der Diterpene im aktiven Zentrum des CYP106A2 zu erhalten. Abbildung 3.5 zeigt beispielartig den Umsatz der Pimarane Sandaracopimarsäure und Pimarsäure. Beim Vergleich mit den Negativkontrollen lassen sich nach 30-minütiger Reaktionsdauer mit dem CYP106A2 jeweils zwei unterschiedliche Produkte erkennen, wobei P1 in beiden Fällen in größerer Menge gebildet wurde als P2. Auch die Reaktionen der anderen Harzsäuren des Abietan- und Pimaran-Typs mit dem CYP106A2 zeigten ein ähnliches Bild (siehe Abschnitt 6.3). Trotz der durch die differenzspektroskopischen Untersuchungen gezeigten Unterschiede bei der Bindung im aktiven Zentrum stellen alle getesteten Harzsäuren somit Substrate für das CYP106A2 dar. Hierbei findet, wie bereits zuvor für die Abietinsäure gezeigt, eine Bildung von mindestens zwei Produkten in unterschiedlichen Mengenverhältnissen statt.



**Abbildung 3.5:** DC-Chromatogramm der *in vitro* Umsätze von Sandaracopimarsäure (1-3) und Pimarsäure (4-6) mit CYP106A2. Die Spuren 1 und 4 zeigen jeweils die Umsätze, die Spuren 2 und 5 die Negativkontrollen (gleicher Reaktionsansatz, jedoch ohne CYP106A2) und die Spuren 3 und 6 das reine Substrat. Die Reaktion erfolgte in 500  $\mu$ l 50 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems für 30 min bei 30 °C. Anschließend erfolgte die zweifache Extraktion mit Ethylacetat. Die DC-Analyse wurde mit Hexan/Ethylacetat (70:30 + 1 % Essigsäure) durchgeführt, und die Detektion der Substanzen erfolgte durch Färbung mit Anisaldehyd.

Durch den Vergleich der Umsätze strukturell ähnlicher Verbindungen konnte Dr. Bleif im Rahmen ihrer Dissertation bereits nachweisen, dass das Keto-en-Motiv, welches bis dato bei der Großzahl der beschriebenen CYP106A2 Substrate vorhanden war, kein für den Umsatz bzw. die Bindung essentielles Strukturmotiv ist (Bleif 2012). Durch die Testung des Substratumsatzes der strukturell homologen Vorläufer der Harzsäuren, die am C4 des Diterpen-Gerüsts eine Aldehyd-, Alkohol-, oder Methylgruppe tragen, sollte überprüft werden, ob die Carbonsäurefunktion von entscheidender Bedeutung bei der Bindung dieser Substanzen ist. Analog zu den vorherigen Untersuchungen wurden *in vitro* Rekonstitutionsassays durchgeführt und mittels DC analysiert. Die entsprechenden DC-Chromatogramme sind im Anhang (6.3) aufgeführt.

Die Substratumsätze zeigten, dass die funktionelle Gruppe am C4 einen größeren Einfluss auf den Umsatz hat als die Lage der Doppelbindungen und die Art des Substituenten am C13. Ungeachtet ihres strukturellen Abietan- bzw. Pimaran-Gerüsts wurden sowohl die Alkohole als auch die Aldehyde durch das CYP106A2 umgesetzt. Die Produktbildung war jedoch nicht selektiv, es entstanden immer mehrere Produkte in unterschiedlichem Mengenverhältnis. Die Intensität der Spots zeigte außerdem, dass die Aktivität des Enzyms gegenüber den Aldehyden stärker war als gegenüber den Substraten mit Alkoholfunktion. Für die Olefine konnte kein Umsatz gezeigt werden. Die Ergebnisse der *in vitro* Rekonstitutionsassays sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

**Tabelle 3.2:** Zusammenfassung der Ergebnisse des Substratumsatzes der Diterpenoid-Verbindungen mit CYP106A2 aus *B. megaterium*.

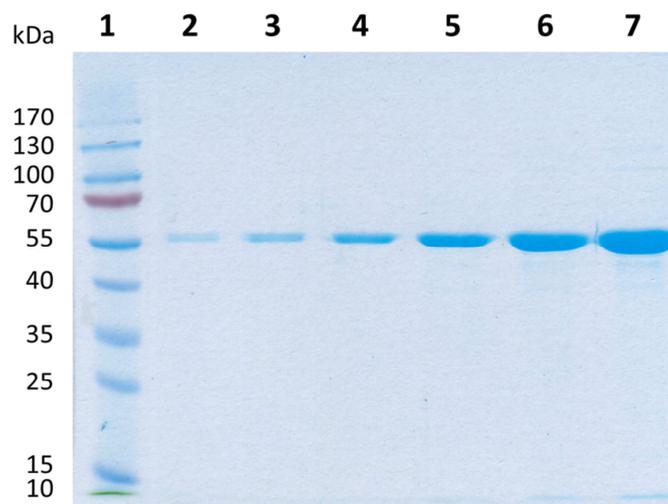
Verbindung	Umsatz mit CYP106A2
Olefine	Kein Umsatz
Alkohole	Schwacher Umsatz, mehrere Produkte
Aldehyde	Starker Umsatz, mehrere Produkte
Säuren	Umsatz, mehrere Produkte ( $\geq 2$ )

Somit konnten durch die Substratumsätze im rekonstituierten System alle getesteten Diterpen-Harzsäuren als neue Substrate des CYP106A2 identifiziert werden. Darüber hinaus konnte auch der Umsatz der korrespondierenden Alkohole und Aldehyde gezeigt werden, was Rückschlüsse auf essentielle Struktur motive potentieller Substrate des CYP106A2 erlaubt. Eine genaue Quantifizierung der Produktbildung nach der DC war aufgrund der teilweise sehr geringen Umsatzraten nicht möglich.

### 3.2 Kristallisation von CYP106A2

Um weitergehende Erkenntnisse hinsichtlich der Substratspezifität und konkret der strukturellen Grundlagen der Substratbindung des CYP106A2 zu erhalten, sollte die Struktur des Enzyms bestimmt werden. Dieses Wissen ist darüber hinaus bei der gezielten Optimierung von Enzymen für biotechnologische Prozesse von großem Nutzen.

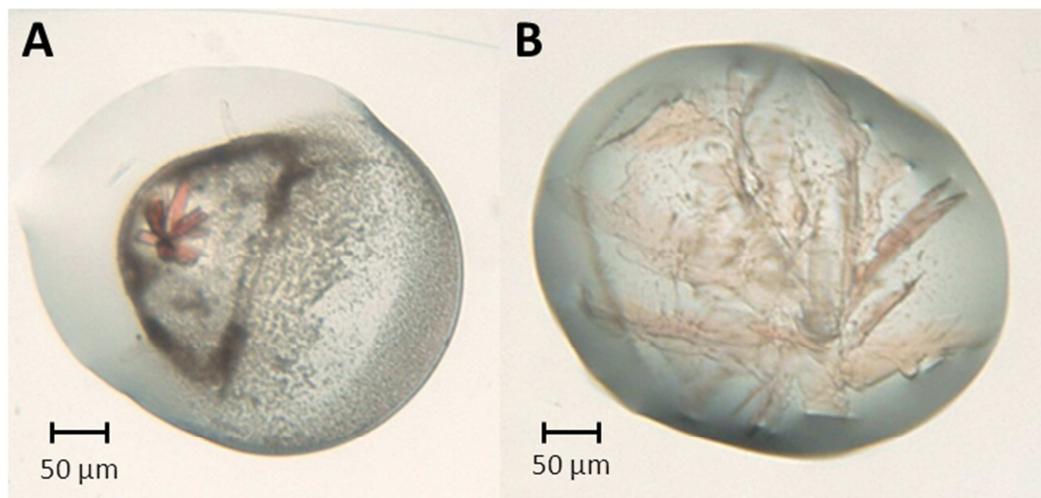
Für die Kristallisationsexperimente wurde CYP106A2 ohne Affinitätsmarker heterolog in *Escherichia coli* JM109 Zellen exprimiert. Die Reinigung des Proteins erfolgte in drei Stufen über Ionenaustauschchromatographie, Größenausschlusschromatographie und HAP-Chromatographie. Zur Bewertung der Reinheit des Proteins wurde der Q-Wert herangezogen. Dieser lag mit einem Wert von 1,76 in dem in der Literatur beschriebenen Bereich von 1,7-1,9 (Lisurek *et al.* 2008). Zur weiteren Überprüfung der Reinheit erfolgte außerdem die Auftrennung einer seriellen Verdünnung der Proteinprobe im SDS-Gel (siehe Abbildung 3.6). Durch den Vergleich der Intensität der Fremdbanden mit der Intensität definierter Mengen des CYP106A2 wurde anhand der Gelelektrophorese ein Reinheitsgrad von  $\approx 97\%$  geschätzt.



**Abbildung 3.6:** SDS-PAGE (12 %) des gereinigten CYP106A2. Spur 1: Protein-Marker IV (PeqLab). Spur 2-7: CYP106A2 in aufsteigenden Mengen (0,5; 1; 2; 5; 10 und 15 µg).

Zur Durchmusterung der Kristallisationsbedingungen mit dem *Crystal Screen HT kit* von Hampton Research wurde die Proteinkonzentration auf 20 mg/ml eingestellt. Bei einer Masse von etwa 47 kDa für das CYP106A2 entspricht dies einer molaren Konzentration von 425 µM. Der Substrateintrittskanal von Cytochromen P450 ist in Abwesenheit von Substraten oder anderen Liganden sehr flexibel, was zu einer konformativen Heterogenität führt, die wiederum eine Kristallisation der Proteine verhindert (Li und Poulos 2004). Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu dem Ansatz mit reinem Protein Proben vorbereitet, bei denen eine Inkubation des CYP106A2 mit verschiedenen Substraten oder Inhibitoren erfolgte. Hierfür wurden als Inhibitoren die

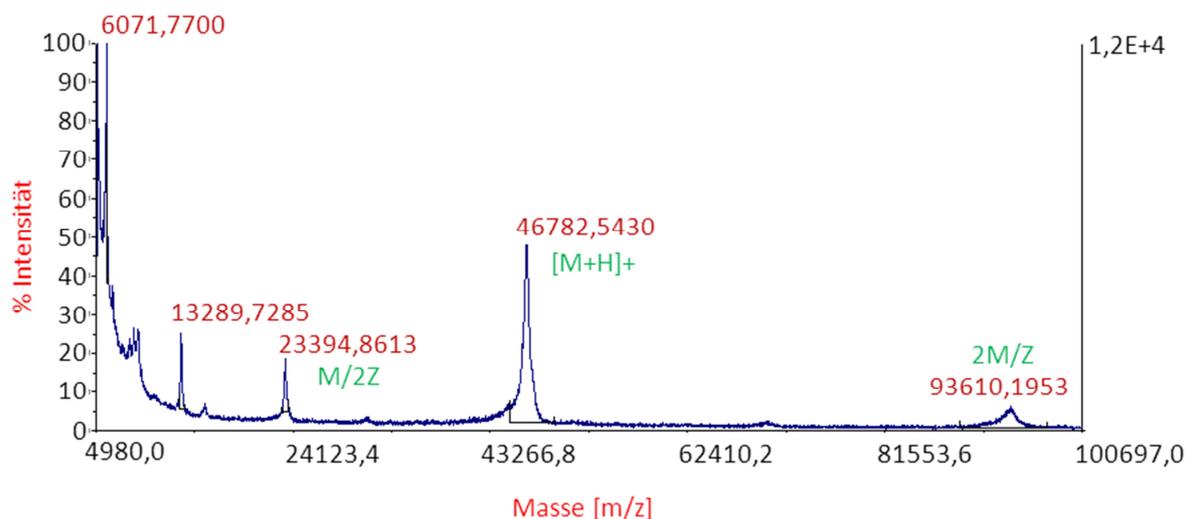
stickstoffhaltigen Heterozyklen Ketoconazol und Clotrimazol gewählt, die als Antimykotika Verwendung finden und bereits erfolgreich im Komplex mit verschiedenen P450s kristallisiert wurden (Ekroos und Sjögren 2006, Mast *et al.* 2010, Montemiglio *et al.* 2010). Außerdem wurden Ko-Kristallisationsansätze mit den Steroidsubstraten Progesteron und Desoxycortisol (DOC) sowie der Abietinsäure angesetzt. Die Zugabe der entsprechenden Substanzen, gelöst in DMSO, erfolgte in einer Endkonzentration von jeweils 2 mM. Durch die hohe Konzentration im etwa 5-fachen molaren Überschuss sollte ein vollständiges Binden des jeweiligen Liganden gewährleistet werden. Die ersten Kristalle bildeten sich nach 5-7 Tagen, wobei sich ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen feststellen ließ (siehe Abbildung 3.7). Während für das CYP106A2 ohne Zusatz von Substrat oder Inhibitor bei keiner der getesteten Bedingungen ein Kristallwachstum festgestellt werden konnte, erfolgte in den Ansätzen des CYP106A2 mit den Steroidsubstraten sowie den Inhibitoren die Bildung verwachsener Platten. Lediglich bei der Ko-Kristallisation mit dem Substrat Abietinsäure bildeten sich dreidimensionale Kristalle. Die Zusammensetzung des entsprechenden Kristallisationspuffers war 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M Natriumacetat-trihydrat pH 4,6 und 30 % (w/v) PEG 4000.



**Abbildung 3.7:** Unterschiedliche Kristallmorphologie der CYP106A2 Kristalle nach dem initialen Screening mit *Crystal Screen HT*. A) Kristall in Form eines Stab-Bündels bei Ko-Kristallisation des CYP106A2 mit dem Substrat Abietinsäure B) Kristallplatten des CYP106A2 bei der Ko-Kristallisation mit dem Substrat Progesteron.

Um die Reproduzierbarkeit der Kristallisation zu testen, wurden weitere Ansätze mit selbst hergestellten Lösungen und größeren Tropfenvolumina nach der Methode des hängenden Tropfens durchgeführt. Hierbei bildeten sich bei der Ko-Kristallisation mit Abietinsäure bereits nach drei Tagen Kristalle. Für erste Testmessungen wurden diese in Nylon-Schlaufen montiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Da die Kristallisationslösungen nicht glasartig gefroren, sondern trüb wurden, mussten die Kristalle nach der Entnahme aus dem Tropfen in geeignete Kryobedingungen überführt werden. Diese hatten die gleiche Zusammensetzung wie die Mutterlauge, enthielten aber zusätzlich

entweder 10 % (v/v) Glycerin oder 15 % (w/v) PEG 400 (McFerrin und Snell 2002). Bei dem Überführen der Kristalle konnte beobachtet werden, dass diese sehr instabil waren und sich leicht Risse bildeten, was zu einem Auseinanderbrechen der Kristalle führte. Wie bereits bei früheren Kristallisationsexperimenten mit CYP106A2 beobachtet werden konnte, findet nach einer Lagerung des Proteins über mehrere Wochen bei 4 °C eine scheinbar autoproteolytisch katalysierte Spaltung zwischen den Aminosäuren Serin 72 und Valin 73, die Teil des flexiblen BC-Loops sind, statt (Simgen 2002). Diese Degradation des Proteins war bis zu diesem Zeitpunkt das größte Hindernis bei der Kristallisation des CYP106A2 (Virus *et al.* 2006). Um nachzuprüfen, ob dieses Phänomen auch für die Instabilität der Kristalle verantwortlich ist, wurden MALDI-Untersuchungen mit aufgelösten Kristallen durchgeführt. Das Ergebnis der Massenanalyse des CYP106A2 zeigt Abbildung 3.8.

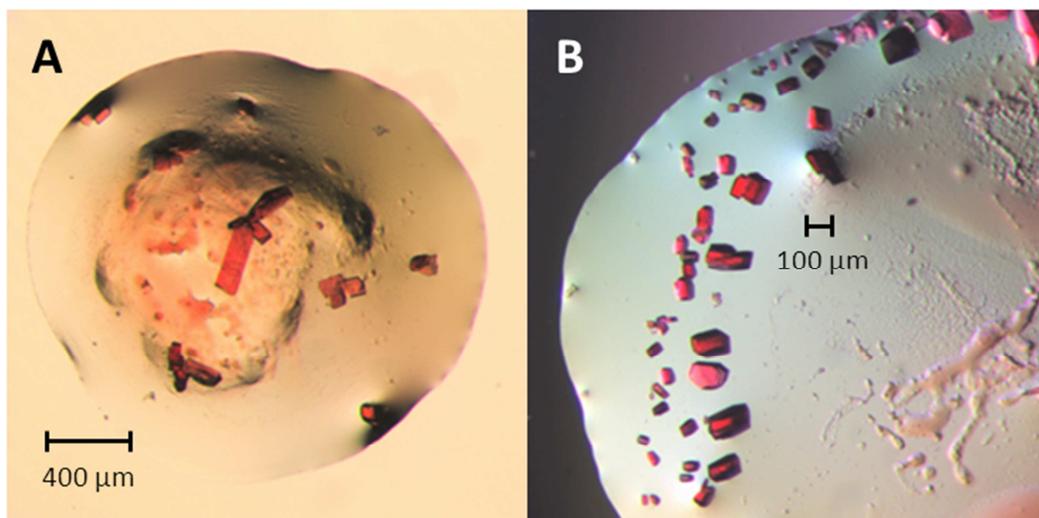


**Abbildung 3.8:** MALDI-Spektrum von gewaschenen und im Anschluss gelösten Kristallen des CYP106A2.

Wie sich anhand des Massenspektrums erkennen lässt, konnten keine Abbauprodukte des Proteins nachgewiesen werden. Es war ein deutlicher Peak bei einer Masse von 46782 Da zu erkennen, welcher gut mit dem theoretischen Molekulargewicht des vollständigen Enzyms von 46956 Da übereinstimmt. Die Abweichung lässt sich durch die breite Basis der glockenförmigen Verteilungskurve erklären. Eine um die 72 N-terminalen Aminosäuren verkürzte Variante des CYP106A2 hätte ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 37400 Da. In diesem Bereich des Massenspektrums ließ sich jedoch kein Signal nachweisen, was zeigte, dass das CYP106A2 in seiner vollständigen Form vorlag. Somit scheint die Bindung der Abietinsäure im aktiven Zentrum tatsächlich für eine Stabilisierung des CYP106A2 zu sorgen.

Für Voruntersuchungen wurden mehrere Kristalle an der Heilmröntgenquelle des Lehrstuhls für Strukturbiologie vermessen. Die Evaluierung der Daten mit dem XDS-Programmpaket (Kabsch 2010) ergab, dass alle getesteten Proteinkristalle die Raumgruppe P1 aufwiesen. Bei dieser Raumgruppe existieren keine Symmetrioperationen, mit denen sich die asymmetrische Einheit auf die

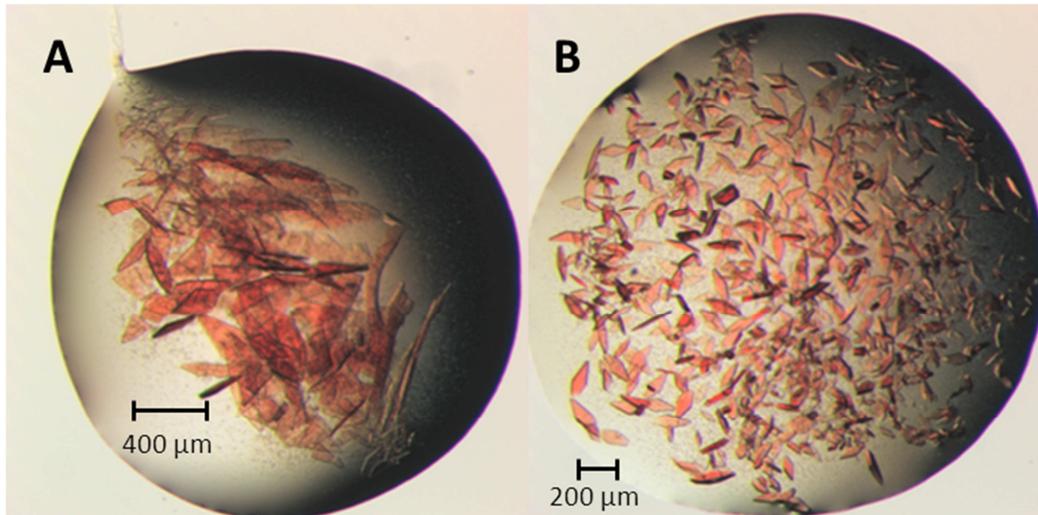
Elementarzelle abbilden lässt. Hieraus folgt, dass für die vollständige Beschreibung eines Kristalls mit der Raumgruppe P1 ein Datensatz über 360° aufgenommen werden müsste. Da Proteinkristalle bei langen Messzeiten jedoch durch die hohe Intensität der Röntgenstrahlung beschädigt werden können, erfolgte eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen, um größere Kristalle mit höherer Symmetrie und Stabilität zu erhalten. Hierzu wurden verschiedene pH-Werte des Puffers als auch unterschiedliche Konzentrationen des Fällungsmittels PEG sowie PEG-Arten mit unterschiedlichen Molekulargewichten getestet. Das Molekulargewicht des Fällungsmittels hatte in den getesteten Bereichen kaum einen erkennbaren Einfluss auf die Morphologie der Kristalle. Im Unterschied dazu konnte durch eine leichte Verringerung der PEG-Konzentration sowie durch Absenken des pH-Wertes eine verringerte Tendenz zur Bildung verwachsener Kristalle in Richtung des Wachstums von Einkristallen, wie in Abbildung 3.9 erkennbar, beobachtet werden. Als beste Bedingung erwies sich 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M Natriumacetat-trihydrat pH 4,2 und 28 % (w/v) PEG 4000.



**Abbildung 3.9:** Einkristalle von CYP106A2. A) Vor Optimierung der Kristallisationsbedingungen in 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M Natriumacetat-trihydrat pH 4,6 und 30 % (w/v) PEG 4000. B) Nach Optimierung der Kristallisationsbedingungen in 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 M Natriumacetat-trihydrat pH 4,2 und 28 % (w/v) PEG 4000.

Da die unter den optimierten Bedingungen gezüchteten Einkristalle deutlich kleiner waren, wurden in einem nächsten Schritt verschiedene Methoden des *Seedings* mit dem Ziel der Züchtung größerer Kristalle getestet. Zu diesem Zweck erfolgte das Einbringen von Impfkristallen einerseits mittels Pferdehaar, andererseits wurde das sogenannte *Microseeding* angewendet. Diese Techniken ermöglichten die Züchtung von größeren und weniger verwachsenen Kristallen. Darüber hinaus konnten durch das *Microseeding* auch CYP106A2 Einkristalle ohne Substrat gezüchtet werden, indem mit Substrat versetzte Kristalle als Kristallisationskeime benutzt wurden (siehe Abbildung 3.10). Diese rhomboedrischen Einkristalle waren jedoch immer noch sehr flach und wiesen eine noch höhere Instabilität auf als die zusammen mit dem Substrat Abietinsäure kristallisierten Varianten: Auch ohne

erkennbare Ursache kam es nach wenigen Tagen zu einem Auseinanderbrechen der Kristalle entlang der Diagonalen. Bei Testmessungen an der Heimröntgenquelle konnte zudem kein Kristall gefunden werden, der mit einer höheren Auflösung als 5 Å streute. Auf eine weitere Analyse der substratfreien Kristalle wurde deshalb verzichtet.



**Abbildung 3.10:** Vergleich zwischen Größe und Morphologie der substratfreien CYP106A2 Kristalle mit unterschiedlichen Seeding-Methoden. A) *Streakseeding* mit Pferdehaar B) *Microseeding*.

Insgesamt betrachtet verliefen die Kristallisationsexperimente äußerst vielversprechend, denn nach früheren erfolglosen Versuchen konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals Einkristalle des CYP106A2 gezüchtet werden. Dies stellt einen entscheidenden Schritt in Richtung der Strukturaufklärung dieses biotechnologisch interessanten Enzyms dar.

### 3.3 Strukturlösung des CYP106A2

Die Aufnahme von Datensätzen der CYP106A2 Kristalle erfolgte an der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) in Grénoble, Frankreich. Nach den zuvor erfolgten Optimierungen des Kristallwachstums in Form einer Absenkung des pH-Wertes und *Seeding* konnte ein Kristall mit höherer Symmetrie identifiziert werden. Dieser wies die Raumgruppe  $P12_11$  mit den Zellparametern  $a=47,060 \text{ \AA}$ ,  $b=114,060 \text{ \AA}$ ,  $c=83,450 \text{ \AA}$  sowie  $\alpha=\gamma=90^\circ$  und  $\beta=103,145^\circ$  auf. Der Matthews-Koeffizient (Matthews 1968) bei zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit betrug 2,22 mit einem korrespondierenden Lösemittelgehalt von 44,16 %. Es wurden insgesamt zwei Datensätze von dem gleichen Kristall aufgenommen, einer mit hoher Auflösung bis  $1,6 \text{ \AA}$  und einer mit einer niedrigeren Auflösung bis  $2,5 \text{ \AA}$ . Diese Datensätze wurden einzeln mit iMosflm prozessiert und in Scala vereinigt. Die Lösung des Phasenproblems erfolgte über die Methode des molekularen Ersatzes. Als Vorlage hierfür diente die Kristallstruktur des thermophilen CYP119 aus dem Archaeon *Sulfolobus solfataricus* (PDB-Eintrag 1F4T). Diese Struktur wurde bereits zuvor bei der Erstellung des Homologie-Modells von CYP106A2 verwendet (Lisurek 2004) und weist zu diesem eine Sequenzidentität von 36 % bei einer Abdeckung von 87 % auf. Ein erstes Strukturmodell wurde mit dem Programm Molrep (Vagin und Teplyakov 1997) erstellt. Dieses Modell deckte etwa 32 % des Proteins ab, wobei die beste Übereinstimmung in der konservierten Region um den Häm-Kofaktor vorhanden war. In fehlerhaften Bereichen und Bereichen mit niedriger Übereinstimmung wurden die Anordnung des Peptid-Rückgrats und das Ergänzen nicht interpretierter Aminosäuren per Hand vorgenommen. Diese manuelle Verfeinerung der Struktur erfolgte in Coot (Emsley und Cowtan 2004), gefolgt von Verfeinerungsschritten mit dem Programm Refmac5 (Murshudov *et al.* 1997). Das Strukturmodell von CYP106A2 wurde bis zu einer Auflösung von  $1,8 \text{ \AA}$  geklärt und umfasst insgesamt 771 Aminosäuren. Die ersten drei Aminosäuren des N-Terminus, ein Bereich von 15 Aminosäuren im BC-Loop (aa66-81) sowie Teile des FG-Loops (aa176-180) konnten aufgrund mangelnder Elektronendichte nicht modelliert werden. Neben zwei Molekülen des CYP106A2 enthielt die asymmetrische Einheit außerdem jeweils den Häm-Kofaktor und 536 Wassermoleküle. Trotz Ko-Kristallisation mit dem Substrat Abietinsäure im 5-fachen molaren Überschuss konnte im aktiven Zentrum über dem Häm keine klar definierte Elektronendichte des Substrats festgestellt werden. Die Struktur konnte bis zu  $R_{\text{cryst}}$  bzw.  $R_{\text{free}}$ -Werten von 16,1 % und 20,4 % verfeinert werden. Weitere statistische Daten des Kristalls und der Verfeinerung sind in Tabelle 3.3 angegeben. 97,9 % der Aminosäuren liegen in energetisch begünstigten Bereichen. Mit Leu174 der Kette A und Val82 der Kette B werden zwei Aminosäuren in verbotenen Regionen angezeigt (siehe Abbildung 3.11). Die Struktur von CYP106A2 entspricht der für Cytochrome P450 typischen Gesamtfaltung mit einer trigonalen Struktur und Abmessungen von etwa  $50 \times 50 \times 40 \text{ \AA}^3$ . Die Benennung der Sekundärstrukturelemente erfolgte nach der für Cytochrom P450 Enzyme üblichen Nomenklatur. Das

Protein besteht aus 13  $\alpha$ -Helices A-L sowie 10  $\beta$ -Faltblattsträngen, die in 3  $\beta$ -Faltblättern (1, 3 und 4 nach gängiger CYP-Nomenklatur) arrangiert sind. Beim CYP106A2 liegt vor der A-Helix am N-terminalen Ende des Proteins noch ein kurzes  $\alpha$ -helikales Segment A'. Die Sekundärstruktur im Bereich der P450  $\beta$ -Faltblätter 2 und 5 ist beim CYP106A2 nur schwach ausgeprägt. Im Bereich zwischen den Helices H und I, bei dem in anderen P450-Strukturen das  $\beta$ 5-Faltblatt aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Strängen liegt, findet sich lediglich eine Wasserstoffbrückenbindung im Rückgrat der Reste Val223 und Glu226. Ähnlich verhält es sich in der Region der  $\beta$ -Domäne zwischen den Strängen  $\beta$ 3 und  $\beta$ 4. An Stelle eines weiteren zweisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts ist die Interaktion des Proteinrückgrats auf die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asn302 und Leu309 beschränkt.

**Tabelle 3.3:** Statistische Werte der Datensammlung und Verfeinerung des CYP106A2.

Datensammlung und -prozessierung	CYP106A2	
<b>Datensatz</b>	<b>Low resolution (2,5 Å)</b>	<b>High resolution (1,6 Å)</b>
Röntgenquelle	ID14-4	ID14-4
Detektor	Q315r ADSC CCD	Q315r ADSC CCD
Wellenlänge [Å]	0,939	0,939
Temperatur [K]	100	100
Abstand Kristall-Detektor [mm]	379,594	222,244
Belichtungsdauer [s]	0,2	1
Oszillation/Bild [°]	0,5	0,5
Gesamtoszillation	200	200
Statistiken der zusammengeführten Datensätze (Scala)		
Raumgruppe	P12 <sub>1</sub> 1	
Zelldimensionen		
a/b/c [Å]	47,060/114,060/83,450	
$\alpha/\beta/\gamma$ [°]	90/103,145/90	
Auflösungsgrenze [Å]	1,8 (1,9-1,8)	
Vollständigkeit [%] <sup>1</sup>	100 (100)	
Anzahl der observierten Reflexe		
alle	445872	
unabhängig	79257	
Durchschnittliche Redundanz <sup>1</sup>	5,6 (4,0)	
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ <sup>1</sup>	7,5 (3,0)	
$R_{\text{meas}}$ <sup>1,2</sup>	16,7 (36,9)	
$R_{\text{p.i.m.}}$ <sup>1,3</sup>	6,4 (18,2)	
B-Faktor aus Wilson-Plot [Å <sup>2</sup> ]	29,7	
Verfeinerung		
Auflösungsgrenze [Å] <sup>1</sup>	1,8 (1,847-1,800)	
Anzahl der unabhängigen Reflexe <sup>1</sup>	75208 (5571)	
Vollständigkeit der Daten [%] <sup>1</sup>	99,91 (100)	
$R_{\text{cryst}}$ [%] <sup>1,4</sup>	16,14 (18,4)	
$R_{\text{free}}$ [%] <sup>1,5</sup>	20,41 (22,9)	
Anzahl der Atome		
Protein	6425	
Lösungsmittel	544	
Ramachandran-Plot <sup>6</sup>		
favorisiert	90,2	
erlaubt	9,8	
ungünstig	0	
Koordinatenfehler [Å] <sup>7</sup>	0,174	
Rms-Abweichung von idealen Werten		
Bindungslängen [Å]	0,022	
Bindungswinkel [°]	2,120	
Durchschnittlicher B-Faktor [Å <sup>2</sup> ]		
Peptid-Rückgrat	Kette A: 21,754	Kette B: 23,029
Seitenketten	Kette A: 26,487	Kette B: 27,576
Lösungsmittel	36,087	

Legende:

<sup>1</sup> Werte für die Schale mit der höchsten Auflösung in Klammern

$$^2 R_{meas} = \sum_{\mathbf{h}} \left( \frac{n_{\mathbf{h}}}{n_{\mathbf{h}}-1} \right) \sum_l |I_{hl} - \langle I_{\mathbf{h}} \rangle| / \sum_{\mathbf{h}} \sum_l \langle I_{\mathbf{h}} \rangle$$

$$^3 R_{p.i.m.} = \sum_{\mathbf{h}} \left( \frac{1}{n_{\mathbf{h}}-1} \right) \sum_l |I_{hl} - \langle I_{\mathbf{h}} \rangle| / \sum_{\mathbf{h}} \sum_l \langle I_{\mathbf{h}} \rangle$$

mit  $n_{\mathbf{h}}$  als Anzahl der Observationen von Reflex  $\mathbf{h}$ ,  $I_{hl}$  gleich der  $l$ -ten Observation von Reflex  $\mathbf{h}$ , und  $\langle I_{\mathbf{h}} \rangle$  der gewichteten durchschnittlichen Intensität aller Observationen  $l$  von Reflex  $\mathbf{h}$  (Evans 2006)

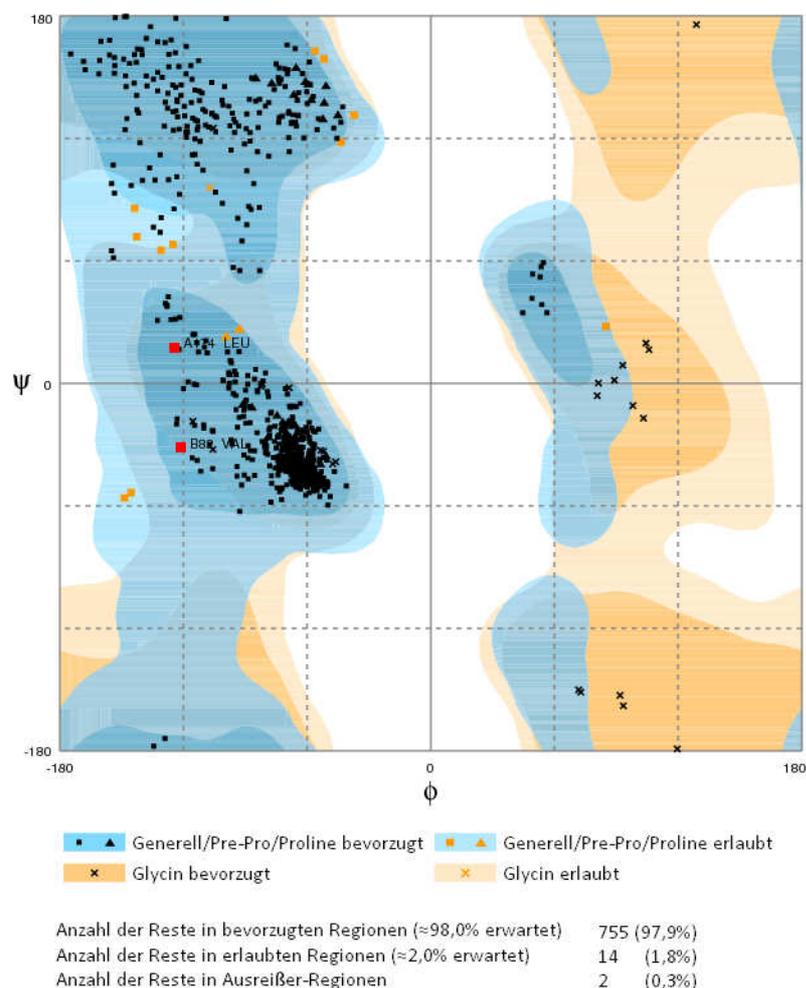
$$^4 R_{cryst} = 100 \sum | |F_{obs}| - |F_{calc}| | / \sum |F_{obs}|$$

mit  $F_{obs}$  und  $F_{calc}$  als den gemessenen bzw. berechneten Strukturfaktor-Amplituden

<sup>5</sup> Die Berechnung von  $R_{free}$  erfolgt analog zur Berechnung von  $R_{cryst}$  unter Ausschluss von 5 % der Reflexe (Brünger 1992)

<sup>6</sup> Berechnet mit PROCHECK (Laskowski *et al.* 1993)

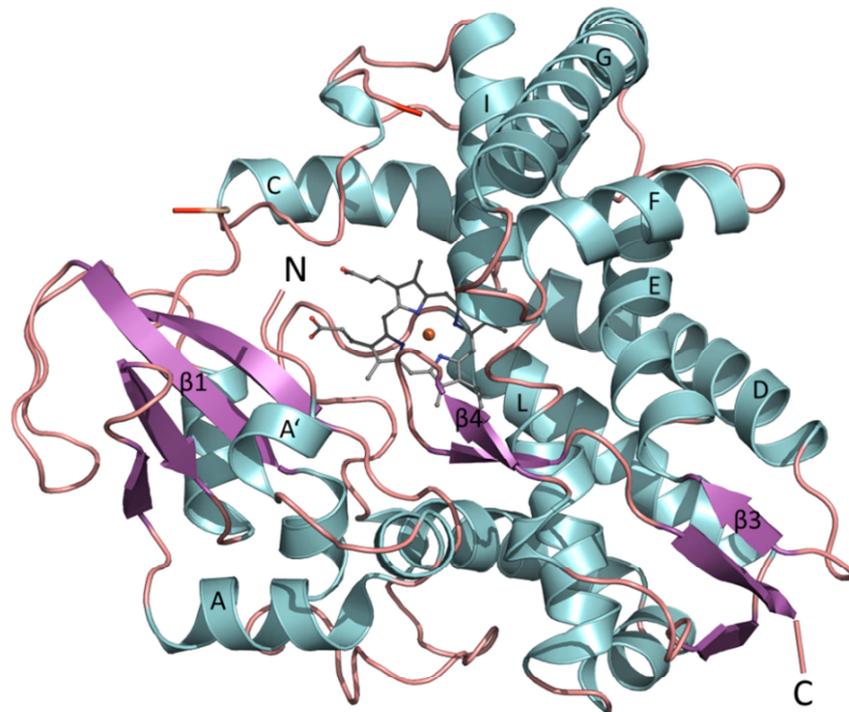
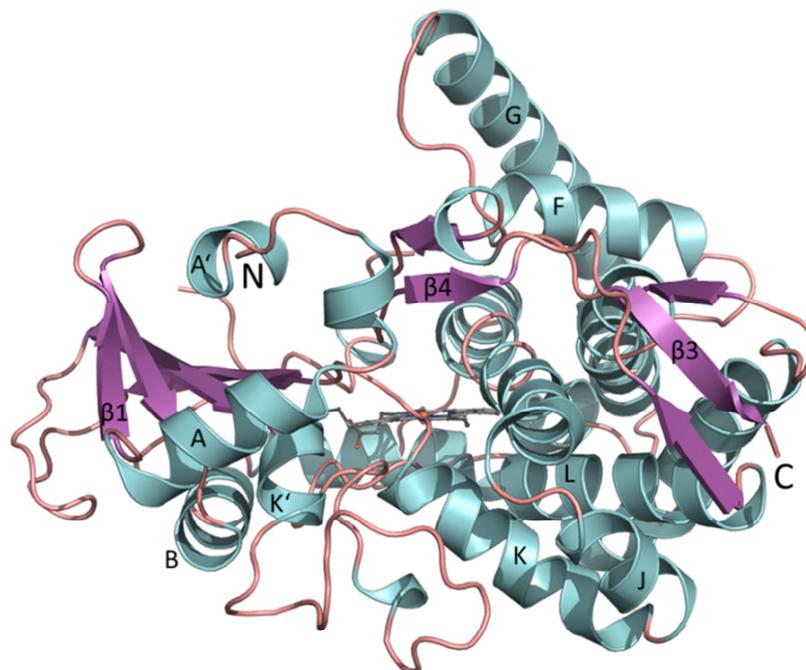
<sup>7</sup> Berechnet mit SFCHECK (Vaguine *et al.* 1999), basierend auf einem Luzzati-Plot



**Abbildung 3.11:** Ramachandran-Diagramm der Struktur von CYP106A2, berechnet mit RAMPAGE (Lovell *et al.* 2002).

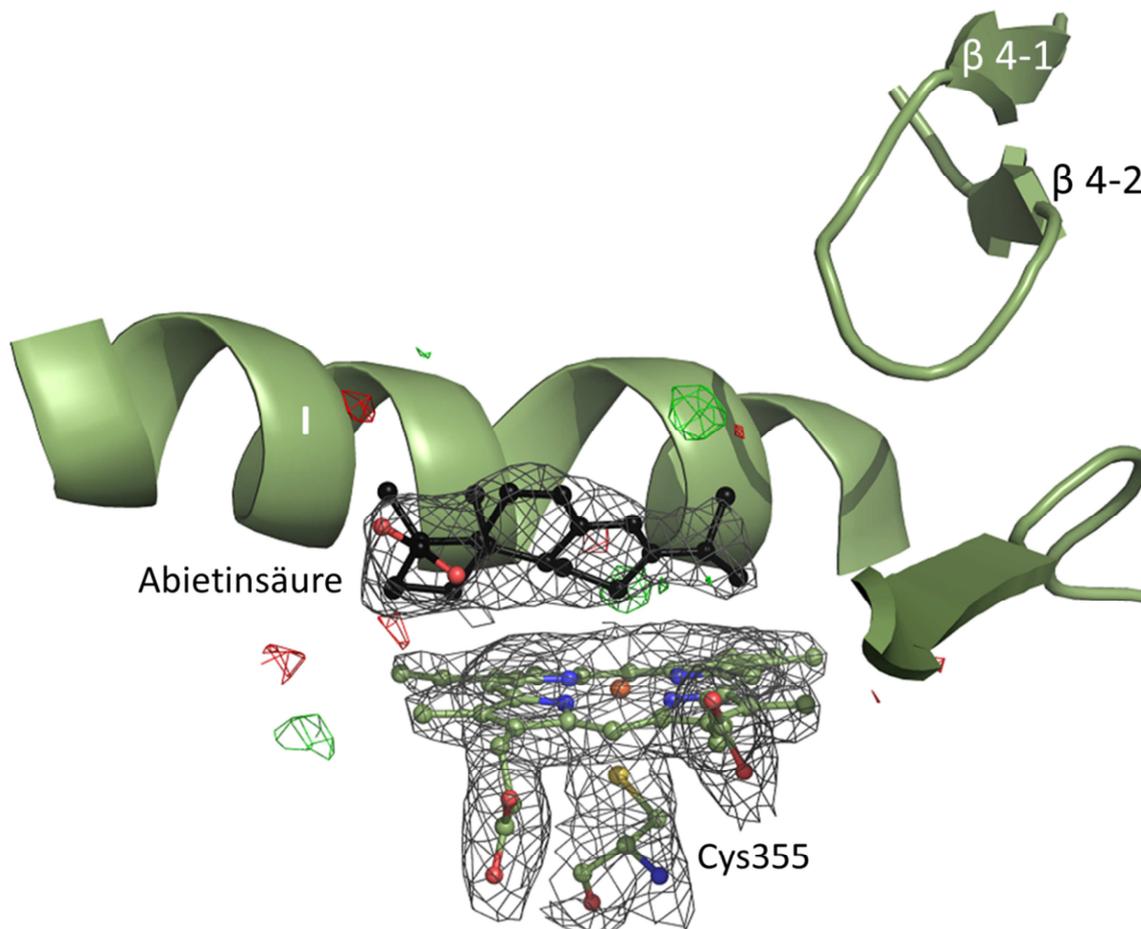
Eine Übersicht über die Gesamtstruktur des CYP106A2 gibt Abbildung 3.12. Das auffälligste Sekundärstrukturelement ist die prominente I-Helix, welche mit einer Länge von 50 Å das gesamte Molekül durchspannt. Sie ist Teil der Kernstruktur aus dem konservierten Helixbündel aus den Helices D, E, I und L. Der Häm-Kofaktor liegt zwischen den Helices I und L und bildet die untere

Begrenzung der Substratbindetasche. Der Schwefel des Cysteinrestes 355 im Loop vor dem N-terminalen Ende der L-Helix fungiert als axialer Ligand des Häm-Eisenatoms.

**A****B**

**Abbildung 3.12:** Übersicht der Gesamtstruktur des CYP106A2 bei einer Auflösung von 1,8 Å in Cartoon-Darstellung. A) Aufsicht von der distalen Seite und B) Seitenansicht. Die Sekundärstrukturelemente sind nach der CYP-üblichen Nomenklatur benannt und der Häm-Kofaktor ist als Kugel-Stab-Modell dargestellt.

Am Synchrotron erfolgte außerdem die Aufnahme weiterer Datensätze von CYP106A2 Kristallen, die unter Verwendung eines Additiv-Screens gezüchtet wurden. Für den molekularen Ersatz wurden die Strukturdaten der zuvor aufgeklärten CYP106A2 Struktur verwendet. Wie sich zeigte, wiesen alle der weiteren untersuchten CYP106A2 Kristalle die Raumgruppe P1 mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit auf. Dabei wies der Datensatz eines Kristalls, der mit 10 mM Calciumchlorid Dihydrat als Additiv gezüchtet wurde, bei einem der beiden Proteinmoleküle in der Elementarzelle eine gut definierte Elektronendichte direkt über dem Häm im aktiven Zentrum auf. Die Auflösungsgrenze des Datensatzes betrug 2,23 Å bei einer im Vergleich zu den anderen Datensätzen niedrigeren Vollständigkeit von 92,7 %. Die Daten des vorläufigen Stands der Strukturaufklärung sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die Elektronendichte im aktiven Zentrum ließ sich sehr gut mit einem gebundenen Abietinsäure-Molekül beschreiben (siehe Abbildung 3.13). An dieser Stelle sei auf die hohen R-Werte und Temperaturfaktoren des Datensatzes hingewiesen. Die Bereiche des strukturellen Kerns um das aktive Zentrum waren jedoch gut definiert. Da es sich hierbei außerdem um den einzigen Datensatz mit gebundenem Substratmolekül und Elektronendichte im Bereich des BC-Loops handelte, erfolgte die Analyse der Daten für eine spätere Diskussion unter Einbeziehung dieser Gesichtspunkte.



**Abbildung 3.13:** Aktives Zentrum des CYP106A2 mit gebundener Abietinsäure. Die Elektronendichte-Karte für das Häm, den Cysteinrest 355 sowie das DMSO-Molekül und die Abietinsäure ist mit 1,0  $\sigma$  konturiert. Die  $F_o-F_c$  Elektronendichte-Karte ist bei 3,0  $\sigma$  (blau) und -3,0  $\sigma$  (rot) konturiert.

**Tabelle 3.4:** Statistische Werte der Datensammlung und vorläufigen Verfeinerung des CYP106A2 mit gebundenem Substrat.

Datensammlung und -prozessierung	CYP106A2
<b>Datensatz</b>	<b>CYP106A2 mit Substrat</b>
Röntgenquelle	ID14-4
Detektor	Q315r ADSC CCD
Wellenlänge [Å]	0,939
Temperatur [K]	100
Abstand Kristall-Detektor [mm]	362,188
Belichtungsdauer [s]	0,5
Oszillation/Bild [°]	0,5
Gesamtoszillation	400
Raumgruppe	P1
Zelldimensionen	
a/b/c [Å]	49,060/57,480/84,530
$\alpha/\beta/\gamma$ [°]	72,41/75,06/75,30
Auflösungsgrenze [Å]	2,23 (2,33-2,23)
Vollständigkeit [%] <sup>1</sup>	92,7 (83,0)
Anzahl der observierten Reflexe	
alle	149910
unabhängig	37636
Durchschnittliche Redundanz <sup>1</sup>	4,0 (3,8)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ <sup>1</sup>	10,1 (3,3)
<b>Verfeinerung (vorläufiger Stand)</b>	
Auflösungsgrenze [Å] <sup>1</sup>	2,23 (2,289-2,231)
Anzahl der unabhängigen Reflexe <sup>1</sup>	34984 (1868)
Vollständigkeit der Daten [%] <sup>1</sup>	90,66 (66,13)
$R_{cryst}$ [%] <sup>1,2</sup>	20,71 (31,8)
$R_{free}$ [%] <sup>1,3</sup>	28,63 (38,8)

Legende:

<sup>1</sup> Werte für die Schale mit der höchsten Auflösung in Klammern

$$^2 R_{cryst} = 100 \sum (|F_{obs}| - |F_{calc}|) / \sum |F_{obs}|$$

mit  $F_{obs}$  und  $F_{calc}$  als den gemessenen bzw. berechneten Strukturfaktor-Amplituden

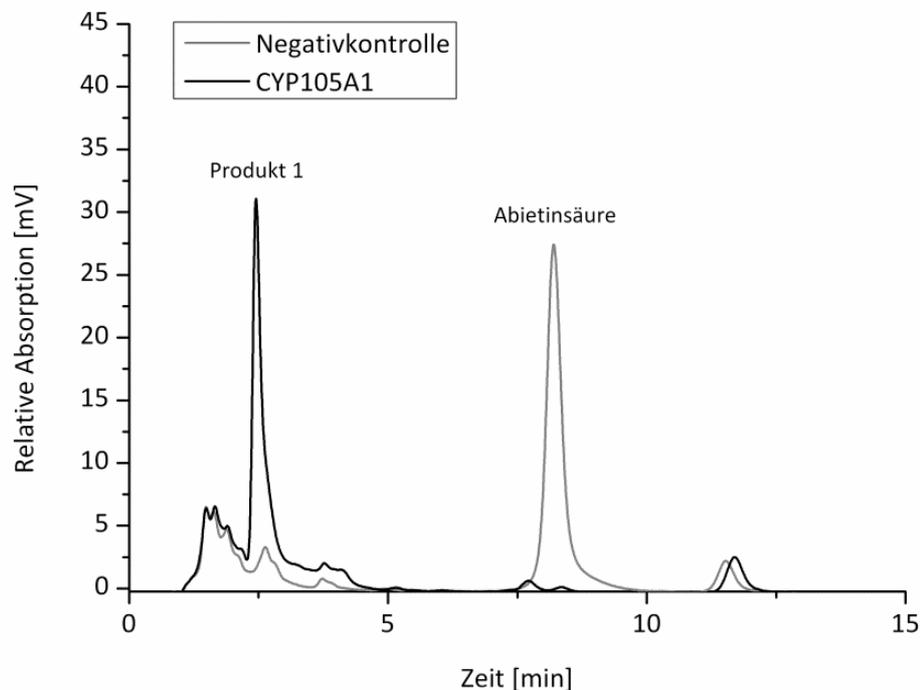
<sup>3</sup> Die Berechnung von  $R_{free}$  erfolgt analog zur Berechnung von  $R_{cryst}$  unter Ausschluss von 5 % der Reflexe (Brünger 1992)

Als Fazit war nach der vielversprechenden Kristallisation des CYP106A2 auch die Strukturlösung des Enzyms erfolgreich. Neben wertvollen Erkenntnissen über die Faltung des Proteins sowie den Aufbau des aktiven Zentrums und der Wechselwirkungsdomäne mit den Redoxpartnern ermöglichte darüber hinaus die Struktur des Enzyms mit gebundenem Substrat die Betrachtung und Diskussion entscheidender Aspekte bei der Bindung von Abietinsäure.

### 3.4 In vitro Charakterisierung der Harzsäuren mit CYP105A1

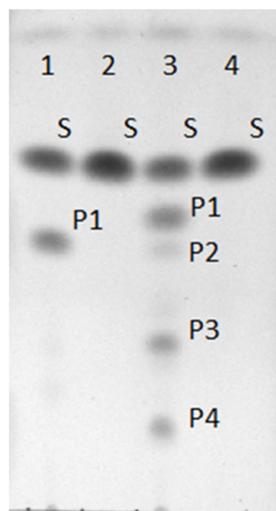
#### 3.4.1 In vitro Substratumsätze

Neben CYP106A2 wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres bakterielles P450-Enzym in Bezug auf Bindung und Umsatz der Harzsäuren untersucht. Im Rahmen der Erweiterung des Substratspektrums von CYP105A1 aus *Streptomyces griseolus* konnte über die Hydroxylierung der Antidiabetika Glimperid und Glibenclamid (Kleser *et al.* 2012) hinaus auch eine Aktivität gegenüber der Abietinsäure beobachtet werden. Um dies zu bestätigen, wurde analog zu den *in vitro* Rekonsitutionsassays mit CYP106A2 ein Substratumsatz mit den heterologen Redoxpartnern Arh1 und Etp1<sup>skf</sup> aus *S. pombe* durchgeführt. Wie in Abbildung 3.14 zu erkennen ist, konnte die Transformation der Abietinsäure durch das CYP105A1 in ein einziges Produkt bestätigt werden. Hierbei handelt es sich aufgrund der geringeren Retentionszeit von  $t_R=2,52 \pm 0,05$  min im Vergleich zu dem Substrat mit großer Wahrscheinlichkeit um eine monohydroxylierte Variante. Neben dem Unterschied in Bezug auf die Anzahl der gebildeten Produkte wurde außerdem eine vollständige Abnahme des Substratpeaks beobachtet, was bedeutet, dass CYP105A1 im Vergleich zu CYP106A2 in der Lage war, Abietinsäure in der eingesetzten Konzentration von 200  $\mu$ M innerhalb der Reaktionszeit von 30 Minuten vollständig umzuwandeln.



**Abbildung 3.14:** HPLC-Chromatogramm des *in vitro* Umsatzes von Abietinsäure mit CYP105A1. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 500  $\mu$ l in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems bei 30 °C für 30 min. Anschließend erfolgte die zweifache Extraktion mit Ethylacetat. Die HPLC-Analyse wurde mit Methanol/Wasser (85:15 + 0,1 % Essigsäure) durchgeführt und die Detektion der Substanzen erfolgte bei 240 nm. Die Negativkontrolle ohne Zusatz von CYP105A1 zum Reaktionsansatz ist in grau dargestellt.

Da der Abietinsäure-Umsatz bestätigt werden konnte, wurden auch die sieben anderen Harzsäuren der Diterpenoid-Substanzbibliothek *in vitro* auf möglichen Umsatz getestet. Die Analyse erfolgte wie zuvor beschrieben mittels Dünnschichtchromatographie. Abbildung 3.15 zeigt beispielartig die Ergebnisse des Umsatzes von Sandaracopimarsäure und Pimarsäure. Die DC-Chromatogramme der Umsätze der anderen Substanzen sind im Anhang (6.3) aufgeführt.



**Abbildung 3.15:** DC-Analyse des CYP105A1 Umsatzes mit Sandaracopimarsäure (Spur 1) und Pimarsäure (Spur 3). Die Negativkontrollen ohne Enzym sind in Spur 2 und 4 aufgetragen. Die DC-Analyse wurde mit Hexan/Ethylacetat (70:30 + 1 % Essigsäure) durchgeführt und die Detektion der Substanzen erfolgte durch Färbung mit Anisaldehyd.

Wie das CYP106A2 war das auch CYP105A1 in der Lage, sämtliche Harzsäuren sowohl des Abietan- als auch des Pimaran-Typs umzusetzen. Anders als beim CYP106A2 zeigten sich hierbei jedoch deutliche Unterschiede in der Selektivität, was sich durch den Vergleich der Produktbildung in Abbildung 3.15 erkennen lässt. Während die Sandaracopimarsäure in ein einziges Hauptprodukt überführt wird, entstehen bei der Reaktion der Pimarsäure mit dem CYP105A1 mindestens vier verschiedene Produkte in unterschiedlichem Mengenverhältnis. Im Gegensatz zum CYP106A2 scheint also die Anordnung der Doppelbindungen bei den Harzsäuren einen größeren Einfluss auf das Hydroxylierungsmuster zu haben. Um darüber hinaus auch den Einfluss der funktionellen Gruppe am C4 zu überprüfen, wurden ebenfalls die Olefine, Alkohole und Aldehyde auf Umsatz getestet. Die DC-Platten der Reaktionen sind im Anhang (6.3) aufgeführt und die Ergebnisse in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

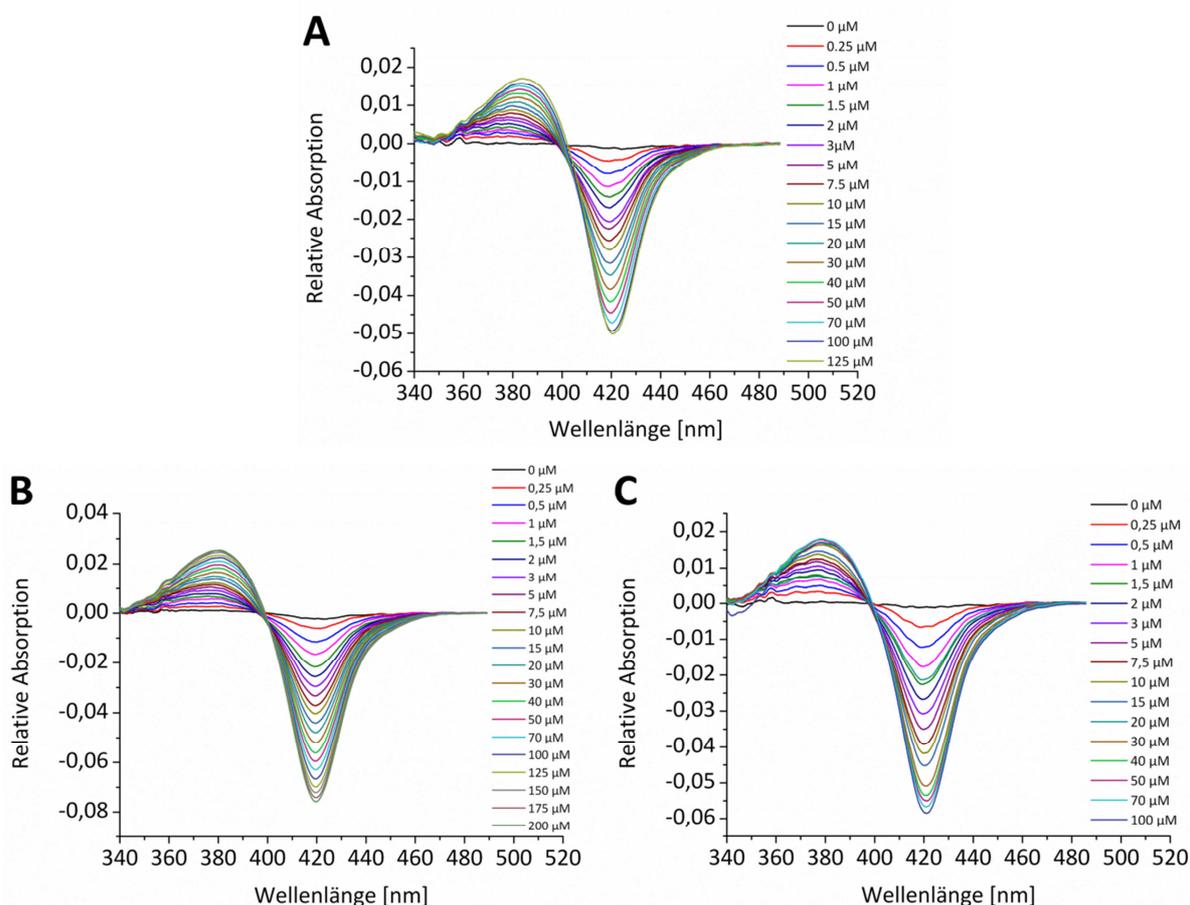
**Tabelle 3.4:** Zusammenfassung der Ergebnisse des Substratumsatzes der Diterpenoid-Verbindungen mit CYP105A1 aus *S. griseolus*.

Verbindung	Umsatz mit CYP105A1
Olefine	Kein Umsatz
Alkohole	Schwacher Umsatz, mehrere Produkte
Aldehyde	Kein Umsatz
Säuren	Umsatz, unterschiedliche Zahl an Produkten

Wie bereits zuvor für das CYP106A2 beobachtet, war auch das CYP105A1 nicht in der Lage, die Olefine umzusetzen. Auch die schwache Umwandlung der Alkohole in mehrere Produkte wurde bereits zuvor mit dem CYP106A2 beobachtet. Ein wesentlicher Unterschied war jedoch, dass keiner der Aldehyde durch das CYP105A1 umgesetzt werden konnte.

### 3.4.2 Typ-I-Differenzspektroskopie

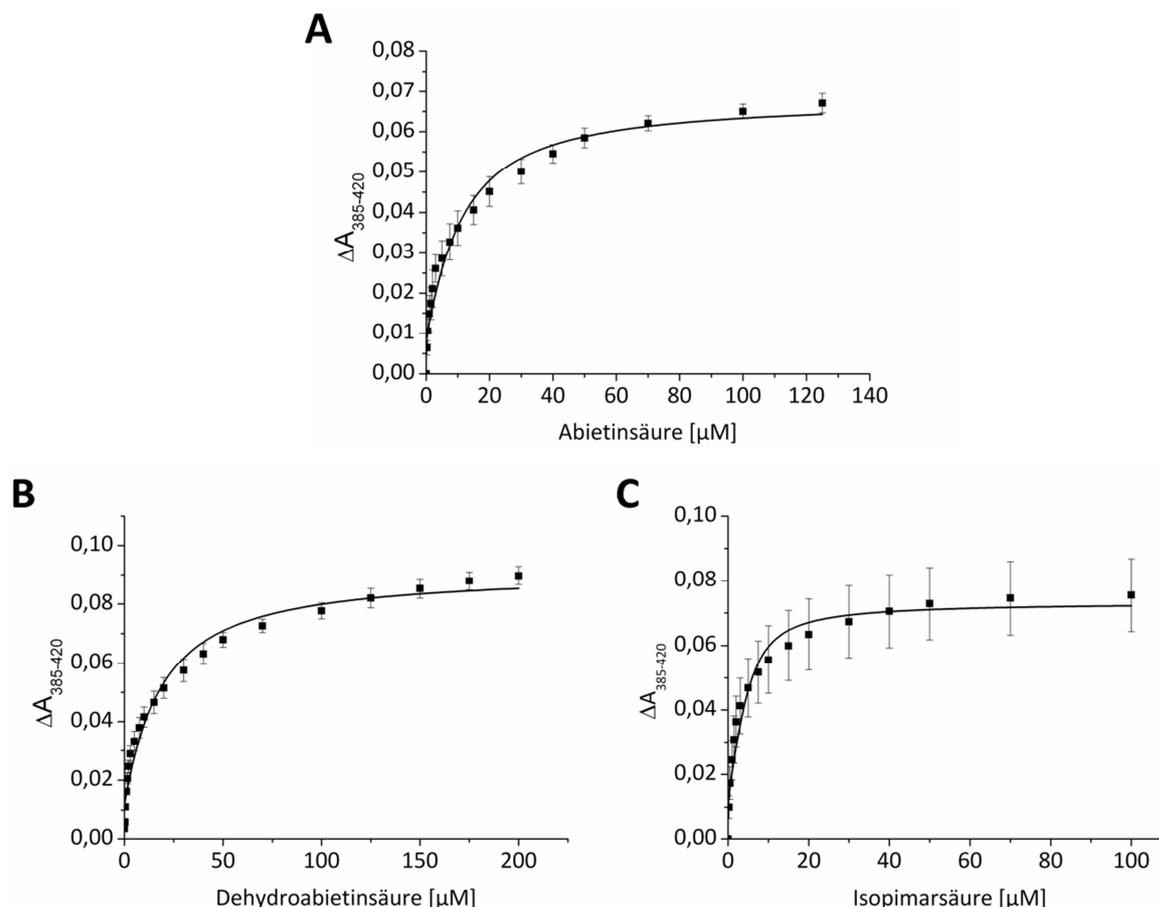
Um die Bindung der Harzsäuren im aktiven Zentrum des CYP105A1 näher zu untersuchen, wurden mit der Abietinsäure, Dehydroabietinsäure und Isopimarsäure differenzspektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Wie in Abbildung 3.16 erkennbar, lösten alle drei getesteten Substrate einen deutlichen Typ-I-Shift aus, was auf eine unterschiedliche Art der Bindung im aktiven Zentrum im Vergleich zum CYP106A2 hindeutet.



**Abbildung 3.16:** Differenzspektren von CYP105A1 mit A) Abietinsäure, B) Dehydroabietinsäure und C) Isopimarsäure. 5 µM CYP105A1 in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) wurden mit steigenden Mengen der jeweiligen Verbindung versetzt. Die Aufnahme der Differenzspektren erfolgte jeweils nach 2-minütiger Inkubationszeit.

Die Ermittlung der Dissoziationskonstanten der Substanzen (siehe Abbildung 3.17 und Tabelle 3.5) erfolgte wie zuvor beschrieben durch hyperbolische Regression. Dabei liegt der für die Abietinsäure bestimmte  $K_d$ -Wert von  $8,75 \pm 2,06 \mu\text{M}$  etwa in der gleichen Größenordnung wie der  $K_d$ -Wert für Dehydroabietinsäure mit  $10,66 \pm 2,64 \mu\text{M}$ . Im Unterschied dazu zeigte die Isopimarsäure vom

Pimaran-Typ mit einem  $K_d$ -Wert von  $1,75 \pm 0,73 \mu\text{M}$  eine deutlich höhere Affinität zum CYP105A1. Generell liegen diese Werte etwa um den Faktor 6-10 niedriger als beim CYP106A2. Die Substrate zeigen also eine wesentlich stärkere Affinität zum CYP105A1 als zum CYP106A2.



**Abbildung 3.17:** Substratsättigungskurven von CYP105A1 mit A) Abietinsäure, B) Dehydroabietinsäure und C) Isopimarsäure. Die Bestimmung erfolgte durch das Auftragen der Absorptionsdifferenzen in Abhängigkeit der eingesetzten Substratkonzentration und anschließende hyperbolische Regression gemäß der Funktion  $f(x)=y_0+ax/(b+x)$ . Jede Titration wurde dreimal durchgeführt, und die entsprechenden Mittelwerte wurden bestimmt.

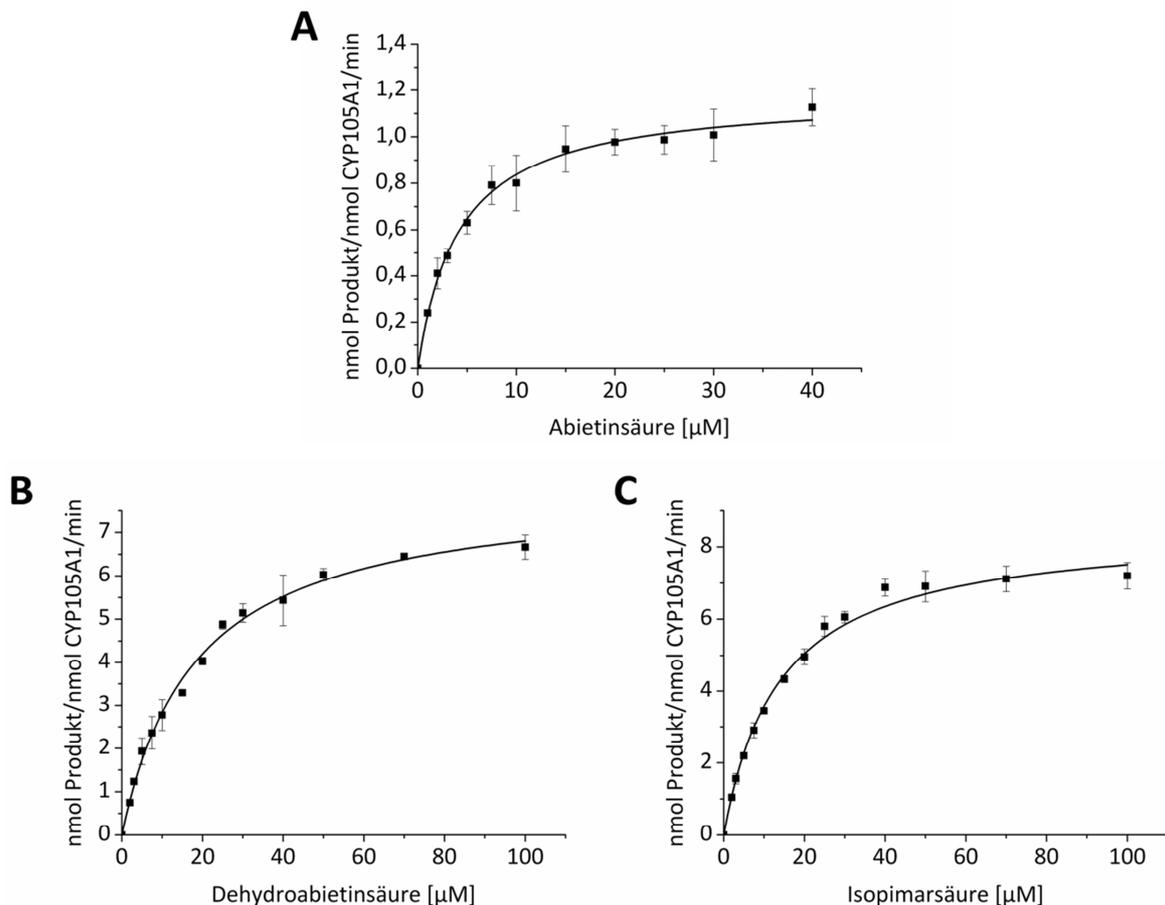
**Tabelle 3.5:** Dissoziationskonstanten und Regressionskoeffizienten der getesteten Substrate für CYP105A1.

Verbindung	Dissoziationskonstante $K_d$ [ $\mu\text{M}$ ]	Regressionskoeffizient $R^2$
Abietinsäure	$8,75 \pm 2,06$	0,969
Dehydroabietinsäure	$10,66 \pm 2,64$	0,957
Isopimarsäure	$1,75 \pm 0,73$	0,950

### 3.4.3 Katalytische Aktivität des CYP105A1

Für eine detailliertere Untersuchung und Quantifizierung der Reaktionsgeschwindigkeit wurden kinetische Analysen der Enzymaktivität des CYP105A1 gegenüber den Substraten Abietinsäure, Dehydroabietinsäure und Isopimarsäure durchgeführt. Die Michaelis-Konstante ( $K_m$ ) wurde ermittelt, indem konstante Mengen von CYP105A1 und den Redoxpartnern Arh1 und Etp1<sup>skf</sup> mit steigenden

Mengen an Substrat versetzt wurden bis die Substratsättigung des Enzyms erreicht war. Dabei wurden die Inkubationszeiten so gewählt, dass die Produktmenge nie mehr als 10 % der eingesetzten Substratmenge betrug. Die erhaltenen Daten wurden zur Bestimmung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte einer hyperbolischen Regression unterzogen (siehe Abbildung 3.18)



**Abbildung 3.18:** Reaktionsgeschwindigkeit des Umsatzes von CYP105A1 mit A) Abietinsäure, B) Dehydroabietinsäure und C) Isopimarsäure. Die Reaktionen erfolgten in 250  $\mu\text{l}$  50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems. Die Auswertung erfolgte mittels hyperbolischer Regression gemäß der Gleichung  $f(x)=y_0+ax/(b+x)$ . Jede Reaktion wurde dreimal durchgeführt, und die entsprechenden Mittelwerte wurden bestimmt.

Die Zugabe von Abietinsäure erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 1-40  $\mu\text{M}$ . Die Reaktionsdauer betrug 1 min bei einer Temperatur von 30  $^{\circ}\text{C}$ . Der ermittelte  $K_m$ -Wert der Hydroxylierung betrug  $4,12 \pm 0,30 \mu\text{M}$  bei einem  $V_{max}$  von  $1,18 \pm 0,02$  nmol Produkt pro nmol CYP105A1 pro Minute. Im Unterschied zu den von Bleif *et al.* (2011) ermittelten kinetischen Parametern für den Abietinsäureumsatz mit CYP106A2 ( $K_m$ -Wert:  $113 \pm 15 \mu\text{M}$ ,  $V_{max}$  von  $22 \pm 1$  nmol Produkt pro nmol CYP106A2 pro Minute) ergab sich somit ein geringerer  $K_m$ -Wert, was bedeutet, dass eine deutlich niedrigere Substratkonzentration zur Besetzung der Bindestelle im aktiven Zentrum nötig ist. Dieses Ergebnis stützt die vorherige Beobachtung der höheren Affinität der Abietinsäure gegenüber dem CYP105A1 im Vergleich zum CYP106A2. Insgesamt wird dies allerdings

durch eine deutlich geringere maximale Reaktionsgeschwindigkeit des CYP105A1 im Vergleich zum CYP106A2 teilweise wieder ausgeglichen.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität des CYP105A1 gegenüber Dehydroabietinsäure und Isopimarsäure erfolgte die Zugabe der Substrate in einem Konzentrationsbereich von 2 bis 100  $\mu\text{M}$ . Die einzelnen Ansätze wurden für 3 Minuten bei 30 °C inkubiert. Hieraus ergaben sich  $K_m$ -Werte von  $18,33 \pm 1,2 \mu\text{M}$  für Dehydroabietinsäure und  $13,86 \pm 0,84 \mu\text{M}$  für die Isopimarsäure. Zwar sind für diese Substrate also höhere Konzentrationen als im Falle der Abietinsäure nötig, um die Bindestellen des Enzyms zu besetzen, allerdings waren die ermittelten  $V_{\text{max}}$ -Werte mit  $8,05 \pm 0,19 \mu\text{M}$  (Dehydroabietinsäure) und  $8,55 \pm 0,18 \mu\text{M}$  (Isopimarsäure) etwa um den Faktor sieben höher. Zum Vergleich sind die erhaltenen Daten mit den zugehörigen Regressionskoeffizienten in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

**Tabelle 3.6:** Ermittelte  $K_m$ - und  $V_{\text{max}}$ -Werte sowie die zugehörigen Regressionskoeffizienten für die Reaktion von CYP105A1 mit Abietinsäure, Dehydroabietinsäure und Isopimarsäure.

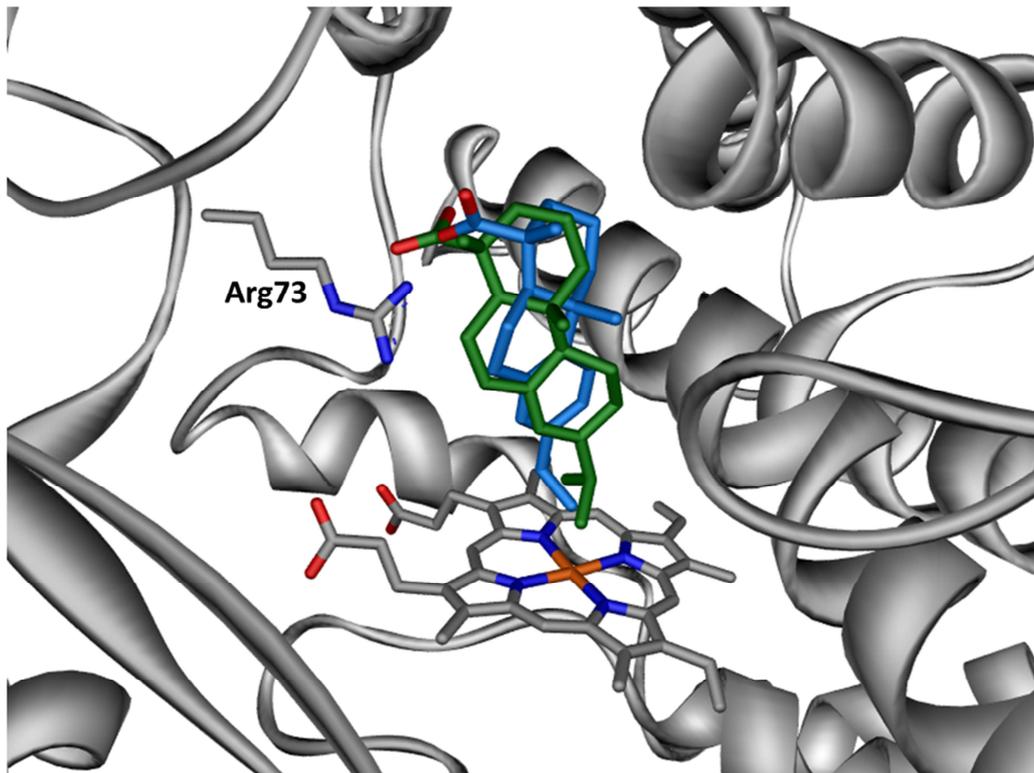
Verbindung	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [nmol Prod./nmol CYP/min]	$R^2$
Abietinsäure	$4,12 \pm 0,30$	$1,18 \pm 0,02$	0,993
Dehydroabietinsäure	$18,33 \pm 1,20$	$8,05 \pm 0,19$	0,995
Isopimarsäure	$13,86 \pm 0,84$	$8,55 \pm 0,18$	0,995

Als Resümee der *in vitro* Charakterisierung lässt sich festhalten, dass alle getesteten Diterpen-Harzsäuren als neue Substrate des CYP105A1 identifiziert werden konnten. Unterschiede in der Substratselektivität im Vergleich zum CYP106A2 zeigten sich dadurch, dass die Aldehyde keine Substrate des CYP105A1 sind. Darüber hinaus deuteten besonders die im Vergleich zum CYP106A2 wesentlich niedrigeren  $K_d$ - und  $K_m$ -Werte der Harzsäuren auf eine deutlich höhere Affinität gegenüber dem CYP105A1 hin. In Verbindung mit der selektiven Reaktion, die zur Bildung eines einzigen Hauptprodukts beim Harzsäure-Umsatz führt, ist das CYP105A1 damit ein vielversprechender Kandidat für die biotechnologische Funktionalisierung dieser Substratklasse.

### 3.5 Docking-Studien mit CYP105A1

Um einen Hinweis auf die Bindung und Orientierung der Substrate im aktiven Zentrum und damit die mögliche Hydroxylierungsposition zu erhalten, wurden Substrat-Dockingstudien durchgeführt. Diese Arbeiten wurden von Herrn PD Dr. Michael Hutter vom Zentrum für Bioinformatik der Universität des Saarlandes ausgeführt.

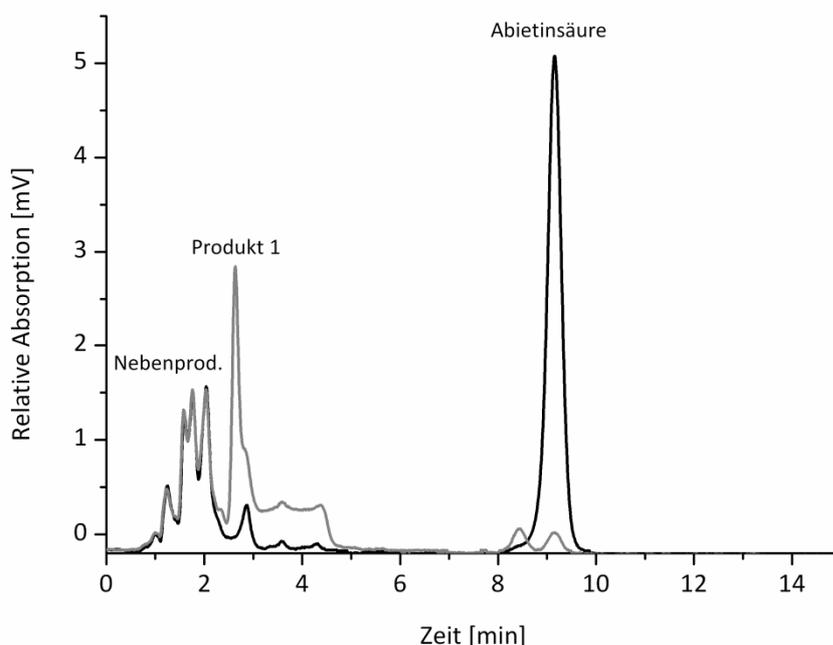
Durch die Docking-Studien konnte gezeigt werden, dass die Harzsäuren in einer Orientierung im aktiven Zentrum des Enzyms koordiniert sind, die die Isopropylgruppe der Abietane bzw. die Vinylgruppe der Pimarane direkt über dem Häm positioniert. Einen großen Einfluss scheint dabei die Guanidingruppe des Arginin 73 zu haben, das über Salzbrücken die Carboxylgruppe der entsprechenden Harzsäure stabilisiert (siehe Abbildung 3.19). Die zentrale Rolle des Arg73 im aktiven Zentrum konnte bereits von Sugimoto *et al.* (2008) gezeigt werden, wobei eine deutliche Steigerung der katalytischen Aktivität sowohl der 1 $\alpha$  als auch der 25-Hydroxylierung von Vitamin D<sub>3</sub> durch die ortsgerichtete Mutagenese R73A eine eher hinderliche Rolle bei der Bindung dieses Substrats belegt. Um eine Erklärung für den scheinbar deutlich weniger selektiven Umsatz der alkoholischen Substrate zu finden, wurden zusätzliche Docking-Studien mit Abietadienol durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass für dieses Substrat prinzipiell zwei unterschiedliche Docking-Positionen möglich sind. Die erste entspricht der Orientierung der Carbonsäuren im aktiven Zentrum mit der Isopropylfunktion über dem zentralen Eisenatom und C16 und C17 in ausreichender Nähe für eine mögliche Hydroxylierung. Bei der zweiten Docking-Position ist das Substrat um 180° entlang der longitudinalen Achse gedreht, wodurch die Methylgruppe und der Alkoholsubstituent am C4 über dem Häm positioniert werden. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit den Daten der *in vitro* Umsätze überein, bei denen für die unterschiedlichen Substrate mit Alkoholfunktion die Bildung von mindestens drei verschiedenen Produkten beobachtet werden konnte.



**Abbildung 3.19:** Das aktive Zentrum von CYP105A1 mit den besten Docking-Orientierungen für die Hydroxylierung von Abietinsäure (grün) und Dehydroabietinsäure (blau). Die prosthetische Häm-Gruppe, die Substrat-Moleküle sowie die Aminosäure R73, über die das Substrat mit Salzbrücken stabilisiert wird, sind als Stabmodell dargestellt.

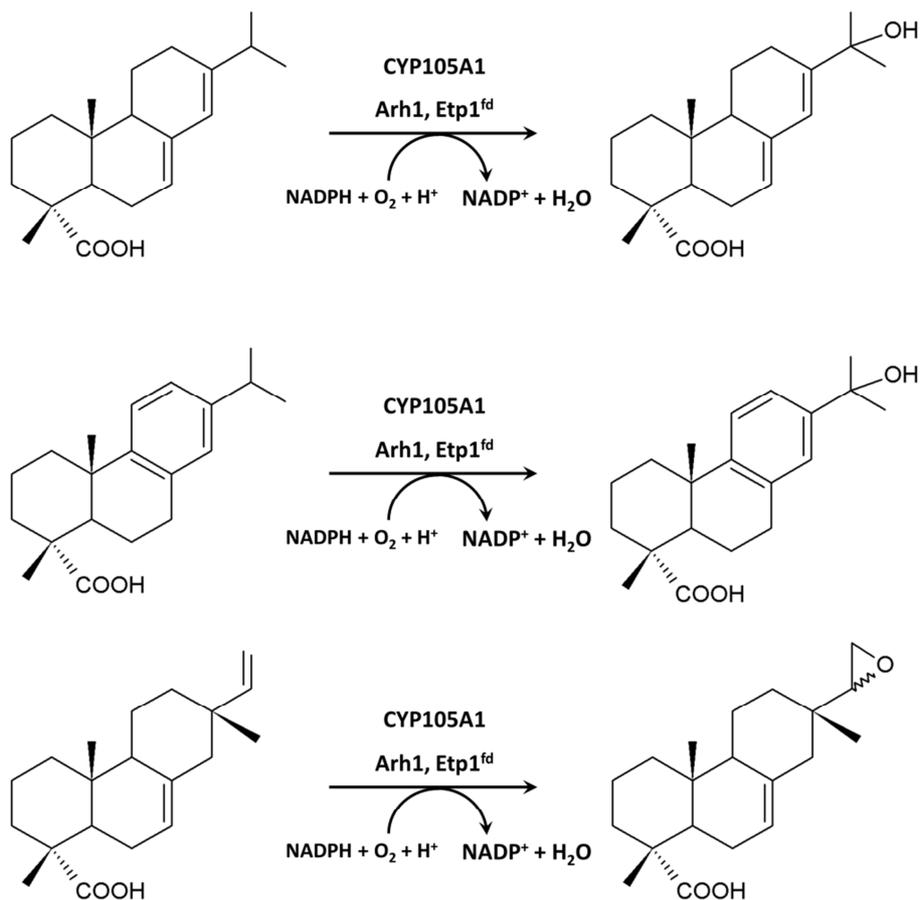
### 3.6 Ganzzellumsatz in *Bacillus megaterium* MS941

Nach der erfolgreichen Identifikation der Harzsäuren als neue Substrate für das CYP105A1 sowie der *in vitro* Charakterisierung von Bindung und Umsatz von Abietinsäure, Dehydroabietinsäure und Isopimarsäure bestand das nächste Ziel in der Herstellung ausreichender Mengen der Reaktionsprodukte dieser drei Substanzen für NMR-spektroskopische Untersuchungen. *In vitro* Umsätze in diesem Maßstab sind durch die heterologe Expression und Reinigung der Proteine und den Einsatz des teuren Kofaktors NADPH sehr zeit- und kostenintensiv, so dass sich für die Herstellung von Produktmengen im Milligramm-Maßstab die Anwendung von Ganzzellsystemen bewährt hat. Aus diesem Grund sollten die Umsätze mit einem in der Arbeitsgruppe etablierten *B. megaterium*-basierten Ganzzellbiokatalysator durchgeführt werden, der schon erfolgreich für den Umsatz der Sulfonylharnstoffe Glimepirid und Glibenclamid eingesetzt wurde (Kleser *et al.* 2012). Der hierfür verwendete, mit dem Vektor pSMF-CYP105A1wt transformierte *B. megaterium* Stamm MS941 MK-1 (Kleser 2011), sowie ein als Negativkontrolle eingesetzter Stamm, welcher den Vektor ohne Insert enthielt, wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Michael Kleser zur Verfügung gestellt. Zur Überprüfung der Produktbildung *in vivo* wurde zunächst ein kleiner Ansatz im 50 ml Maßstab mit einer Abietinsäure-Konzentration von 50  $\mu$ M durchgeführt. Die Analyse der Umsätze erfolgte nach 24 h mittels HPLC (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20:** HPLC-Chromatogramm der Abietinsäure nach Interaktion mit *B. megaterium* MS941. Der Umsatz mit den Zellen, die mit pSMF-CYP105A1wt transformiert wurden, ist grau dargestellt, der Umsatz mit den zur Kontrolle verwendeten Zellen ist in schwarz gezeigt. Die Reaktion erfolgte über 24 Stunden mit einer Substratkonzentration von 50  $\mu$ M bei 30 °C. Anschließend wurden die Ansätze zweimal mit Ethylacetat extrahiert und mittels HPLC mit einem Laufmittelgemisch Methanol/Wasser (85:15 + 0,1 % Essigsäure) bei einer Wellenlänge von 240 nm detektiert.

Anhand der Chromatogramme lässt sich erkennen, dass die mit CYP105A1 transformierten Zellen in der Lage waren, das Produkt 1 zu bilden. Darüber hinaus wurde die Bildung mehrerer Nebenprodukte beobachtet, die auch in dem Kontrollstamm ohne CYP105A1 nachgewiesen werden konnten. Um ausreichende Produktmengen für die NMR-Untersuchungen zu erhalten, wurde ein Ganzzellumsatz von Abietinsäure, Dehydroabietinsäure und Isopimarsäure in größerem Maßstab (500 ml) durchgeführt. Nach Extraktion mit Ethylacetat und anschließender Reinigung über HPLC im semipräparativen Maßstab erfolgte die NMR-spektroskopische Untersuchung der erhaltenen Produkte am Institut für pharmazeutische Biologie an der Universität des Saarlandes durch Herrn Dr. Zapp. Die entsprechenden Daten sind im Anhang unter 6.1 dargestellt. Bei den Produkten handelte es sich im Falle der Abietane um die entsprechenden 15-hydroxylierten Derivate, also 15-Hydroxyabietinsäure und 15-Hydroxydehydroabietinsäure. Bei der Isopimarsäure erfolgte interessanterweise keine Hydroxylierung, sondern eine Epoxidierung an der Doppelbindung der Vinylgruppe, wodurch das Produkt 15,16-Epoxyisopimarsäure entstand. Die Reaktionsschemata der drei Harzsäureumsätze sind in Abbildung 3.21 gezeigt.

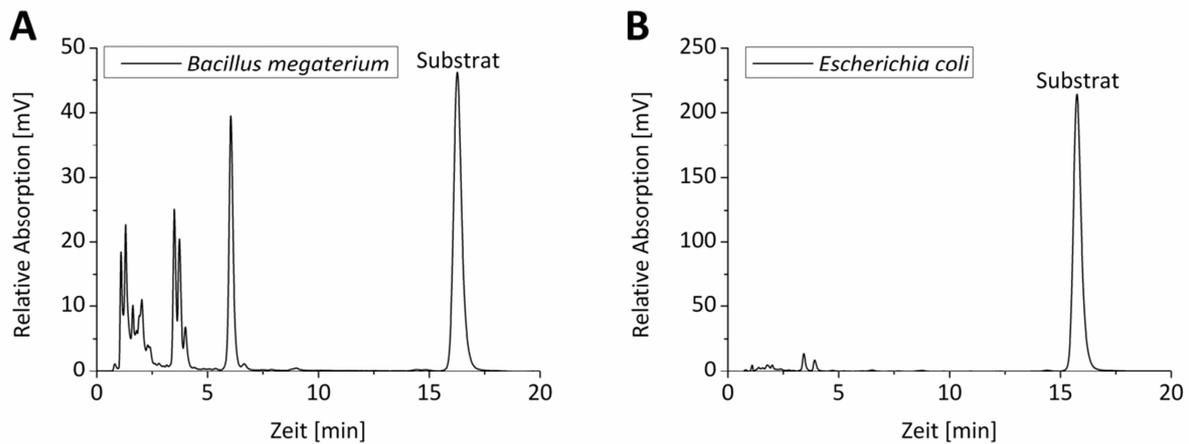


**Abbildung 3.21:** Reaktionsgleichungen der CYP105A1-katalysierten Umsätze von A) Abietinsäure, B) Dehydroabietinsäure und C) Isopimarsäure zu den entsprechenden Produkten mit CYP105A1.

### 3.7 Etablierung eines Ganzzellsystems für den Umsatz von Harzsäuren in *E. coli*

Die von CYP105A1 katalysierten Umsätze der Harzsäuren sind äußerst attraktiv für biotechnologische Anwendungen. Dies liegt einerseits an der sehr selektiven Umsetzung der Substrate mit vergleichsweise hoher Aktivität und andererseits an den vielfältigen biologischen Eigenschaften der Abietane und Pimarane. Besonders die Umsetzung der Abietinsäure zur 15-Hydroxyabietinsäure ist sehr interessant, da dieses Produkt auf chemischem Wege leicht in die 15-Hydroperoxyabietinsäure (15-HPA) umgewandelt werden kann, eine Substanz mit hohem allergenem Potential (Karlberg *et al.* 1988). Aus diesem Grund sollte ein potenter Biokatalysator konstruiert und charakterisiert werden, mit dem Mengen dieses Produktes im Milligramm-Maßstab hergestellt werden können.

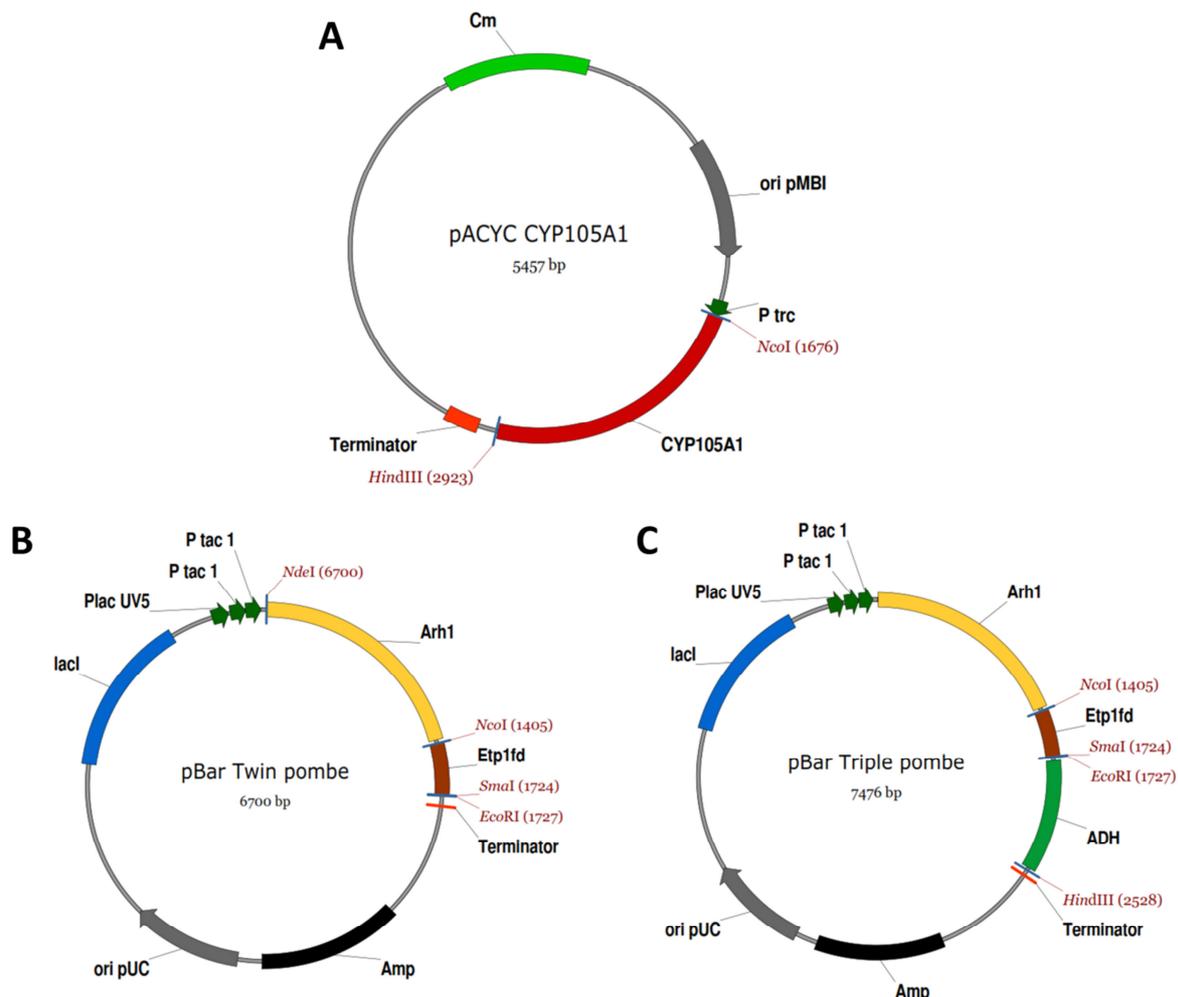
Obwohl bereits Ganzzellbiokatalysatoren für CYP105A1-basierte Biokonversionen in *B. megaterium* zur Verfügung standen und auch Harzsäuren schon erfolgreich mit diesem Wirt durch das CYP106A2 hydroxyliert werden konnten, schien dieser Organismus für die biotechnologische Anwendung einer CYP105A1-katalysierten Umsetzung von Harzsäuren nur bedingt geeignet zu sein. Zwar konnte auf diese Art und Weise, wie unter Abschnitt 3.6 beschrieben, genug Produkt der Umsetzungen für die Identifizierung gewonnen werden, jedoch war die große Anzahl von Nebenprodukten auffällig. Da der verwendete *B. megaterium* Stamm, wie bereits zuvor erwähnt, über eigene P450-Monooxygenasen wie zum Beispiel das zum CYP106A2 zu 63 % identische CYP106A1 verfügt, kommt es wahrscheinlich zu einer Konkurrenzsituation mit den wirtseigenen Enzymen um das Substrat. Da *E. coli* keine P450-Gene besitzt, wurde im Unterschied dazu bei diesem Organismus nicht mit einem derartigen Effekt gerechnet. Um dies zu überprüfen, erfolgte die Inkubation von *B. megaterium* und *E. coli* Zellen mit Abietinsäure. Für dieses Experiment wurde der *B. megaterium* Stamm MS941 MK-0 (Kleser *et al.* 2012) sowie *E. coli* Zellen des Stammes JM109 verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 3.22 gezeigt. Wie sich erkennen lässt, finden bei der Inkubation der *B. megaterium* Zellen im Vergleich zu *E. coli* eine deutliche Abnahme des Substratpeaks sowie die Bildung mehrerer Produkte statt. Dies spricht für eine gerichtete Reaktion der Zellen mit dem Substrat, was einen Nachteil für die zielgerichtete Herstellung größerer Produktmengen der Harzsäuren mit CYP105A1 in *B. megaterium* bedeutet. Aus diesem Grund wurde *E. coli* als Wirt für das Ganzzellsystem gewählt.



**Abbildung 3.22:** HPLC-Chromatogramme der Interaktion von Abietinsäure mit A) *Bacillus megaterium* MS941 MK-0 und B) *Escherichia coli* JM109. Die Zellen wurden jeweils für 24 Stunden mit dem Substrat bei 30 °C inkubiert und anschließend zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die HPLC-Analyse erfolgte isokratisch mit Methanol/Wasser (80:20 + 0,1 % Essigsäure). Die Substanzen wurden bei 240 nm detektiert.

### 3.7.1 Klonierung

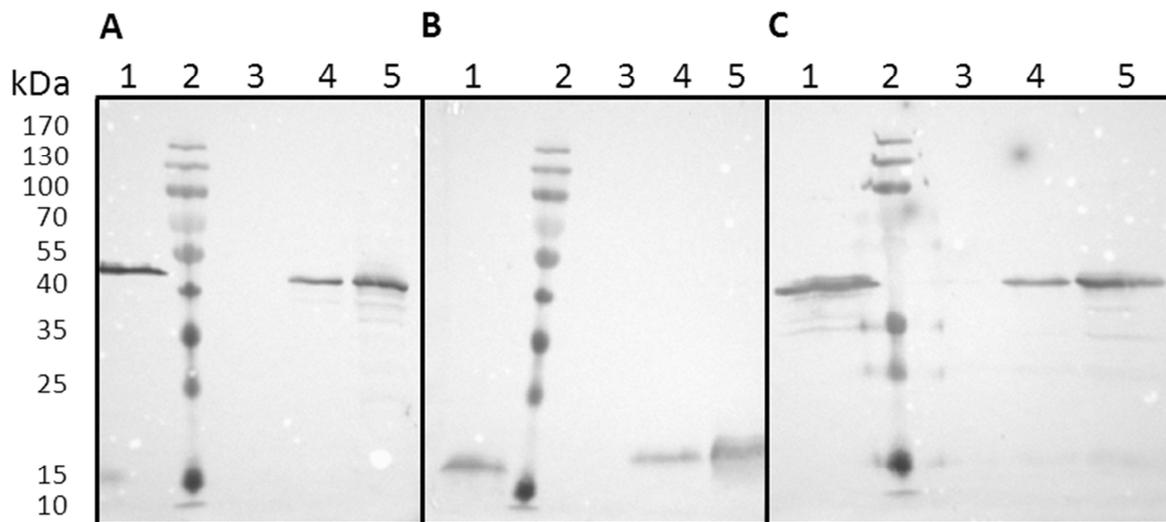
Zur Realisierung dieses Systems erfolgte zunächst die Klonierung der Vektoren für die Expression der Enzymkomponenten in *E. coli*. Als Grundlage hierfür diente ein in der Arbeitsgruppe entwickelter und bereits erfolgreich für den Umsatz von 11-Desoxycorticosteron (DOC) zu 15 $\beta$ -Hydroxy-11-Desoxycorticosteron durch CYP106A2 eingesetzter *E. coli* basierter Biokatalysator. Dieser beruht auf einem zwei-Vektor-System bestehend aus dem *low copy* Plasmid pACYC\_FHH2.8 mit der DNA des CYP106A2 und dem *high copy* Plasmid pBarTwin mit den cDNAs der heterologen Elektronentransportproteine AdR und Adx aus dem Rind (Hannemann *et al.* 2006, Virus und Bernhardt 2008). Durch den Austausch der DNA des CYP106A2 durch die DNA des CYP105A1 wurde der Vektor pACYC\_CYP105A1 konstruiert. Für den Elektronentransport wurden die Redoxproteine aus dem Rind gegen die heterologen Elektronentransportproteine aus *S. pombe* ausgetauscht, was in dem Vektor pBar\_Twin\_pombe resultierte. Da es durch eine Überexpression von P450-Monooxygenasen zu einem erhöhten Bedarf an Reduktionsäquivalenten kommt, kann es sein, dass der intrazelluläre NADPH-Regenerationsweg nicht mehr in der Lage ist, diesen Bedarf zu decken (Schewe *et al.* 2008). Zur Regeneration des Kofaktors NADPH wurde deshalb zusätzlich ein weiterer Vektor, basierend auf dem Plasmid pBarTripel (Bleif 2012) mit einer Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LbADH), kloniert (Schroer *et al.* 2007, Schroer *et al.* 2009). Die Vektorkarten der entsprechenden Plasmide sind in Abbildung 3.23 dargestellt.



**Abbildung 3.23:** Expressionsplasmide für die rekombinante Proteinproduktion von CYP105A1, Arh1 und Etp1<sup>skf</sup> sowie *Lb*ADH in *Escherichia coli*. A) CYP105A1 ist auf dem 5457 bp großen Vektor pACYC\_CYP105A1 unter der Kontrolle des trc Promotors und eines vom *rrnB*-Gen abgeleiteten Terminators kodiert. Das Plasmid enthält außerdem den Replikationsursprung pMBI und die Sequenz des *cat*-Resistenzgens. B) Der 6700 bp große Vektor pBar\_Twin\_pombe enthält neben den cDNAs von Arh1 und Etp1<sup>skf</sup> das Ampicillin-Resistenzgen und den pUC Replikationsursprung. Die Kontrolle der Expression erfolgt über zwei Kopien des tac1- sowie den lacUV5-Promotor, den trpA-Terminator und das lacI-Repressorgen. C) Der Vektor pBar\_Triple\_pombe (7476 bp) enthält zusätzlich die DNA der *Lb*ADH.

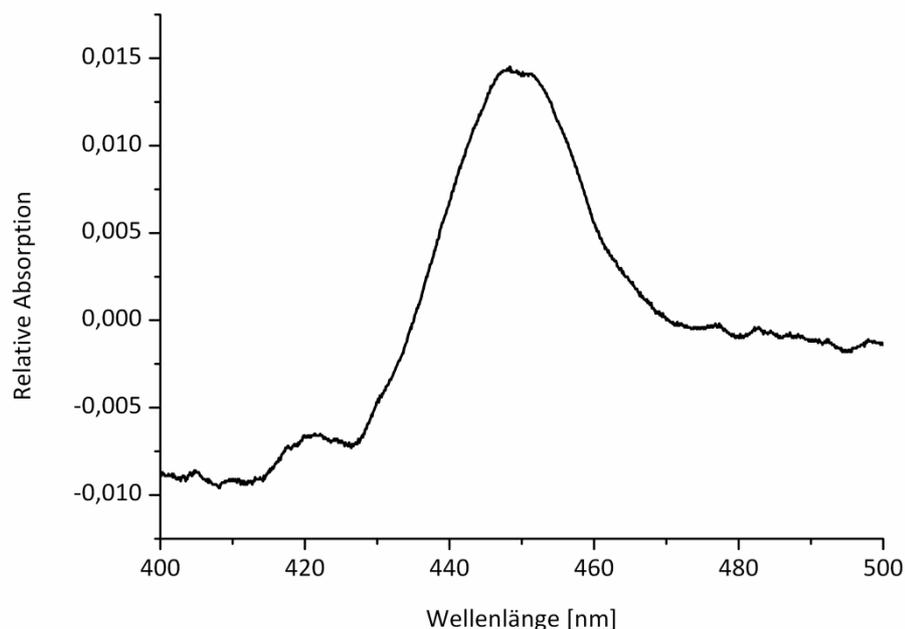
### 3.7.2 Ko-Expression der Proteine in *E. coli* JM109

Nach der chemischen Ko-Transformation der *E. coli* JM109-Wirtszellen mit den Plasmiden und Induktion der Proteinexpression mittels IPTG wurde die heterologe Expression der Proteine nach 24 Stunden durch eine Western Blot-Analyse mit polyklonalen Antikörpern überprüft. Wie in Abbildung 3.24 zu erkennen ist, ließen sich sowohl die Elektronentransportproteine Arh1 und Etp1<sup>skf</sup> als auch das CYP105A1 auf derselben Höhe wie die als Positivkontrolle eingesetzten gereinigten Proteine nachweisen. Somit war die Expression aller Komponenten für den CYP105A1-katalysierten Umsatz in *E. coli* erfolgreich. Das Etp1<sup>skf</sup> zeigt auf dem SDS-Gel eine einfache Bande, die etwa der doppelten erwarteten Größe entspricht. Diese Besonderheit wurde bereits zuvor für das Etp1<sup>fd</sup> beobachtet und beschrieben (Schiffler *et al.* 2004).



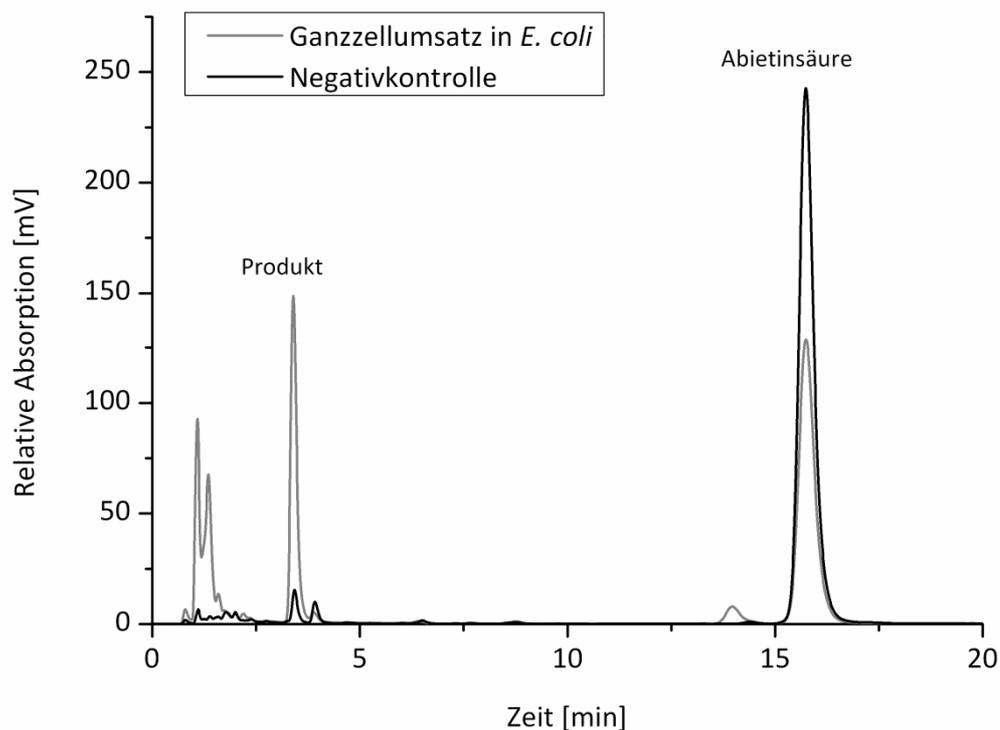
**Abbildung 3.24:** Western Blot-Analyse mit polyklonalen Antikörpern gegen A) Arh1 (MW  $\approx$  51 kDa), B) Etp1<sup>skf</sup> (MW  $\approx$  11,3 kDa) und C) CYP105A1 (MW  $\approx$  44 kDa). Spur 1 zeigt jeweils das rekombinant exprimierte und gereinigte Protein aus *E. coli* als Positivkontrolle, Spur 2 den Größenstandard und Spur 3 die Negativkontrolle (Lysat von *E. coli*-Zellen ohne den jeweiligen Vektor). Die Spuren 4 und 5 enthalten das Lysat von transformierten *E. coli*-Zellen 24 Stunden nach der Induktion der Proteinexpression in einer Verdünnung von 1:5 sowie unverdünnt.

Zur Überprüfung der Funktionalität des heterolog exprimierten CYP105A1 wurde mit dem entsprechenden *E. coli* Zelllysate außerdem ein CO-Differenzspektrum aufgenommen. Wie sich an dem Absorptionsmaximum bei 450 nm in Abbildung 3.25 erkennen lässt, wurde funktionelles P450 mit korrekt eingebautem Häm-Kofaktor exprimiert.



**Abbildung 3.25:** CO-Differenzspektrum des Lysats transformierter *E. coli* JM109 Zellen nach 24-stündiger Expression.

Nach der erfolgreichen Expression der Proteine sollte im Folgenden die katalytische Aktivität des Systems untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde den Bakterienkulturen nach Induktion und 24-stündiger Expressionszeit das Substrat Abietinsäure in einer Endkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Nach weiteren 48 Stunden wurde die Kultur mit Ethylacetat extrahiert und mittels HPLC analysiert. Wie sich in Abbildung 3.26 erkennen lässt, fand eine deutliche Produktbildung im Vergleich zu den als Negativkontrolle eingesetzten untransformierten Zellen statt. Die Retentionszeit des Produkts betrug  $3.42 \pm 0,05$  Minuten und war identisch mit der Retentionszeit des Produkts der unter gleichen Bedingungen durchgeführten *in vitro* Umsätze. Somit konnte mit dem CYP105A1-basierten Ganzzellsystem erstmalig der Umsatz von Abietinsäure in *E. coli* gezeigt werden.



**Abbildung 3.26:** HPLC-Chromatogramme der Interaktion von Abietinsäure mit untransformierten *E. coli* JM109-Zellen (grau), und JM109-Zellen, die mit den Plasmiden pACYC\_CYP105A1 und pBar\_Triple\_pombe kotransformiert wurden (schwarz). Die Reaktionen wurden in Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) bei 30 °C für 24 durchgeführt. Anschließend erfolgte die zweifache Extraktion mit Ethylacetat. Die HPLC-Analyse wurde isokratisch mit Methanol/Wasser (80:20 + 0,1 % Essigsäure) durchgeführt und die Detektion der Substanzen erfolgte bei 240 nm.

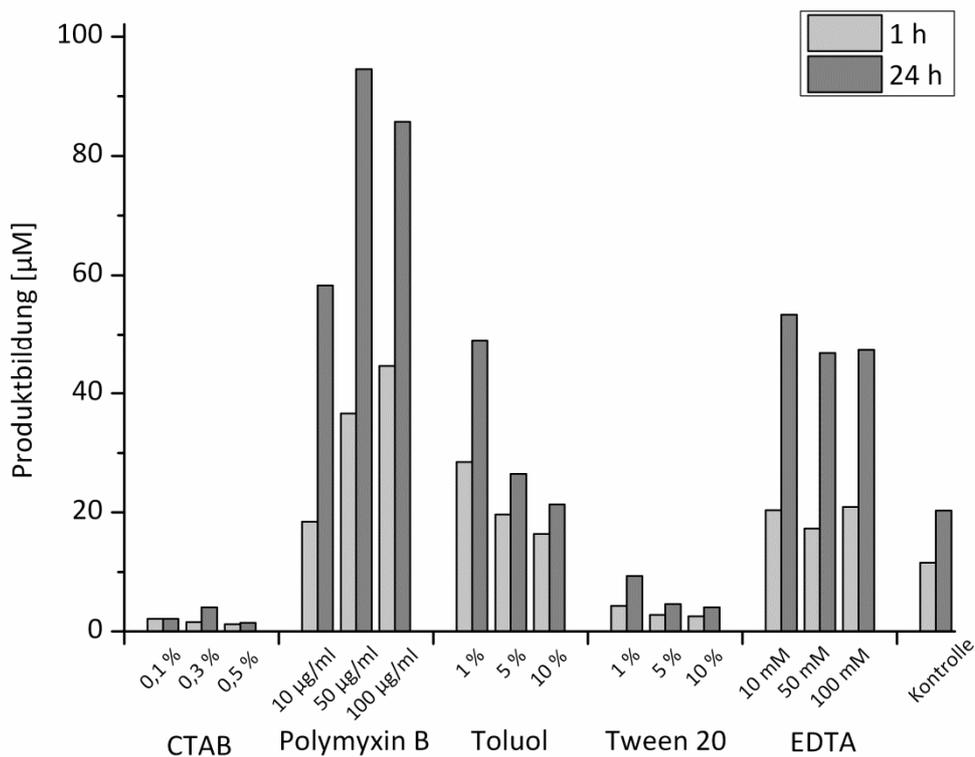
### 3.8 Optimierung des Ganzzellsystems

Mit einer Produktbildungsrate von etwa 30 % nach einer Reaktionsdauer von 48 Stunden war die Effizienz des Ganzzellsystems verhältnismäßig gering. Aus diesem Grund bestand das nächste Ziel in der Optimierung der Umsatzraten des Biokatalysators. Zur Steigerung der Produktbildungsrate bieten sich dabei im Wesentlichen drei Möglichkeiten: Die Optimierung auf Enzymebene, die Optimierung auf Ebene des Wirtes und die Optimierung der Reaktionsbedingungen (Julsing *et al.* 2008). Die *in vitro* Untersuchungen der Substratbindung und Enzymaktivität zeigten eine deutlich höhere Affinität und Spezifität des CYP105A1 gegenüber der Abietinsäure als zu allen anderen bisher bekannten Substraten. Daher wurden an dieser Stelle auf Methoden zur Optimierung des Enzyms verzichtet und es wurde nur mit der Wildtyp-Variante des Enzyms gearbeitet.

#### 3.8.1 Permeabilisierung der Zellen

Wie bereits in vorangegangenen Studien beobachtet (Chen 2007, Bleif *et al.* 2011), liegt eine mögliche Ursache für die geringen Umsatzraten in der Tatsache, dass die hydrophoben Harzsäuren die äußere Membran der *E. coli* Zellen nur sehr schwer passieren können. Eine bewährte Methode, um eine bessere Verfügbarkeit des Substrates innerhalb der Wirtszelle zu gewährleisten, ist die Optimierung des Wirtes durch Permeabilisierung der Membran. Zu diesem Zweck wurde die Eignung verschiedener Substanzen zur Behandlung der *E. coli* Membran untersucht. Es ist bekannt, dass sowohl Detergenzien (Michielsen *et al.* 1998, Galindo und Salcedo 1996), organische Lösemittel wie Toluol (Park *et al.* 1994), sowie eine Vielzahl weiterer Substanzen wie zum Beispiel die Komplexbildner Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) (Vaara 1992, Prabhune *et al.* 1992) einen Einfluss auf die strukturelle Integrität der Bakterienmembran haben. Aus diesem Grund wurden insgesamt fünf verschiedene Substanzen, nämlich CTAB, EDTA, Polymyxin B, Tween 20 und Toluol, auf ihre permeabilisierende Wirkung getestet. Hierzu wurden die Stoffe in jeweils drei Konzentrationen zusammen mit dem Substrat nach 24-stündiger Expression der Proteine direkt zu den Zellen in das Medium gegeben. Nach einer Stunde sowie nach 24 Stunden wurden Proben genommen und die gebildete Produktmenge nach Extraktion mittels HPLC untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 3.27 zusammengefasst. Dabei zeigte sich, dass sich die verschiedenen Substanzen unterschiedlich auf die Produktbildung auswirkten. Während CTAB und Tween 20 den Substratumsatz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle herabsetzten, zeigten die mit Toluol, EDTA und Polymyxin B behandelten Proben eine Steigerung der Produktbildung im Vergleich zur Kontrolle. Der geringste Effekt wurde dabei durch die Zugabe von Toluol erzielt. Zwar trat bei einer Konzentration von 1 % (v/v) etwa eine Verdopplung der Produktbildungsrate auf, in höheren Konzentrationen und vor allem nach längerer Inkubationszeit wirkte es jedoch deutlich weniger effektiv. In den mit EDTA behandelten Proben

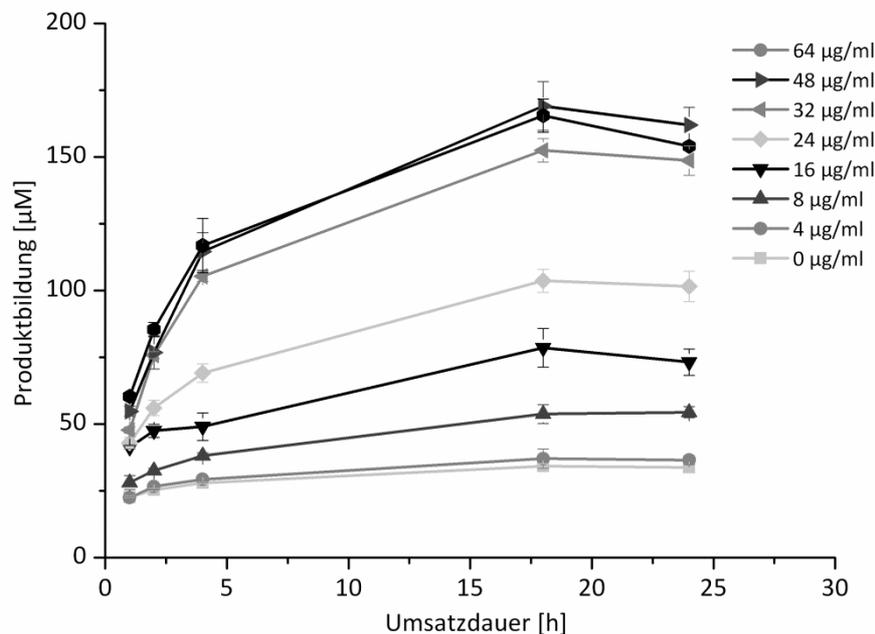
konnte zwar eine markante Steigerung der Produktbildung zwischen 50 und 80 % nach einer Stunde sowie eine Verdopplung nach 24 Stunden erzielt werden, jedoch ließ sich dieser Effekt nicht durch eine Erhöhung der Konzentration verstärken. Der größte Anstieg in der Menge an gebildetem Produkt wurde durch den Einsatz des Peptidantibiotikums Polymyxin B erzielt. Hier erfolgte in den Konzentrationen 50 µg/ml sowie 100 µg/ml eine dreifache Steigerung der Produktbildungsrate nach 24 Stunden im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Aus diesem Grund wurde Polymyxin B für detailliertere Untersuchungen bezüglich des Einflusses auf die Produktbildungsrate ausgewählt.



**Abbildung 3.27:** Auswirkung verschiedener permeabilisierender Substanzen auf die Produktbildungsrate des Ganzzellsystems. CTAB, Polymyxin B, Toluol, Tween 20 und EDTA wurden jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die Umsetzung erfolgte mit ganzen Zellen in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) bei einer Substratkonzentration von 400 µM. Proben (500 µl) wurden nach einer sowie nach 24 Stunden genommen und zweimal mit Ethylacetat extrahiert.

Um den Einfluss der Polymyxin B Konzentration auf die Umsatzraten des Ganzzellsystems genauer zu untersuchen, erfolgten Umsätze mit unterschiedlichen Konzentrationen des Permeabilisierers. Dazu wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden Proben genommen, und die gebildete Produktmenge wurde untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 3.28 zusammengefasst. Wie sich zeigte, konnte ab einer Konzentration von 8 µg/ml eine deutliche Steigerung der Produktbildung beobachtet werden. Ab einer Konzentration von 32 µg/ml lässt sich dieser Effekt nicht mehr steigern und es kommt bei Konzentrationen über 64 µg/ml zu einer Sättigung. Dies zeigt, dass ein kritischer Wert erreicht wurde, bei der die Zellstabilität nachhaltig beeinträchtigt war, was

somit auch die Produktbildung erschwerte. Alle folgenden Experimente wurden daher mit einer Polymyxin B Konzentration von 32  $\mu\text{g/ml}$  durchgeführt. Auf diese Weise konnte die Produktbildungsrate nach 24 Stunden um den Faktor fünf im Vergleich zu nicht permeabilisierten Zellen erhöht werden.

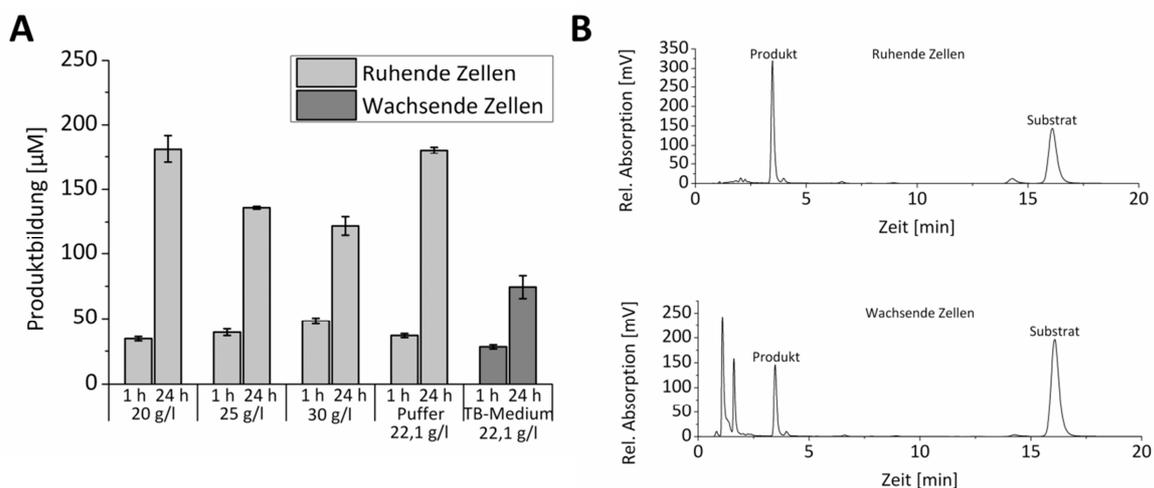


**Abbildung 3.28:** Einfluss der Polymyxin B Konzentration auf die Produktbildungsrate des Ganzzellsystems. Die Umsetzung erfolgte mit ganzen Zellen in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) bei 30 °C und einer Substratkonzentration von 400  $\mu\text{M}$ . Proben (500  $\mu\text{l}$ ) wurden nach 1, 2, 4, 16 und 24 Stunden genommen und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei voneinander unabhängigen Umsetzungen.

### 3.8.2 Vergleich des Umsatzes in wachsenden und ruhenden Zellen

Ein weiteres Problem bei den Ganzzellumsetzungen stellte die Bildung von Nebenprodukten durch den Wirtsmetabolismus dar. Wie man aus Abbildung 3.26 erkennt, ließen sich in der analysierten Probe neben dem Substrat und dem Produkt der Umsetzung weitere Substanzen mit Retentionszeiten  $<2$  Minuten nachweisen. Zu solchen unerwünschten Nebenprodukten gehört beispielsweise das Indol (Ringle 2013). Es ist bekannt, dass *E. coli* Zellen alternativ zu Kohlenhydraten zwecks Energiegewinnung die Aminosäure Tryptophan aus dem Medium aufnehmen und durch die Tryptophanase zu Pyruvat und Indol umsetzen können (Martínez-Gómez *et al.* 2012). Letzteres wird in das Medium abgegeben, was einerseits zu einer Erschwerung der Produktreinigung und andererseits zu einer kompetitiven Inhibierung von P450-Enzymen durch diesen stickstoffhaltigen Heteroaromaten führt. Dies wiederum kann in einer Herabsetzung der Produktbildung im Ganzzellsystem resultieren (Girhard *et al.* 2010, Ringle *et al.* 2012). Eine etablierte Methode, solche Störeffekte durch zelleigene Metabolite zu minimieren, ist die Entkoppelung von Wachstum und

Umsatz der Zellen. Aus diesem Grund wurde ein Vergleich des Substratumsatzes unter Verwendung wachsender Zellen in TB-Medium sowie in Kaliumphosphat-Puffer resuspendierten, ruhenden Zellen in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 3.29 zusammengefasst. Anhand der Chromatogramme lässt sich erkennen, dass die Bildung von Nebenprodukten im Fall der Verwendung von ruhenden Zellen praktisch vollständig unterdrückt wurde. Als Folge hiervon ist die Produktbildungsrate nach 24 Stunden deutlich erhöht. Außerdem zeigte bei der Verwendung der ruhenden Zellen die Konzentration der Zellsuspension einen Einfluss auf die Menge des gebildeten Produktes. Die Feuchtzellmasse der Bakterien betrug nach Wachstum und 24-stündiger Expression im Komplexmedium im Schnitt etwa 22 g/l. Wurden die ruhenden Zellen in der gleichen Konzentration eingesetzt wie die wachsenden Zellen, zeigten sich nach einer Stunde kaum Unterschiede in der Produktbildung. Nach einer Umsatzzeit von 24 Stunden war die Menge an gebildetem Produkt im Falle der Verwendung von ruhenden Zellen jedoch um mehr als das Doppelte erhöht. Der Einsatz von höheren Konzentration an Feuchtzellmasse in den Ansätzen führte bei kurzen Umsatzzeiten zu einer geringfügigen Steigerung der Produktbildungsrate, jedoch kehrte sich dieser Effekt bei längeren Reaktionszeiten wieder um, und nach 24 Stunden konnten geringere Produktmengen isoliert werden als in den Ansätzen mit niedrigerer Zellkonzentration. Insgesamt betrachtet sind aufgrund der höheren Umsatzraten und der herabgesetzten Bildung von Nebenprodukten daher ruhende Zellen für den Einsatz als Ganzzellbiokatalysator vorzuziehen. Dabei sollte die eingesetzte Zellkonzentration auf die Dauer der Inkubation abgestimmt werden.

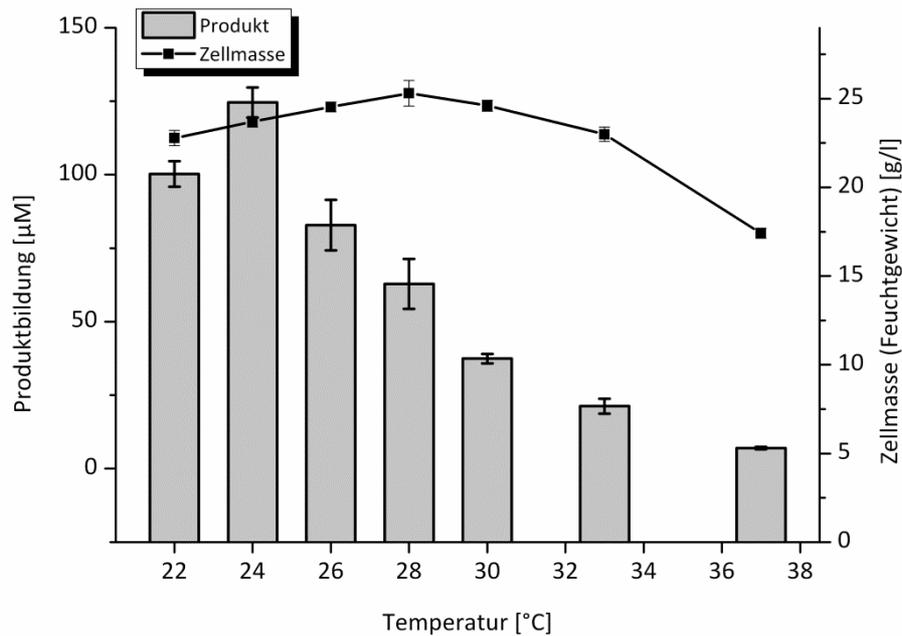


**Abbildung 3.29:** Vergleich von ruhenden und wachsenden Zellen für den Ganzzellumsatz. A) Vergleich der Produktbildungsrate des Ganzzellsystems unter Verwendung von wachsenden Zellen in TB-Medium und ruhenden Zellen in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) in verschiedenen Konzentrationen (angegeben in Gramm Feuchtzellmasse pro Liter Puffervolumen). Das Feuchtgewicht der Expression betrug  $\approx 22$  g/l. Die eingesetzte Substratkonzentration war 400  $\mu$ M. Proben (500  $\mu$ l) wurden nach einer und nach 24 Stunden genommen und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. B) HPLC-Chromatogramme der *in vivo* Umsätze mit wachsenden und ruhenden Zellen. Die Analyse wurde isokratisch mit Methanol/Wasser (80:20 + 0,1 % Essigsäure) durchgeführt, und die Detektion der Substanzen erfolgte bei 240 nm.

### 3.8.3 Optimierung der Expressionsbedingungen

Der Anteil der heterolog exprimierten Proteine an der Gesamtbiomasse der Wirtszellen hat einen wesentlichen Anteil an der Effizienz eines Ganzzellsystems. Darüber hinaus spielt insbesondere bei P450-Systemen das stöchiometrische Verhältnis der einzelnen Proteinkomponenten der Redoxkette eine große Rolle. Dies kann insofern ein Problem darstellen, als dass die optimalen Expressionsbedingungen der Proteinkomponenten oftmals stark voneinander abweichen (siehe Tabelle 2.4, Abschnitt 2.2.2.1). Zur Verbesserung der Proteinexpression erfolgte darum die Untersuchung des Einflusses verschiedener Expressionsparameter. Als Bewertungskriterium wurde die gebildete Produktmenge herangezogen, da auf diese Weise eine gleichzeitige Optimierung sowohl der Expressionsrate als auch des Verhältnisses aller heterolog exprimierten Proteine zueinander durchgeführt werden konnte. Hierzu wurden die Zellen nach der Expression durch Zentrifugieren geerntet und in definierter Konzentration in Kaliumphosphat-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 400  $\mu\text{M}$  Substrat erfolgte der Umsatz unter für alle Proben gleichen Reaktionsbedingungen bei 30 °C für zwei Stunden, bevor die Zellen extrahiert und die Produktbildung mittels HPLC analysiert wurden.

Zunächst wurde auf diese Weise der Einfluss der Expressionstemperatur untersucht. Wie Abbildung 3.30 zeigt, konnte hierbei ein starker Einfluss sowohl auf die gebildete Produktmenge als auch auf die Zellmasse nachgewiesen werden. Die größte Menge an Produkt ließ sich nach einer Expression der Proteine bei 24 °C isolieren. Bei höheren Expressionstemperaturen ließ die Produktbildungsrate stark nach, wobei schon eine geringe Erhöhung um 4° C auf 28 °C etwa zu einer Halbierung der Produktmenge führte. Bei noch höheren Temperaturen kam die Produktbildungsrate fast vollständig zum Erliegen und erreichte bei 37 °C weniger als 10 % im Vergleich zum Temperaturoptimum. Für alle folgenden Experimente erfolgte die Expression der Proteine daher bei 24 °C.



**Abbildung 3.30:** Einfluss der Expressionstemperatur auf die Aktivität des Ganzzellsystems. Die grauen Balken zeigen die Produktbildungsrate, die schwarzen Messpunkte geben die Feuchtzellmasse an. Die Umsätze erfolgten in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) bei 30 °C für zwei Stunden. Die Standardabweichungen ergeben sich aus drei voneinander unabhängigen Umsetzungen.

Um zu überprüfen, ob andere Faktoren einen ähnlich großen Einfluss auf die Produktbildungsrate haben, wurden weitere Expressionsparameter untersucht (Abbildung 3.31). Um eine möglichst hohe Expressionsrate der Proteine zu gewährleisten, wurde der Einfluss des Induktors IPTG im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 1 mM auf die Proteinexpression analysiert (Abbildung 3.31 A). Hierbei ließ sich keine ausgeprägte Konzentrationsabhängigkeit nachweisen. Zwar konnte die größte Produktmenge nach einer Induktion mit IPTG-Endkonzentration von 1 mM isoliert werden, jedoch lagen die Schwankungen im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 1 mM alle innerhalb der Standardabweichungen. Somit hat der Induktor zwar einen Einfluss auf die gebildete Menge an heterolog exprimiertem Protein, das Verhältnis der gleichermaßen durch IPTG induzierten Proteine zueinander lässt sich durch die Konzentration jedoch nicht beeinflussen. Die Folgeexperimente wurden daher mit einer IPTG-Konzentration von 1 mM durchgeführt.

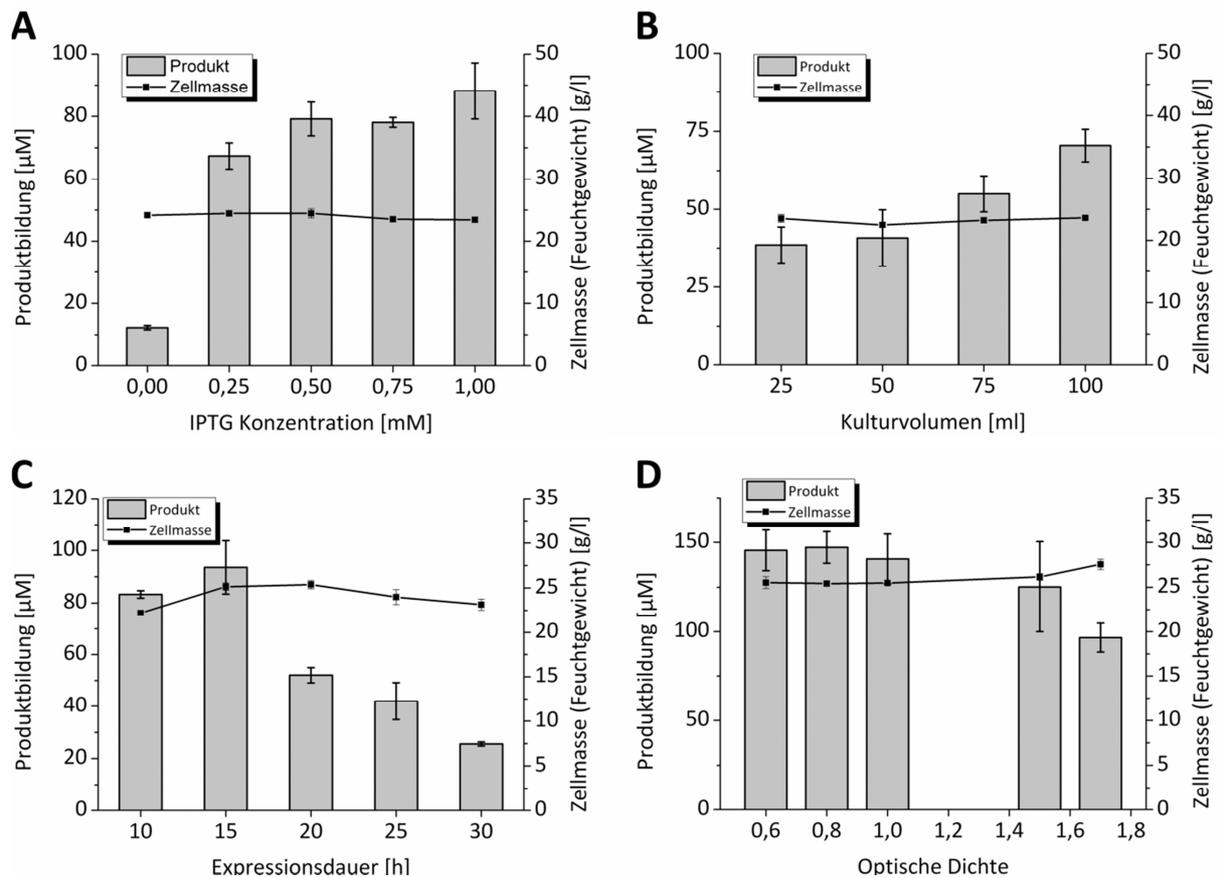
Ein weiterer Untersuchungsparameter war das eingesetzte Kulturvolumen bei konstanter Kolbengröße von 300 ml (Abbildung 3.31 B). Besonders bei der Expression von Cytochromen P450 in geschlossenen Systemen ist dies ein wichtiger Faktor, da das Verhältnis von Kulturvolumen zu Kolbengröße einen direkten Einfluss auf die Sauerstoffversorgung des Systems hat. Die Ergebnisse dieser Untersuchung belegen, dass dieser Faktor in der Tat einen großen Einfluss auf die Expression der Proteine hat. Mit wachsendem Kulturvolumen ließ sich eine deutliche Zunahme der Produktbildung beobachten. Während die Verdopplung des Kulturvolumens von 25 ml auf 50 ml noch zu keiner signifikanten Steigerung der Produktbildung führte, resultierte die Erhöhung auf 100

ml in einer Steigerung um etwa 80 % bei gleichbleibender Zellmasse. Dies ist insofern interessant, als dass P450-Enzyme häufig ein entgegengesetztes Verhalten zeigen und ihre Aktivität mit steigendem Volumen des Mediums abnimmt (Lu und Mei 2007b). Dies deutet darauf hin, dass der limitierende Faktor bei der Proteinexpression nicht das CYP105A1, sondern eine der anderen Proteinkomponenten ist. Aus diesem Grund erfolgte die Expression der Proteine für die nachfolgenden Experimente in einem Kulturvolumen von 100 ml.

Abbildung 3.31 C zeigt den Einfluss der Dauer der Proteinexpression. Wie erkennbar ist, erwies sich eine Expressionszeit der Proteine von 15 Stunden als optimal für den Ganzzellumsatz. Bereits bei einer geringfügig höheren Expressionszeit von 20 Stunden konnte eine markante Abnahme der Produktbildungsrate um etwa 50 % beobachtet werden. Nach 30 Stunden konnte nur noch etwa 30 % des optimalen Wertes erreicht werden. Für alle folgenden Versuche wurden die Umsätze deswegen mit Zellen durchgeführt, bei denen die Expressionszeit 15 Stunden betrug.

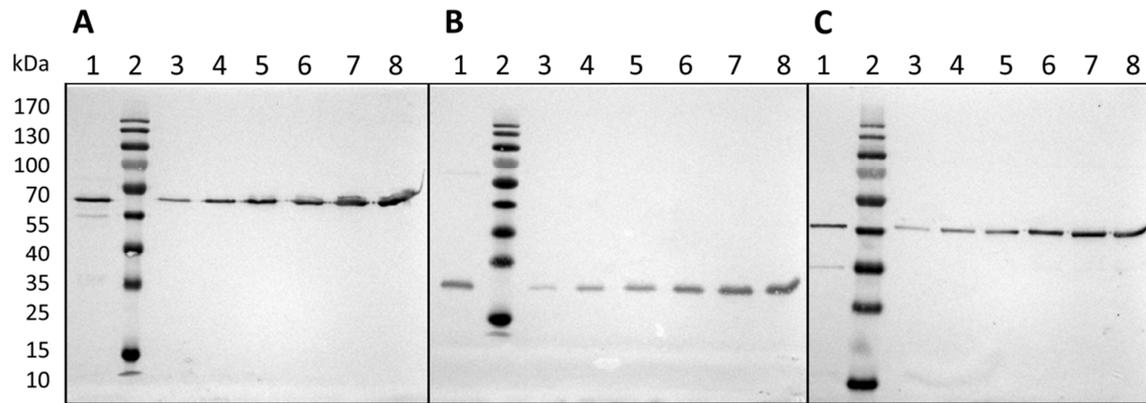
Neben der optimalen Expressionsdauer wurde außerdem der ideale Zeitpunkt für die Induktion der Proteinexpression bestimmt (Abbildung 3.31 D). Ähnlich wie bei der Evaluierung des Einflusses der IPTG-Konzentration zeigte sich hierbei ein geringerer Einfluss als bei den anderen Parametern. Auch hier deutet das Ergebnis darauf hin, dass die Expression der einzelnen Proteine gleichermaßen von einer Änderung des Induktionszeitpunktes beeinflusst wird. Eine Induktion der Kulturen bei einer  $OD_{600}$  zwischen 0,6 und 1,0 zeigte keinen signifikanten Unterschied bei der gebildeten Produktmenge. Bei dichter bewachsenen Kulturen nahm die Produktbildungsrate jedoch langsam ab. Aus diesem Grund wurde die Proteinexpression im Folgenden induziert, sobald die Kultur eine optische Dichte von 0,8 erreicht hatte.

Die Kombination aller als optimal gefundenen Parameter für die Proteinexpression erbrachte eine Steigerung der Produktbildungsrate um den Faktor drei gegenüber den Ausgangsbedingungen.



**Abbildung 3.31:** Einfluss verschiedener Parameter während der Protein-Expression auf die Aktivität des Ganzzellsystems. A) Einfluss der IPTG-Konzentration auf die Produktbildungsrate B) Einfluss des Kulturvolumens auf die Produktbildungsrate C) Einfluss der Expressionsdauer auf die Produktbildungsrate D) Einfluss der Zelldichte zum Zeitpunkt der Induktion auf die Produktbildungsrate. Die grauen Balken zeigen jeweils die Produktbildungsrate, die schwarzen Messpunkte geben die Feuchtzellmasse an. Die Umsätze erfolgten in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) bei 30 °C für zwei Stunden. Die Standardabweichungen ergeben sich aus drei voneinander unabhängigen Umsetzungen.

Um nach der erfolgten Optimierung der Expressionsparameter einen Hinweis auf das Mengenverhältnis der Proteine des heterologen P450 Systems zueinander zu erhalten, wurden Western Blot-Analysen unter den optimalen Expressionsbedingungen durchgeführt. Zur Abschätzung der Proteinkonzentration wurde als Kontrolle jeweils heterolog exprimiertes und gereinigtes Protein in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen und mit der Proteinmenge aus dem Zelllysat verglichen. Die Ergebnisse der Immunodetektion sind in Abbildung 3.32 gezeigt.



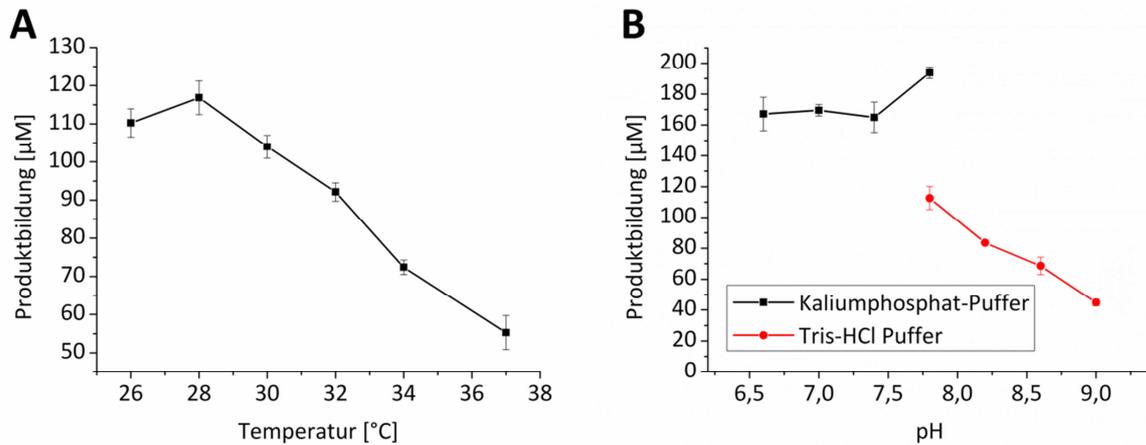
**Abbildung 3.32:** Western Blot-Analyse mit polyklonalen Antikörpern gegen A) Arh1 (MW  $\approx$  51 kDa), B) Etp1<sup>skf</sup> (MW  $\approx$  11,3 kDa) und C) CYP105A1 (MW  $\approx$  44 kDa). Spur 1 zeigt jeweils das Lysat von *E. coli*-Zellen, die Arh1 (Verdünnung 1:2), Etp1<sup>skf</sup> und CYP105A1 (Verdünnung 1:5) exprimieren, nach 15-stündiger Expression. Spur 2 zeigt den vorgefärbten molekularen Größenstandard. Die Spuren 3-8 enthalten jeweils das entsprechende rekombinant in *E. coli* exprimierte und gereinigte Protein in definierten Mengen (Arh1: 25; 50; 75; 125; 187,5; 250 ng; Etp1<sup>skf</sup> und CYP105A1: 10; 20; 30; 50; 75; 100 ng).

Etp1<sup>skf</sup> zeigte mit einem geschätzten Wert von  $11060 \pm 2210$  nmol/l den höchsten Expressionslevel. Die Werte für die beiden anderen Proteine liegen mit  $1817 \pm 455$  nmol/l für das CYP105A1 und  $1568 \pm 392$  nmol/l für das Arh1 deutlich niedriger (Janocha *et al.* 2013b).

### 3.8.4 Optimierung der Reaktionsbedingungen und NADPH-Versorgung

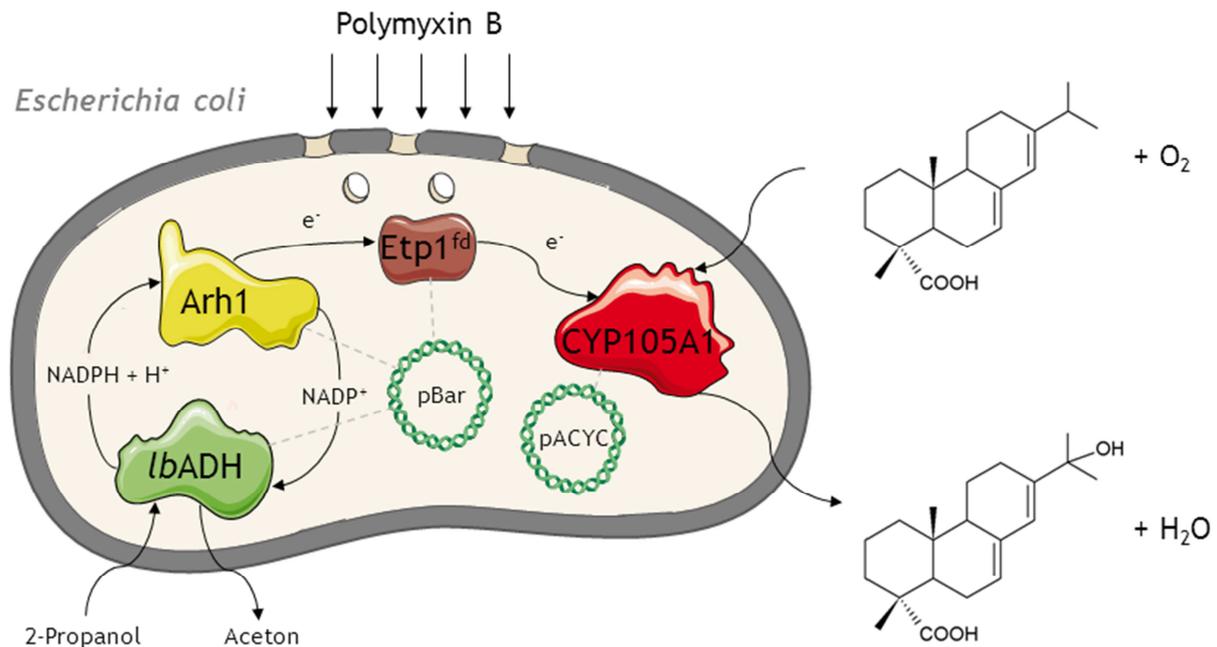
Da durch die Optimierung der Expressionsparameter eine deutliche Steigerung der gebildeten Produktmenge des Ganzzellsystems erreicht werden konnte, erfolgte zusätzlich die Untersuchung des Einflusses von pH und Temperatur während der Biokonversion auf die Produktbildungsrate. Zu diesem Zweck wurden die Proteine zunächst unter den zuvor optimierten Bedingungen exprimiert. Nach der Zellernte erfolgte der Umsatz mit ruhenden Zellen in Puffer für zwei Stunden unter den jeweiligen Bedingungen, bevor die Ansätze extrahiert und mittels HPLC analysiert wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigt Abbildung 3.33. Wie sich in Abbildungsteil A erkennen lässt, lag die optimale Reaktionstemperatur bei 28 °C. Bei höheren Temperaturen war eine rasche Abnahme der gebildeten Produktmenge erkennbar. So betrug bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C die isolierte Produktmenge bereits weniger als 50 % im Vergleich zum Temperaturoptimum. Einen weniger drastischen Einfluss auf das System hatte der pH-Wert (Abbildung 3.33 B). Zwischen pH 6,6 und 7,4 war kaum eine Änderung der Aktivität zu verzeichnen. Eine geringe Steigerung der Produktbildung ließ sich bei pH 7,8 beobachten. Um zu untersuchen, ob sich diese Tendenz bei höheren pH-Werten fortsetzte, wurde mit Tris-HCl ein weiterer Puffer mit Pufferkapazität im basischen Bereich getestet. Hierbei zeigte sich jedoch zum einen eine geringere Produktbildung als beim Kaliumphosphat-Puffer und zum anderen eine stetige Abnahme der Aktivität mit steigendem pH-Wert. Aus diesem Grund ist Kaliumphosphat-Puffer vorzuziehen. Alle weiteren Untersuchungen wurden in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,8 bei einer Umsatztemperatur

von 28 °C durchgeführt. Hierdurch konnte eine weitere Steigerung der Produktbildungsrate um 50 % gegenüber den Ausgangsbedingungen erreicht werden.



**Abbildung 3.33:** Einfluss von A) Temperatur und B) pH-Wert des Puffers auf die Produktbildungsrate des Ganzzellsystems. Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit erfolgte in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) bei verschiedenen Umsatztemperaturen. Die Bestimmung des optimalen pH-Wert für den Ganzzellumsatz wurde mit Kaliumphosphatpuffer für pH-Bereiche zwischen 6,5 und 7,8 sowie Tris-HCl-Puffer in pH-Bereichen zwischen 7,8 und 9,0 durchgeführt. Die Substratkonzentration betrug 400 µM und Proben wurden nach zwei Stunden genommen und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei voneinander unabhängigen Umsetzungen.

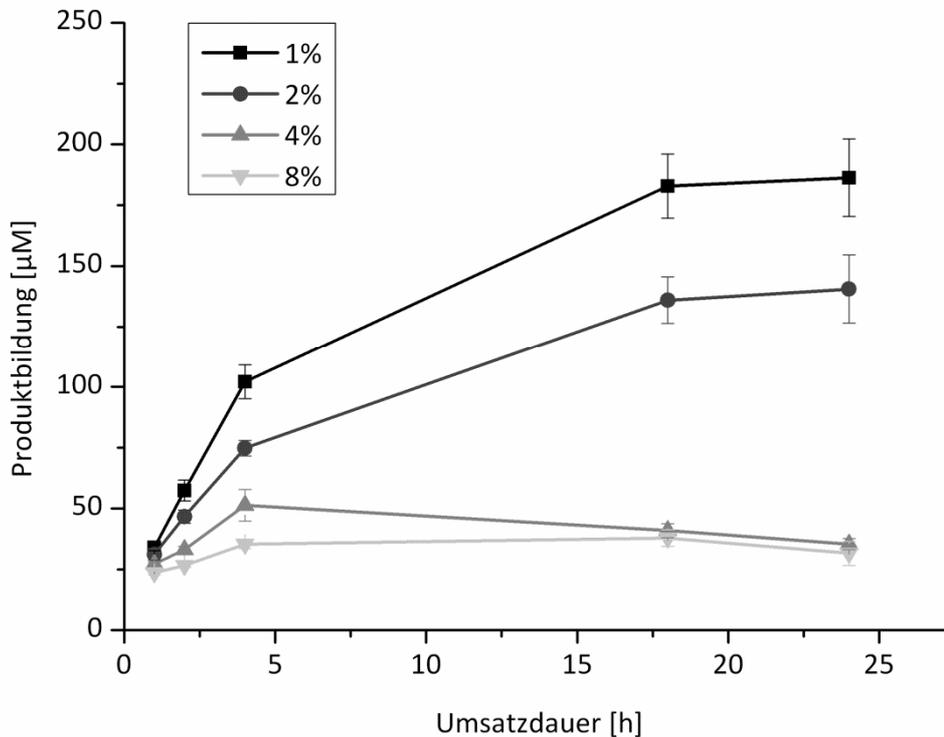
Ein limitierender Faktor für die Aktivität von Cytochromen P450 kann ferner die Verorgung mit ausreichenden Mengen an Reduktionsäquivalenten sein, denn die Enzyme sind bei ihrer katalytischen Aktivität auf stöchiometrische Mengen des Kofaktors NADPH angewiesen (Nebert und Gonzalez 1987). Eine bewährte Methode, um eine ausreichende NADPH-Versorgung des Cytochroms zu gewährleisten, ist die zusätzliche Expression eines enzymgesteuerten Regenerationssystems. Hierdurch lässt sich der Umsatz von Ganzzellsystemen oftmals um ein Vielfaches steigern. Aus diesem Grund wurde bei der Konstruktion der Plasmide für den Ganzzellumsatz zusätzlich die DNA einer Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LbADH) einkloniert, da diese durch Oxidation des Lösungsmittels 2-Propanol den Kofaktor NADP<sup>+</sup> wieder zu NADPH reduzieren kann. Eine schematische Übersicht über das Ganzzellsystem ist in Abbildung 3.34 gezeigt.



**Abbildung 3.34:** Schematische Übersicht über das Ganzzellsystem für den Umsatz von Harzsäuren. Die Expression von CYP105A1 aus *Streptomyces griseolus* sowie die heterologen Elektronentransfer-Proteine Arh1 und Etp1<sup>skf</sup> aus *Schizosaccharomyces pombe* erfolgte in *E. coli* JM109-Zellen. Für die enzymgekoppelte Regenerierung des Cofaktors NADPH wurde zusätzlich die LbADH exprimiert. Um eine bessere Substratverfügbarkeit innerhalb der Zelle zu gewährleisten, wurde Polymyxin B als permeabilisierendes Agens eingesetzt.

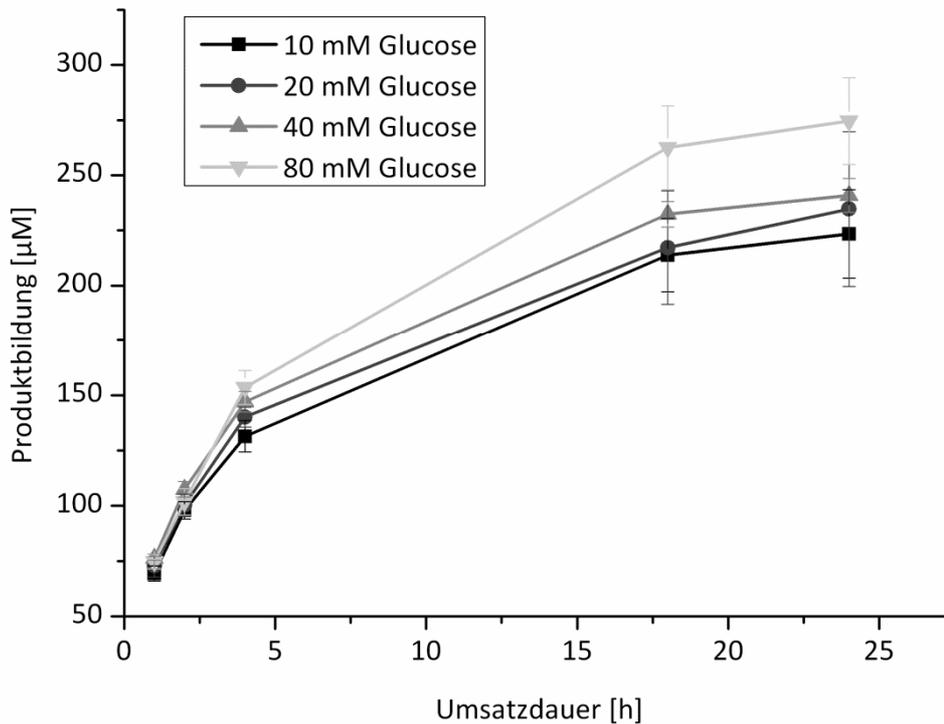
Bei vielen P450-Enzymen wirkt sich die Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels außerdem positiv auf die Umsatzraten aus. Allerdings können sowohl 2-Propanol als auch das durch die LbADH entstehende Aceton in höheren Konzentrationen schädlich auf die Produktionsenzyme und die Membran der Zellen wirken (Weber und de Bont 1996), was wiederum einen negativen Einfluss auf die Umsatzraten des Ganzzellsystems haben kann. Zur Evaluierung des Effektes der 2-Propanol-Konzentration auf die Produktbildungsrate wurden daher Ganzzellumsätze mit verschiedenen Konzentrationen des Lösungsmittels durchgeführt und über einen Zeitraum von 24 Stunden beprobt. Wie sich zeigte, fand bereits bei einer 2-Propanol-Konzentration von 2 % (v/v) eine deutliche Verringerung der Produktbildung statt (siehe Abbildung 3.35). Dieser Effekt nahm bei höheren Konzentrationen weiter zu, so dass bereits ab einer Konzentration von 4 % (v/v) der Umsatz praktisch vollständig zum Erliegen kam. Dieses Ergebnis war insofern unerwartet, als dass bei Mikroorganismen, die LbADH exprimieren, oftmals eine erhöhte Toleranz gegenüber 2-Propanol beobachtet werden konnte (Schroer *et al.* 2007). Hieraus wurde gefolgert, dass trotz der Notwendigkeit von 2-Propanol für die enzymgekoppelte NADPH-Regeneration die Konzentration des Ko-Substrats im vorliegenden Fall möglichst gering gehalten werden sollte, um einen negativen

Einfluss auf das Ganzzellsystem zu vermeiden. Aus diesem Grund erfolgte die Zugabe des Co-Substrats in einer Endkonzentration von 1 % (v/v).



**Abbildung 3.35:** Einfluss der 2-Propanol-Konzentration (v/v) auf die Produktbildungsrate des Ganzzellsystems. Die Umsetzungen erfolgten mit ruhenden Zellen in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) bei 28 °C und einer Substratkonzentration von 400 µM. Proben (500 µl) wurden nach 1, 2, 4, 16 und 24 Stunden genommen und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei voneinander unabhängigen Umsetzungen.

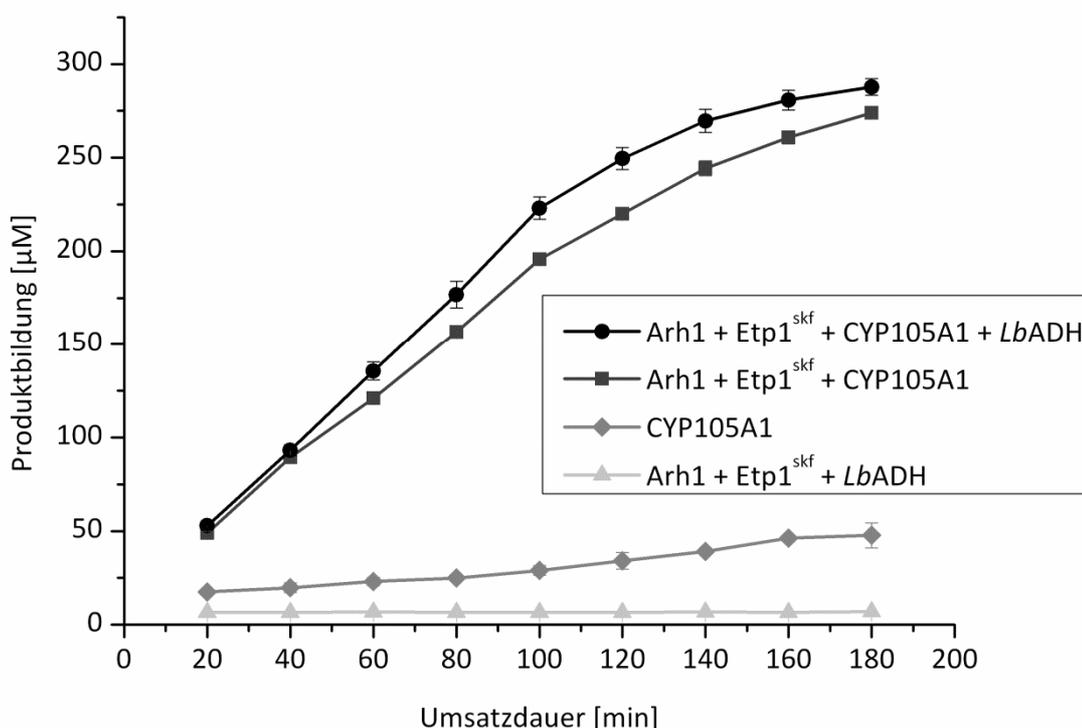
Eine weitere Möglichkeit, um die Versorgung des Cytochroms P450 mit ausreichenden Mengen an Reduktionsäquivalenten zu gewährleisten, ist die Aktivierung des wirtseigenen Metabolismus zur Produktion von NADPH. Hierfür hat sich insbesondere bei der Verwendung ruhender Zellen die Zugabe von Glucose als Energiequelle bewährt (Olaofe *et al.* 2013). Aus diesem Grund wurde der Einfluss verschiedener Glucose-Konzentrationen in den Reaktionsansätzen auf die Produktbildungsrate über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht. Bei einer Glucose-Konzentration von 80 mM konnte eine geringe Steigerung der Produktbildungsrate festgestellt werden (siehe Abbildung 3.36). Auf die Zugabe höherer Mengen Glucose wurde an dieser Stelle verzichtet, da es hierdurch leicht zu einem *overflow* Stoffwechsel und einer Akkumulation von Nebenprodukten kommen kann, was die Umsatzraten des Ganzzellsystems negativ beeinflussen würde (Olaofe *et al.* 2013). Für die folgenden Experimente wurde der Umsatzpuffer daher immer mit Glucose in einer Endkonzentration von 80 mM versetzt.



**Abbildung 3.36:** Einfluss der Glucose-Konzentration auf die Produktbildungsrate des Ganzzellsystems. Die Umsetzung erfolgte mit ganzen Zellen in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8) bei 28 °C und einer Substratkonzentration von 400 µM. Proben (500 µl) wurden nach 1, 2, 4, 16 und 24 Stunden genommen und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei voneinander unabhängigen Umsetzungen.

Um ein genaueres Bild über den Einfluss der *LbADH* auf den Ganzzellumsatz zu erhalten, wurde die gebildete Produktmenge der Ganzzellumsätze mit und ohne Regenerationssystem verglichen. Hierzu wurden die *E. coli* JM109 Wirtszellen jeweils mit pACYC\_CYP105A1 und pBar\_Triple\_pombe (mit *LbADH*) oder pACYC\_CYP105A1 und pBar\_Twin\_pombe (ohne *LbADH*) kotransformiert. Als Negativkontrolle wurde der Umsatz mit Zellen durchgeführt, die nur mit pBar\_Triple\_pombe transformiert waren. Eine zweite Negativkontrolle erfolgte mit Zellen, die nur das Plasmid pACYC\_CYP105A1 trugen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 3.37 zusammengefasst. Bei den Kontrollzellen, die kein CYP105A1 exprimierten, konnte kein Produkt nachgewiesen werden. Im Gegenzug ist bei den Zellen, die zwar das Cytochrom, aber keine Elektronentransfer-Proteine exprimierten, eine schwache Produktbildung erkennbar. Grund hierfür ist wahrscheinlich die Reduktion des P450 durch die *E. coli* eigenen Redoxproteine Flavodoxin (Fld) und NADPH-Flavodoxin-Reduktase (Fpr), für die auch schon eine Elektronenübertragung auf andere Cytochrome P450 beschrieben wurde (Jenkins und Waterman 1994, Ringle 2013). Im Fall der mit zwei Plasmiden kotransformierten Zellen ist jeweils eine deutliche Produktbildung erkennbar. Auffallend ist, dass die Produktbildungsrate der Zellen mit dem Regenerationssystem zwar höher ist,

aber sich mit einer Steigerung von etwa 10 % gegenüber den Zellen ohne die enzymgestützte Kofaktorregeneration kein besonders starker Effekt einstellte. Dies deutet darauf hin, dass die Versorgung mit NADPH nicht der limitierende Faktor der Biokonversion ist. Ein weiterer Grund dafür könnte sein, dass durch die zusätzliche Expression eines weiteren Enzyms der Anteil an heterolog exprimiertem CYP105A1 in der Zelle abnimmt, was der Umsatzsteigerung entgegenwirkt.



**Abbildung 3.37:** Vergleich der Produktbildung des Ganzzellsystems bei der Verwendung von Zellen die Arh1, Etp1<sup>skf</sup>, CYP105A1 sowie LbADH (schwarz), bzw. Arh1, Etp1<sup>skf</sup> und CYP105A1 (dunkelgrau) exprimierten. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die jeweils nur Arh1, Etp1<sup>skf</sup> und LbADH (hellgrau) oder nur CYP105A1 (grau) exprimierten. Der Umsatz erfolgte in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8) bei 28 °C. Die Substratkonzentration betrug 400 µM. Proben wurden alle 20 Minuten genommen und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die Standardabweichungen ergeben sich aus drei voneinander unabhängigen Umsetzungen.

### 3.8.5 Ganzzellumsatz unter optimierten Bedingungen

Durch die Permeabilisierung des Wirtes, die Verwendung ruhender Zellen und die Untersuchung und Optimierung verschiedener Parameter während der Proteinexpression und des Substratumsatzes konnte ein detailliertes Bild über den Einfluss dieser Faktoren auf das Ganzzellsystem gewonnen werden. Eine Übersicht der optimalen Bedingungen gibt Tabelle 3.7.

**Tabelle 3.7:** Übersicht der optimierten Expressions- und Umsatzbedingungen der Ganzzellumsätze in *E. coli*.

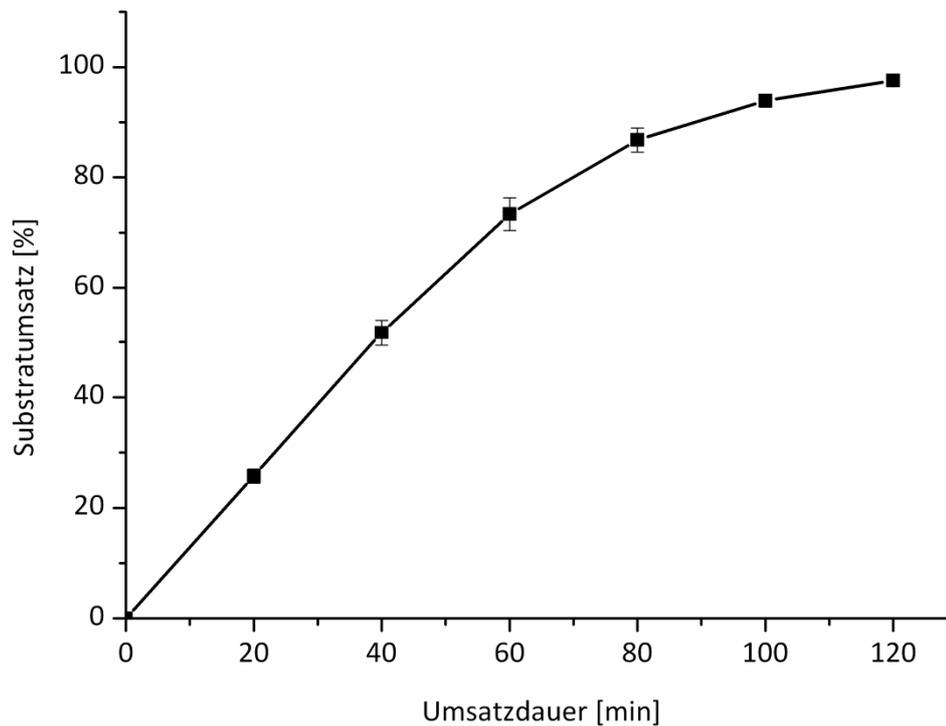
Expressionsbedingungen		Umsatzbedingungen	
Temperatur	24 °C	Temperatur	28 °C
Kulturvolumen	100 ml/ 300 ml Kolben	pH	7,8
Expressionszeit	15 Stunden	Isopropanol-Konzentration	1 % (v/v)
OD bei Induktion	0,8	Glucose-Konzentration	80 mM
IPTG-Konzentration	1 mM	Polymyxin B-Konzentration	32 µg/ml

Tabelle 3.8 gibt eine Übersicht des Einflusses der einzelnen Optimierungsparameter auf die Umsatzsteigerung des Ganzzellsystems. Dabei ist zu beachten, dass sich die einzelnen Faktoren nicht multiplikativ verhalten.

**Tabelle 3.8:** Übersicht des Einflusses der einzelnen Optimierungsparameter auf die Umsatzsteigerung des Ganzzellsystems.

Parameter	Faktor der Umsatzsteigerung
Permeabilisierung der Zellen	5
Verwendung ruhender Zellen	2,5
Optimierung der Expressionsbedingungen	3
Optimierung der Reaktionsbedingungen	1,5

Um Aufschluss über die Leistungsfähigkeit des Ganzzellsystems nach der Optimierung zu erhalten, erfolgte ein Umsatz von 200 µM Substrat unter Kombination aller optimierten Parameter. Im Unterschied zu den Optimierungsexperimenten wurde dieses Experiment in einem größeren Maßstab mit einem Kulturvolumen von 500 ml in 2 l Schikane-Kolben durchgeführt. Die Ergebnisse präsentiert Abbildung 3.38. Wie man erkennt, ist das eingesetzte Substrat bereits nach einer Reaktionsdauer von 2 Stunden vollständig in Produkt umgewandelt worden. Dabei wurde eine Anfangsgeschwindigkeit der Biotransformation von 125 µM/h erreicht. Dies sind außerordentlich gute Werte für ein P450-basiertes Ganzzellsystem; sie stellen eine deutliche Steigerung gegenüber der Ausgangssituation dar, bei der nach 24 Stunden, also der 12-fachen Dauer, lediglich etwa 20 µM Abietinsäure umgesetzt werden konnten.



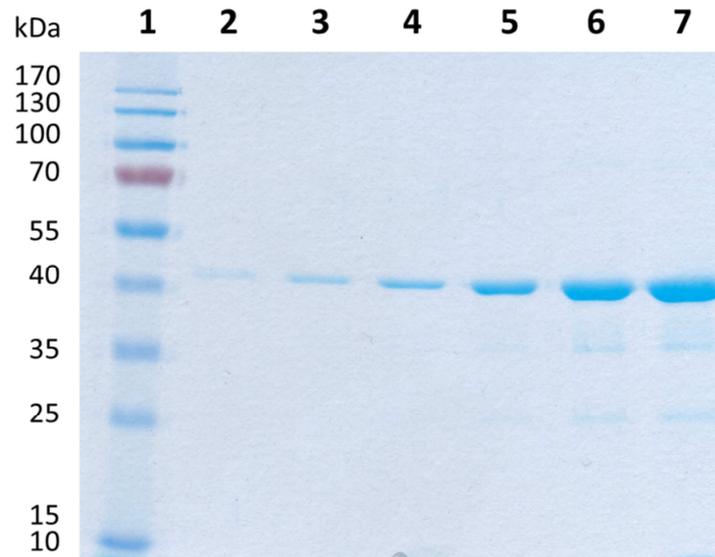
**Abbildung 3.38:** Ganzzellumsatz von Abietinsäure unter umfassend optimierten Bedingungen. *E. coli* Zellen wurden mit pACYC\_105A1 und pBar\_Triple\_pombe co-transformiert und bei einer  $OD_{600}$  von 0,8 mit 1 mM IPTG induziert. Die Protein-Expression erfolgte für 15 Stunden bei 24 °C. Nach dem Ernten wurden die Zellen in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8) resuspendiert. Der Umsatz erfolgte bei 28 °C. Die Substratkonzentration betrug 200  $\mu$ M und Proben wurden alle 20 Minuten genommen. Die Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

Im Ergebnis konnte in dieser Arbeit also ein Ganzzellsystem für den CYP105A1-katalysierten Umsatz von Harzsäuren in *E. coli* erfolgreich etabliert werden. Hierbei ermöglichten die beschriebenen Optimierungsmaßnahmen die Isolation ausreichender Produktmengen für anschließende NMR-spektroskopische Untersuchungen aus lediglich 50 ml Reaktionsvolumen nach einer sehr kurzen Umsatzzeit von 3 Stunden. Diese hohen Umsatzraten vereinfachen die für die Identifikation weiterer Produkte von Substratumsätzen des CYP105A1 nötige Reinigung beträchtlich. Darüber hinaus illustrieren sie das ausgesprochen große Potential dieses Enzyms für biotechnologische Anwendungen.

### 3.9 Kristallisation von CYP105A1

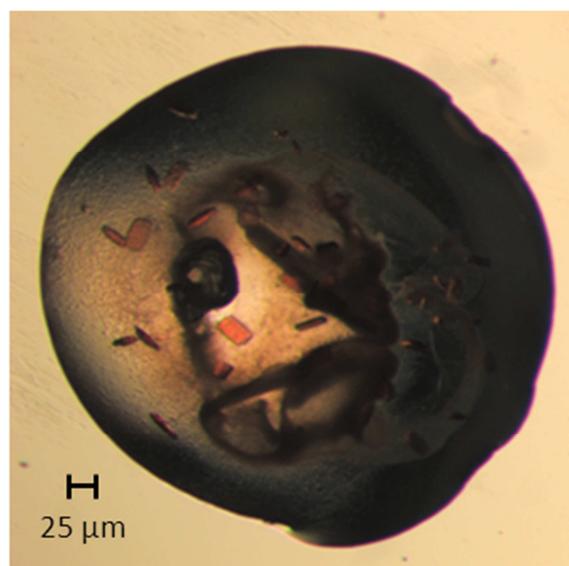
Die Kristallstruktur des CYP105A1 wurde bereits 2008 im Zusammenhang mit der Erforschung des biotechnologischen Potentials des Enzyms hinsichtlich der Umwandlung von Vitamin D<sub>3</sub> in die physiologisch aktive Form 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> geklärt (Sugimoto *et al.* 2008). Neben der Wildtyp-Struktur wurden außerdem die Kristallstrukturen verschiedener Mutanten mit erhöhter Hydroxylierungsaktivität gegenüber diesem Substrat veröffentlicht. In dieser Arbeit konnte mit dem Umsatz verschiedener Harzsäuren das Substratspektrum des CYP105A1 erfolgreich erweitert werden. Dabei waren insbesondere die hohe Aktivität und Stereoselektivität der 15-Hydroxylierung von Abietinsäure interessant, welche die Umsatzraten der Vitamin D<sub>3</sub> Biokonversion um ein Vielfaches übertrafen. Darüber hinaus ergab sich durch die Tatsache, dass die Abietinsäure ebenfalls durch das CYP106A2 umgesetzt wird, die sehr interessante Möglichkeit, zwei unterschiedliche P450-Enzyme mit hohem biotechnologischen Potential miteinander vergleichen zu können. Ein interessanter Aspekt dabei ist die Substratbindung, denn die Kenntnis der genauen Orientierung des Liganden im aktiven Zentrum liefert Grundlagen für weiterführende Studien wie beispielsweise die Einführung ortsgerichteter Mutationen zur Änderung der Stereo- oder Regioselektivität der Enzyme. Darüber hinaus können anhand der Struktur Hinweise auf die molekularen Grundlagen gewonnen werden, die zu den beobachteten Unterschieden in der Enzymaktivität führen. Aus diesem Grund erfolgte die Ko-Kristallisation des CYP105A1 mit dem Substrat Abietinsäure.

Im Gegensatz zum CYP106A2, bei dem die Expression ohne Affinitätsmarker erfolgte, wurde das CYP105A1 wie zuvor beschrieben mit einem C-terminalen hexa-Histidin-tag in *E. coli* JM109 exprimiert (Sugimoto *et al.* 2008). Die Reinigung des Proteins erfolgte in zwei Stufen über Metallionen-Affinitätschromatographie mit chelatierten Nickel-Ionen und Größenausschlusschromatographie. Auf diese Weise konnte ein Q-Wert von 2,32 erreicht werden, was deutlich über den in der Literatur angegebenen Werten von 1,65 und 1,72 liegt (Omer *et al.* 1990, Kleser 2011). Anhand der gelelektrophoretischen Analyse wurde analog zur Bestimmung des Reinheitsgrades des CYP106A2 eine Reinheit von mindestens 95 % ermittelt (siehe Abbildung 3.39).



**Abbildung 3.39:** SDS-PAGE (12 %) des gereinigten CYP105A1. Spur 1: Protein-Marker IV (PeqLab). Spur 2-7: CYP105A1 in aufsteigenden Mengen (0,5; 1; 2; 5; 10 und 15 µg).

Für die Kristallisationsexperimente wurde die Proteinkonzentration auf 20 mg/ml eingestellt, was einer molaren Konzentration von etwa 450 µM entspricht. Da das CYP105A1 in der substratgebundenen Form kristallisiert werden sollte, wurde dem Protein Abietinsäure, gelöst in DMSO, in einer Endkonzentration von 2 mM hinzugegeben. Dies entspricht etwa einem 4-5 fachen molaren Überschuss des Substrats. Wie auch im Fall des CYP106A2 erfolgten die ersten Kristallisationsversuche mit dem *Crystal Screen HT* von Hampton Research. Hierbei konnte die Bildung von Kristallen nach einem Inkubationszeitraum von 7-9 Tagen beobachtet werden (siehe Abbildung 3.40). Die entsprechende Kristallisationslösung setzte sich wie folgt zusammen: 0,2 M Natriumacetat, 0,1 M Natriumcacodylat, pH 6,5 und 30 % (w/v) PEG 8000.



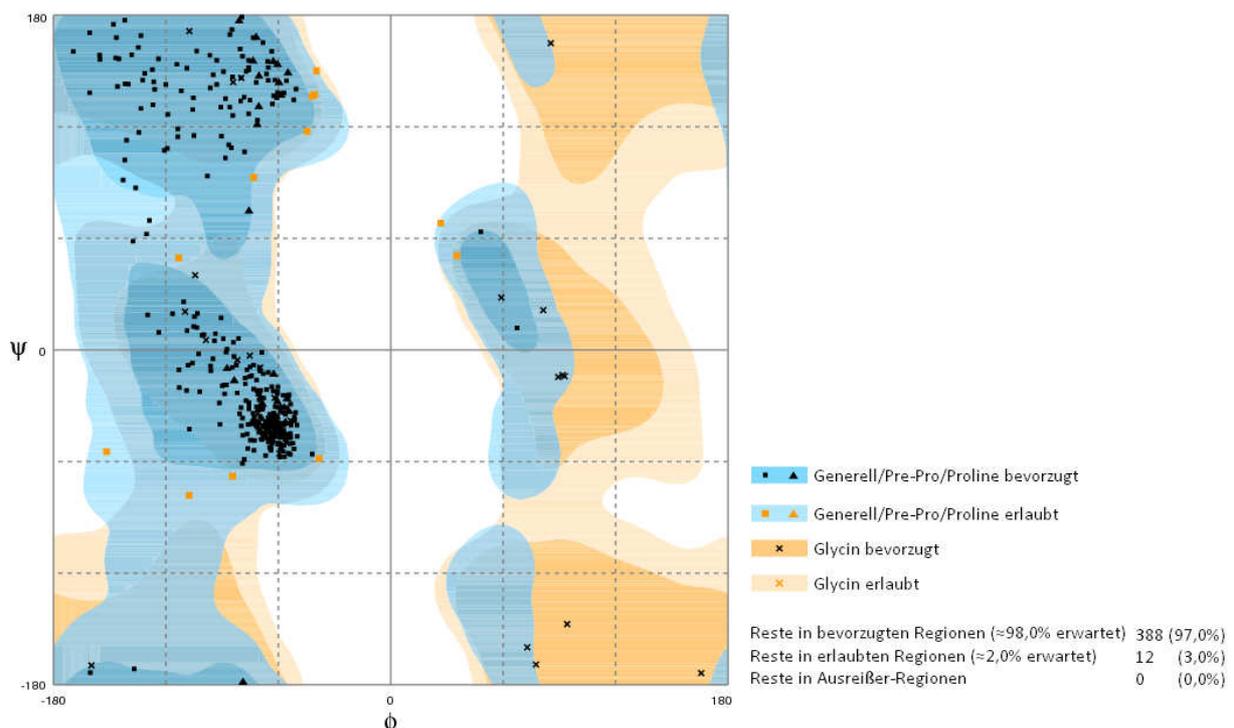
**Abbildung 3.40:** Kristalle von CYP105A1 nach dem ersten Screening.

Die Reproduzierbarkeit der Kristallisation wurde ebenfalls mit selbst angesetzten Lösungen und der Methode des hängenden Tropfens getestet. Die analog zur Kristallisation des CYP106A2 durchgeführte Optimierung der Kristallisationsbedingungen zeigte auch beim CYP105A1 einen positiven Einfluss durch die Absenkung des pH-Wertes. Die letztlich zur Kristallisation benutzten Lösungen hatten die Zusammensetzung 0,2 M Natriumacetat, 0,1 M Natriumcacodylat, pH 5,9 und 30 % (w/v) PEG 8000. Als optimale Kryobedingung erwies sich der Zusatz von 15 % Glycerol oder 5 % PEG 400.

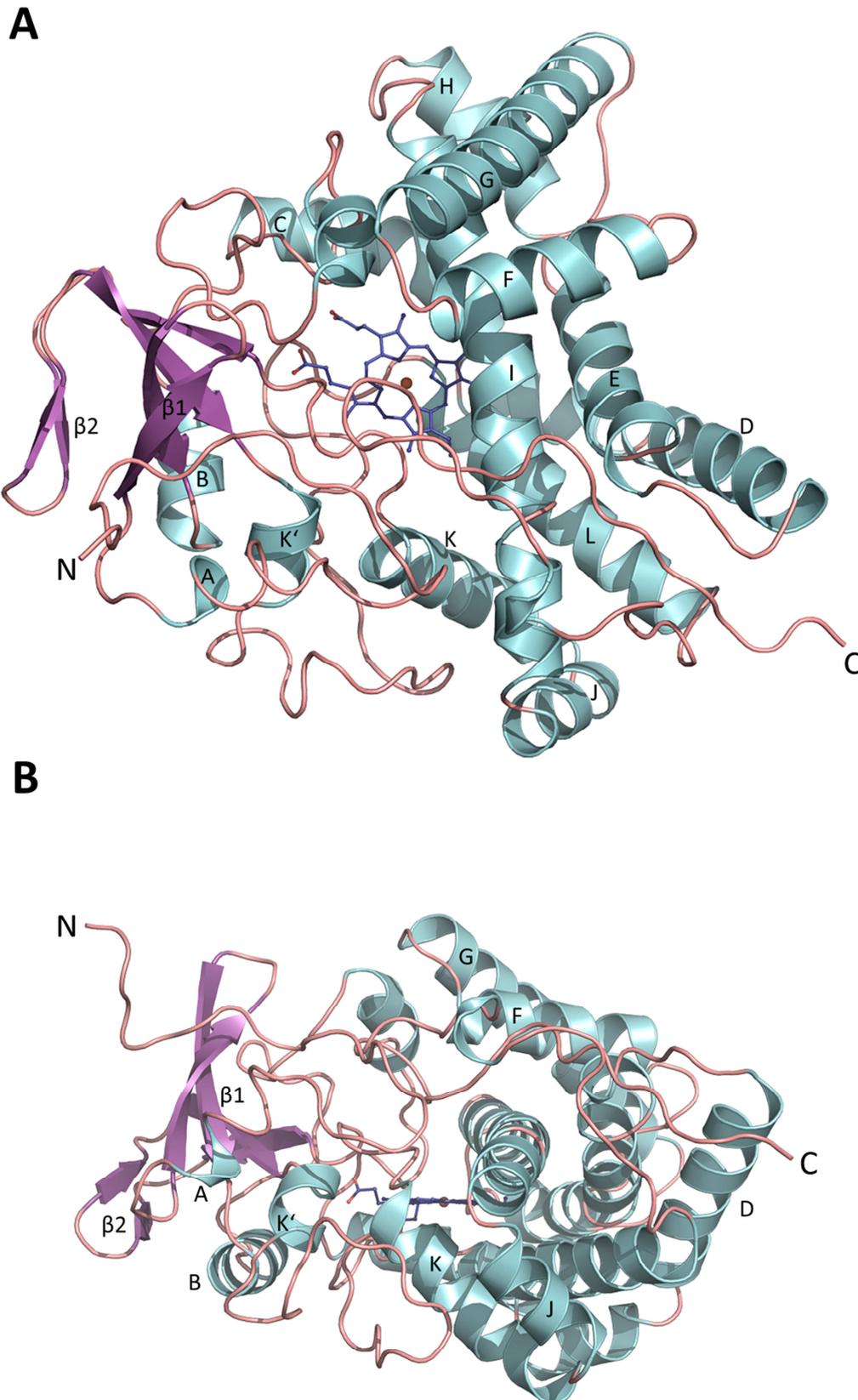
Von einem CYP105A1 Kristall wurden an der ESRF in Grénoble zwei Datensätze bis zu einer Auflösung von 1,6 Å und 1,8 Å gemessen. Der Kristall wies die Raumgruppe  $P2_12_12_1$  mit den Zellparametern  $a=52,895$  Å,  $b=53,540$  Å,  $c=140,200$  Å und  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$  auf und war damit fast identisch mit den Zellparametern des Kristalls von Sugimoto *et al.* (2008). Der Matthews-Koeffizient mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit betrug 2,04 bei einem Lösemittelgehalt von 39,36 %. Da die einzelnen Datensätze eine geringe Vollständigkeit von jeweils etwa 80 % aufwiesen, wurden sie nach der Prozessierung mit iMosflm in Scala vereinigt. Die höchste Auflösungsgrenze des zusammengeführten Datensatzes wurde auf 1,8 Å gesetzt. Als Modellstruktur für den molekularen Ersatz wurde die CYP105A1 Wildtyp-Struktur mit gebundenem Imidazol (PDB-Eintrag 2ZBX) verwendet. Die Prozessierung der Daten erfolgte wie für das CYP106A2 beschrieben (siehe Abschnitt 3.3).

### 3.10 Strukturlösung des CYP105A1

Die Struktur des CYP105A1 wurde mit einer Auflösung von 1,8 Å bestimmt und beinhaltet 402 Aminosäuren. Neben den ersten sieben Aminosäuren des N-Terminus konnten die drei C-terminalen Histidine des hexa-Histidin-tags auf Grund mangelnder Elektronendichte nicht modelliert werden. Die asymmetrische Einheit enthielt neben einem CYP105A1 Molekül den Häm-Kofaktor und 247 Wassermoleküle. Außerdem wurde vorhandene Elektronendichte im aktiven Zentrum zweifelsfrei der gebundenen Abietinsäure zugeordnet. Hierbei entsprach die Orientierung des Substrats jedoch nicht den durch das Substrat-Docking gemachten Vorhersagen. Interessanterweise erlaubt sie auch nicht die Hydroxylierung der Abietinsäure an der experimentell beobachteten Position, wodurch die physiologische Relevanz dieser Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum fraglich erscheint. Damit in Zusammenhang steht die Beobachtung einer weiteren, direkt über dem zentralen Eisenatom des Häms, detektierten Elektronendichte. Diese war eindeutig zu groß für ein gebundenes Wassermolekül und wurde einem Molekül DMSO zugeordnet. Davon abgesehen erlaubten die Strukturdaten des CYP105A1 auch eine Modellierung des Bereiches des BC-Loops um die Aminosäuren Ala87 bis Glu90, die in der Struktur von Sugimoto *et al.* (2008) aufgrund fehlender Elektronendichte nicht modelliert werden konnten. Der  $R_{\text{cryst}}$ -Wert der Struktur beträgt 19,5 % und der  $R_{\text{free}}$ -Wert 24,9 %. Weitere statistische Daten sind in Tabelle 3.9 angegeben. Das Ramachandran-Diagramm zeigt keine Aminosäuren in der verbotenen Region (siehe Abbildung 3.41). Eine Übersicht der Faltung des Enzyms liefert Abbildung 3.42.



**Abbildung 3.41:** Ramachandran-Diagramm der Struktur von CYP105A1, berechnet mit RAMPAGE (Lovell *et al.* 2002).



**Abbildung 3.42:** Übersicht der Gesamtstruktur des CYP105A1 bei einer Auflösung von 1,8 Å in Cartoon-Darstellung. A) Aufsicht von der distalen Seite und B) Seitenansicht. Die Sekundärstrukturelemente sind nach der CYP-üblichen Nomenklatur benannt und der Häm-Kofaktor ist als Kugel-Stab-Modell dargestellt.

**Tabelle 3.9:** Statistische Werte der Datensammlung und Verfeinerung des CYP105A1.

Datensammlung und -prozessierung	CYP105A1	
<b>Datensatz</b>	<b>Datensatz 1 (1,8 Å)</b>	<b>Datensatz 2 (1,6 Å)</b>
Röntgenquelle	ID14-4	ID14-4
Detektor	Q315r ADSC CCD	Q315r ADSC CCD
Wellenlänge [Å]	0,939	0,939
Temperatur [K]	100	100
Abstand Kristall-Detektor [mm]	258,138	222,006
Belichtungsdauer [s]	0,17	0,3
Oszillation/Bild [°]	0,5	0,5
Gesamtoszillation	100	100
Statistiken der zusammengesetzten Datensätze (Scala)		
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	
Zelldimensionen		
a/b/c [Å]	52,895/53,540/140,200	
$\alpha/\beta/\gamma$ [°]	90/90/90	
Auflösungsgrenze [Å]	1,8 (1,9-1,8)	
Vollständigkeit [%] <sup>1</sup>	96,6 (95,7)	
Anzahl der observierten Reflexe		
alle	223147	
unabhängig	36327	
Durchschnittliche Redundanz <sup>1</sup>	6,1 (6,5)	
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ <sup>1</sup>	8,7 (2,7)	
R <sub>meas</sub> <sup>1,2</sup>	23,8 (56,4)	
R <sub>p.i.m.</sub> <sup>1,3</sup>	9,4 (20,3)	
B-Faktor aus Wilson-Plot [Å <sup>2</sup> ]	27,7	
Verfeinerung		
Auflösungsgrenze [Å] <sup>1</sup>	1,8 (1,847-1,800)	
Anzahl der unabhängigen Reflexe <sup>1</sup>	34413 (2473)	
Vollständigkeit der Daten [%] <sup>1</sup>	95,90 (95,05)	
R <sub>cryst</sub> [%] <sup>1,4</sup>	19,5 (26,3)	
R <sub>free</sub> [%] <sup>1,5</sup>	24,92 (35,3)	
Anzahl der Atome		
Protein	3468	
Lösungsmittel	288	
Ramachandran-Plot <sup>6</sup>		
favorisiert	92,8	
erlaubt	6,9	
ungünstig	0,3	
Koordinatenfehler [Å] <sup>7</sup>	0,222	
Rms-Abweichung von idealen Werten		
Bindungslängen [Å]	0,019	
Bindungswinkel [°]	1,985	
Durchschnittlicher B-Faktor [Å <sup>2</sup> ]		
Peptid-Rückgrat	21,80	
Seitenketten	26,70	
Lösungsmittel	31,02	
Substrat	42,60	

Legende:

<sup>1</sup> Werte für die Schale mit der höchsten Auflösung in Klammern

$$^2 R_{meas} = \sum_{\mathbf{h}} \left( \frac{n_{\mathbf{h}}}{n_{\mathbf{h}}-1} \right) \sum_l |I_{hl} - \langle I_{\mathbf{h}} \rangle| / \sum_{\mathbf{h}} \sum_l \langle I_{\mathbf{h}} \rangle$$

$$^3 R_{p.i.m.} = \sum_{\mathbf{h}} \left( \frac{1}{n_{\mathbf{h}}-1} \right) \sum_l |I_{hl} - \langle I_{\mathbf{h}} \rangle| / \sum_{\mathbf{h}} \sum_l \langle I_{\mathbf{h}} \rangle$$

mit  $n_{\mathbf{h}}$  als Anzahl der Observationen von Reflex  $\mathbf{h}$ ,  $I_{hl}$  gleich der  $l$ -ten Observation von Reflex  $\mathbf{h}$ , und  $\langle I_{\mathbf{h}} \rangle$  der gewichteten durchschnittlichen Intensität aller Observationen  $l$  von Reflex  $\mathbf{h}$  (Evans 2006)

$$^4 R_{cryst} = 100 \sum | |F_{obs}| - |F_{calc}| | / \sum |F_{obs}|$$

mit  $F_{obs}$  und  $F_{calc}$  als den gemessenen bzw. berechneten Strukturfaktor-Amplituden

<sup>5</sup> Die Berechnung von  $R_{free}$  erfolgt analog zur Berechnung von  $R_{cryst}$  unter Ausschluss von 5 % der Reflexe (Brünger 1992)

<sup>6</sup> Berechnet mit PROCHECK (Laskowski *et al.* 1993)

<sup>7</sup> Berechnet mit SFCHECK (Vaguine *et al.* 1999), basierend auf einem Luzzati-Plot

## 4 Diskussion

Das Anliegen dieser Arbeit bestand in der Untersuchung des Umsatzes von Harzsäuren durch die bakteriellen Cytochrome P450 CYP105A1 und CYP106A2. Diterpenoide Harzsäuren des Abietan- und Pimaran-Typs weisen eine Reihe interessanter Eigenschaften auf, wozu ihre Toxizität gegenüber Wasserorganismen, das hohe allergene Potential vieler oxidierten Derivate, aber auch antimikrobielle Wirkungen gehören. Da sie den Hauptbestandteil des Harzes von Koniferen bilden, stellen sie ein gut verfügbares Ausgangsmaterial für weitere Funktionalisierungen durch Cytochrome P450 dar.

Mittels Methoden wie der differenzspektroskopischen Untersuchung der Bindung im aktiven Zentrum sowie anhand von *in vitro* Rekonstitutionsassays wurden zunächst Substrataffinität und -spezifität des CYP106A2 gegenüber diesen Substanzen charakterisiert. Um die molekularen Grundlagen der Substratbindung näher zu untersuchen und darüber hinaus wichtige strukturelle Erkenntnisse über das biotechnologisch interessante CYP106A2 zu gewinnen, erfolgte die Ko-Kristallisation des Enzyms im Komplex mit der Abietinsäure. Die Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehung der Substratbindung im CYP106A2 ist auch deshalb interessant, weil die dreidimensionale Struktur bis dato nicht bekannt gewesen ist.

Im Falle des CYP105A1 deuteten die Ergebnisse der korrespondierend zum CYP106A2 durchgeführten Untersuchung von Affinität und Aktivität gegenüber den Harzsäuren auf ein hohes Potential des Enzyms als Biokatalysator hin. Aus diesem Grund wurde nach der Bestimmung der Enzymkinetik und Identifikation der Reaktionsprodukte mittels NMR-Spektroskopie ein Ganzzellsystem für den Umsatz von Harzsäuren durch CYP105A1 in *E. coli* entwickelt und charakterisiert. Gleichzeitig sollten auch für dieses Enzym anhand der Abietinsäure die molekularen Grundlagen der Substratbindung näher beleuchtet werden, weswegen das CYP105A1 zum Zweck der Strukturaufklärung ebenfalls zusammen mit der Abietinsäure kristallisiert wurde.

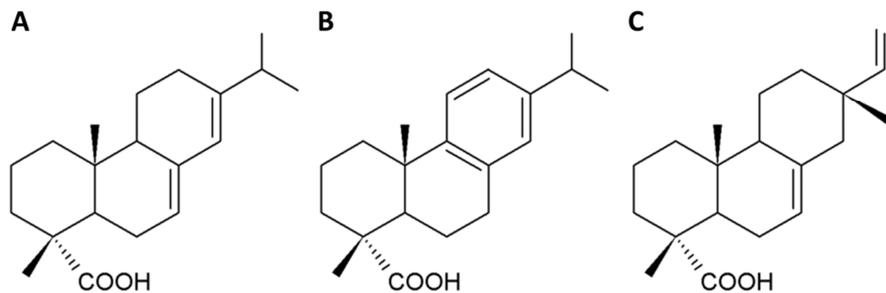
Die im Rahmen der Arbeit erhaltenen und im vorherigen Kapitel präsentierten Ergebnisse und die daraus abgeleiteten Erkenntnisse sollen nun eingehend diskutiert werden.

### 4.1 *In vitro* Charakterisierung des CYP106A2

Besonders in jüngerer Vergangenheit wurde eine Reihe neuer Substrate für das CYP106A2 beschrieben (Bleif *et al.* 2011, Schmitz *et al.* 2012). Dabei konnten wichtige neue Erkenntnisse über die Substratspezifität gewonnen werden, die durch die Untersuchung von Bindung und Umsatz ausgewählter Diterpenoide im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter vertieft wurden.

Als besonders bemerkenswert erwies sich das unterschiedliche *spin shift* Verhalten von Abietinsäure, Dehydroabietinsäure und Isopimarsäure. Wie in Abbildung 4.1 zu erkennen ist, unterscheiden sich

die Substanzen lediglich durch die Anzahl und Position der Doppelbindungen sowie den Substituenten am C13.



**Abbildung 4.1:** Strukturformeln von A) Abietinsäure, B) Dehydroabietinsäure und C) Isopimarsäure.

Bei Typ-I-Substraten wird der *spin shift* durch die Verdrängung des Wassers als sechsten Liganden des Häms und damit verbunden durch den Übergang vom hexakoordinierten *low spin* Zustand in den pentakoordinierten *high spin* Zustand ausgelöst. Da alle getesteten Harzsäuren des Pimaran-Typs einen Typ-I-shift zeigten, während die Abietansäuren keinen *spin shift* auslösten, kann gefolgert werden, dass die Bindung der Substrate auf eine Weise erfolgt, die den Substituenten am C13 in räumlicher Nähe des Häms positioniert und somit einen Einfluss auf das am Häm gebundene Wassermolekül ausübt. Diese These wird durch die zuvor ermittelte Hydroxylierungsposition der Abietinsäure am C12 gestützt (Bleif *et al.* 2011). Dieses Substrat stellt jedoch gleichzeitig einen Sonderfall dar, da sie ein Typ-II-Differenzspektrum auslöst. Ein solches Spektrum ist normalerweise charakteristisch für Inhibitoren von Cytochromen P450. Zwar sind auch Fälle beschrieben, in denen Typ-II-Substanzen umgesetzt werden können, jedoch handelt es sich dabei im Allgemeinen um stickstoffhaltige Verbindungen. Mit dem freien Elektronenpaar des Stickstoffs treten die Liganden des Typs II direkt in die Koordinationssphäre des zentralen Eisenatoms ein. Theoretisch besteht auch die Möglichkeit, dass durch die Substratbindung das Wassermolekül in seiner Position fixiert wird. Wieso es bei der Bindung der Abietinsäure zu einem Typ-II-shift kommt, kann nicht mit endgültiger Sicherheit geklärt werden. Einen Erklärungsansatz liefert allerdings die bei der Strukturaufklärung des Enzyms beobachtete ungewöhnlich enge Bindung dieses Substrates direkt über dem Häm-Kofaktor. Interessant ist diese Beobachtung auch vor dem Hintergrund, dass die strukturell fast identische Dehydroabietinsäure keinen *spin shift* auslöst. Dies deutet darauf hin, dass die Flexibilität des C-Rings der Harzsäuren von entscheidender Bedeutung für das Auftreten dieses Phänomens ist.

Durch die *in vitro* Umsätze der Diterpenoide konnte gezeigt werden, dass sowohl die Harzsäuren als auch die Alkohole und Aldehyde Substrate des CYP106A2 sind. Anders als die differenzspektroskopischen Untersuchungen vermuten ließen, hat dabei weder die Lage der Doppelbindungen in der Diterpenstruktur noch der Substituent am C13 einen Einfluss darauf, ob die Substanz vom CYP106A2 umgesetzt wird oder nicht. Im Unterschied dazu scheint jedoch die

funktionelle Gruppe am C4 eine entscheidende Rolle bei der Substratbindung im aktiven Zentrum zu spielen. Dies zeigt sich dadurch, dass die Olefine mit einer hydrophoben Methylgruppe am C4 nicht umgesetzt werden konnten, während sowohl die Alkohole, als auch die Aldehyde und Carbonsäuren in eine unterschiedliche Anzahl oxidierter Produkte überführt wurden. Daraus lässt sich ableiten, dass der Sauerstoff an dieser Position anscheinend essentiell für die Bindung der Substanzen im aktiven Zentrum ist. Eine Erklärung wäre ein Bindemechanismus, bei dem die Aminosäuren, die die Substratbindetasche auskleiden, eine Wasserstoffbrückenbindung zum Sauerstoff der funktionellen Gruppe des Substrats ausbilden. Hierfür bieten sich besonders geladene und polare Seitenketten im Bereich des BC-Loops an.

## 4.2 Kristallstruktur des CYP106A2

Die Struktur des CYP106A2 konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig mit einer Auflösung bis 1,8 Å bestimmt werden. Die Suche nach Kristallisationsbedingungen erfolgte in nativer Form sowie im Komplex mit verschiedenen Substraten oder Inhibitoren. Bei den einzelnen Ansätzen konnten deutliche Unterschiede im Kristallwachstum festgestellt werden. Während sich im Falle des ungebundenen CYP106A2 unter keiner der getesteten Bedingungen Kristalle bildeten, konnte für die Ansätze mit den Steroids substraten und Inhibitoren ausschließlich die Bildung von Platten beobachtet werden. Lediglich bei der Ko-Kristallisation mit der Abietinsäure erfolgte das Wachstum von Einkristallen. Somit scheint die außergewöhnliche Art der Bindung dieses Substrats das CYP106A2 zu stabilisieren, was die *conditio sine qua non* für die erfolgreiche Kristallisation des Proteins darstellt. Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um die erste Beschreibung der Kristallstruktur des CYP106A2 handelt, erfolgt anschließend zunächst eine Diskussion konservierter Motive und der Vergleich mit anderen CYP-Strukturen.

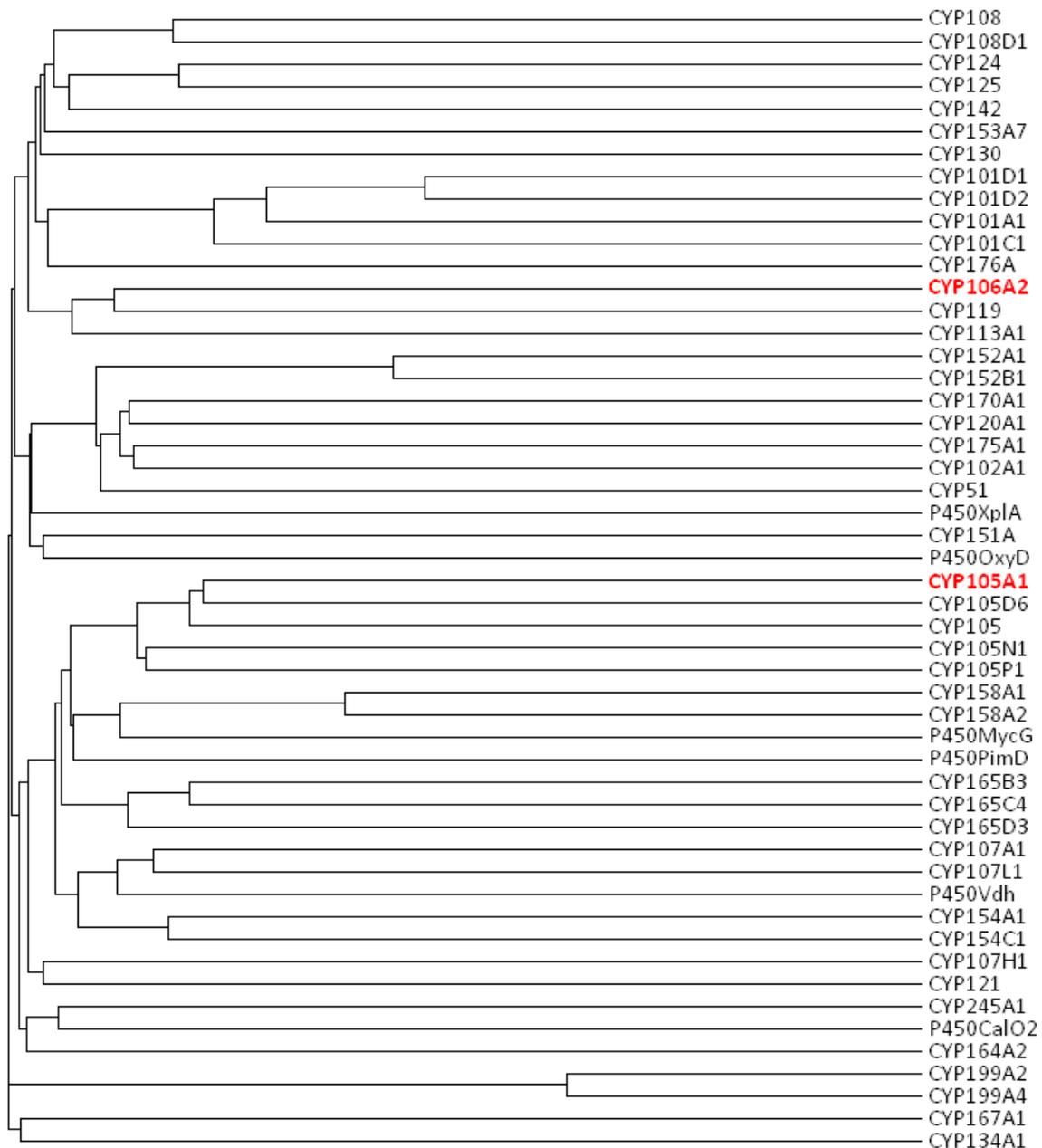
### 4.2.1 Vergleich mit homologen Strukturen

Die Cytochrome P450 stellen eine sehr große Proteinsuperfamilie mit einer Vielzahl von Mitgliedern dar. Von den bis zum jetzigen Zeitpunkt knapp über 600 veröffentlichten P450-Strukturen (Stand: März 2013) stammen über die Hälfte aus Bakterien und Archaeen. Dies liegt zum einen daran, dass bakterielle P450-Enzyme den Vorteil haben, dass sie im Gegensatz zu ihren eukaryotischen Homologen löslich vorliegen und sich somit oftmals einfacher kristallisieren lassen. Zum anderen besteht auf Grund ihres hohen biotechnologischen Potentials ein großes Interesse an der Strukturaufklärung prokaryotischer P450s. Dies zeigt sich phänomenologisch an dem hohen Anteil aufgeklärter Strukturen von Cytochromen aus Biosyntheseclustern von *Streptomyces*. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die aktuell in der PDB abrufbaren Kristallstrukturen zusammen mit dem jeweiligen Wirtsorganismus und der Funktion bzw. den beschriebenen Substraten des Enzyms, soweit diese identifiziert sind. Das Kladogramm in Abbildung 4.2 zeigt den phylogenetischen Verwandtschaftsgrad dieser Cytochrome untereinander. Als Maß hierfür wurde die Sequenzidentität herangezogen. Mitglieder der gleichen CYP-Familie weisen eine Sequenzidentität von über 55 % auf, wohingegen dieser Wert bei Vertretern unterschiedlicher Familien oftmals unter 20 % liegt (Hasemann *et al.* 1995). Wie sich gut erkennen lässt, stehen die verschiedenen Mitglieder gleicher P450-Familien deshalb naturgemäß nahe beieinander. Im Unterschied dazu ist das CYP106A2 relativ isoliert, wobei der nächste Verwandte das CYP119 ist, dessen Struktur auch für den molekularen Ersatz verwendet wurde.

**Tabelle 4.1:** Übersicht der bisher kristallisierten Cytochrome P450 aus Bakterien und Archaeen.

Enzym	PDB-Eintrag	Organismus	Substrat/Produkt bzw. Funktion
CYP51	1H5Z, 2BZ9, 2CIB, 2CIO, 2VKU, 3G1Q	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Sterol 14 $\alpha$ Demethylase
CYP101A1 (P450cam)	(2-8)CPP, (1-4)CP4, 1OXA, 50+ weitere	<i>Pseudomonas putida</i>	Campher
CYP101C1	3OFT, 3OFU	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	$\alpha$ - und $\beta$ -Ionon
CYP101D1	3LXD, 3LXF, 3LXH, 3LXI	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	Campher
CYP101D2	3NV5, 3NV6, 4DXY	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	Campher
CYP102A1 (P450BM3)	1Z04, 1Z09, 1Z0A, 1JME, 50+ weitere	<i>Bacillus megaterium</i>	$\omega$ -2-Fettsäure-Hydroxylase
CYP105 (P450 MoxA)	2Z36	<i>Nonomuraea recticatena</i>	Breites Substratspektrum
CYP105A1	3CV8, 3CV9, 2ZBX, 2ZBY, 2ZBZ	<i>Streptomyces griseolus</i>	Breites Substratspektrum
CYP105D6	3ABB	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Filipin
CYP105N1	3TYF, 4FXB	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Coelibactin-Biosynthese
CYP105P1	3E5J, 3E5K, 3E5L	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Filipin
CYP107A1 (P450eryF)	1Z8O, 1Z8P, 1Z8Q, 1JIN, 1JIO, 1JIP, 1EUP	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	6-Desoxyerythronolid B Hydroxylase/ Erythromycin D
CYP107H1 (P450 Biol)	3EJB, 3EJD, 3EJE	<i>Bacillus subtilis</i>	Biotin-Synthese
CYP107L1 (P450 PikC)	2VZ7, 2VZM, 2CD8, 2CA0, 2BVJ, 2C6H, 2C7X, 2WHW, 2WI9	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Pikromycin, Narbomycin
CYP108 (P450terp)	1CPT	<i>Pseudomonas spec.</i>	$\alpha$ -Terpineol
CYP108D1	3TKT	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	Aromatische Kohlenwasserstoffe
CYP113A1 (P450eryK)	1EGY, 2WIO, 2JJN, 2JJO, 2JJP, 2VRV	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Erythromycin D
CYP119	1IO7, 1IO8, 1IO9, 1F4T, 1F4U	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Unbekannt
CYP120A1	2VE3, 2VE4	<i>Synechocystis spec.</i>	Retinsäure
CYP121	1N4G, 1N40, 3CY0, 3CY1, 3CXV, 3CXW, 3CXX, 3CXY, 3CXZ, 3G5F, 3G5H	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tyrosin-Diketopiperazin-Kopplung
CYP124	2WM4, 2WM5	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	$\omega$ -Fettsäure-Hydroxylase
CYP125	3IW0, 3IW1, 3IW2,	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cholesterin-Hydroxylase
CYP130	2UVN, 2UUQ, 2WGY, 2WHF, 2WH8	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Unbekannt
CYP134A1 (P450 cypX)	3NC3, 3NC5, 3NC6, 3NC7	<i>Bacillus subtilis</i>	Diketopiperazin-Kopplung
CYP142	2XKR	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Cholesterin-Stoffwechsel
CYP142	2YOO, 3ZBY	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Cholesterin-Stoffwechsel
CYP151A (P450 AurH)	3P3L, 3P3O, 3P3X, 3P3Z	<i>Streptomyces thioleetus</i>	Aureothin-Biosynthese
CYP152A1 (P450BS $\beta$ )	1IZO	<i>Bacillus subtilis</i>	Fettsäure-Oxidation

CYP152B1 (P450SP $\alpha$ )	3AWM, 3AWP, 3AWQ, 3VM4	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Fettsäure-Oxidation
CYP153A7 (P450pyr)	3RWL	<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i>	Breites Substratspektrum
CYP154A1	1ODO	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Unbekannt
CYP154C1	1GWI	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Makrolide
CYP158A1	2DKK, 2NZA, 2NZ5	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Flaviolin-Kopplung
CYP158A2	1S1F, 1T93, 1SE6, 2D0E, 2D09	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Flaviolin-Kopplung
CYP164A2	3R9B, 3R9C	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Unbekannt
CYP165B3 (P450 oxyB)	1LGF, 1LG9, 1LFK	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Vancomycin-Biosynthese
CYP165C4 (P450 oxyC)	1UED	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Vancomycin-Biosynthese
CYP165D3 (P450 oxyE)	3O1A, 3O03	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Teicoplanin-Biosynthese
CYP167A1 (P450epoK)	1Q5D, 1Q5E	<i>Sorangium cellulosum</i>	Epothilon C/A
CYP170A1	3DBG	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Albaflavinon
CYP175A1	1N97	<i>Thermus thermophilus</i>	Unbekannt
CYP176 (P450cin)	1T2B, 3BDZ, 3BEO, 4FB2, 4FMX, 4FYZ, 4G3R	<i>Citrobakter braakii</i>	1,8-Cineol
CYP199A2	2FR7	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	para-substituierte Benzoesäure
CYP199A4	4DNJ, 4DNZ, 4DO1	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	para-substituierte Benzoesäure
CYP231A2	2RFB, 2RFC	<i>Picrophilus torridus</i>	Unbekannt
CYP245A1 (P450 StaP)	2Z3T, 2Z3U, 3A1L	<i>Streptomyces spec.</i>	Chromopyrrolsäure
P450 oxyD	3MGX	<i>Amycolatopsis balhimycina</i>	Vancomycin-typ-Biosynthese
XplA	2WIV, 2WIY	<i>Rhodococcus spec.</i>	Abbau von RDX
P450 Vdh	3A4G, 3A4H, 3A4Z, 3A50, 3A51	<i>Pseudonocardia autotrophica</i>	Vitamin D <sub>3</sub>
P450 PimD	2XBK, 2X9P	<i>Streptomyces natalensis</i>	Pimaricin-Epoxidase
P450 MycG	2Y46, 2Y5N, 2Y5Z, 2Y98, 2YGX, 2YCA, 3ZSN, 4AW3	<i>Micromonospora griseorubida</i>	Mycinamicin II-Biosynthese
P450 CalO2	3BUJ	<i>Micromonospora echinospora</i>	Rolle bei der Calicheamicin-Biosynthese
Thermophiles P450	1UE8	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	Unbekannt



**Abbildung 4.2:** Kladogramm der kristallisierten bakteriellen P450 Enzyme. Die Abbildung wurde mit dem ClustalW2 – Phylogeny Tool erstellt (Larkin *et al.* 2007, Goujon *et al.* 2010). Die Aminosäuresequenzen von CYP105A1 und CYP106A2 sind im Anhang (6.2) aufgeführt.

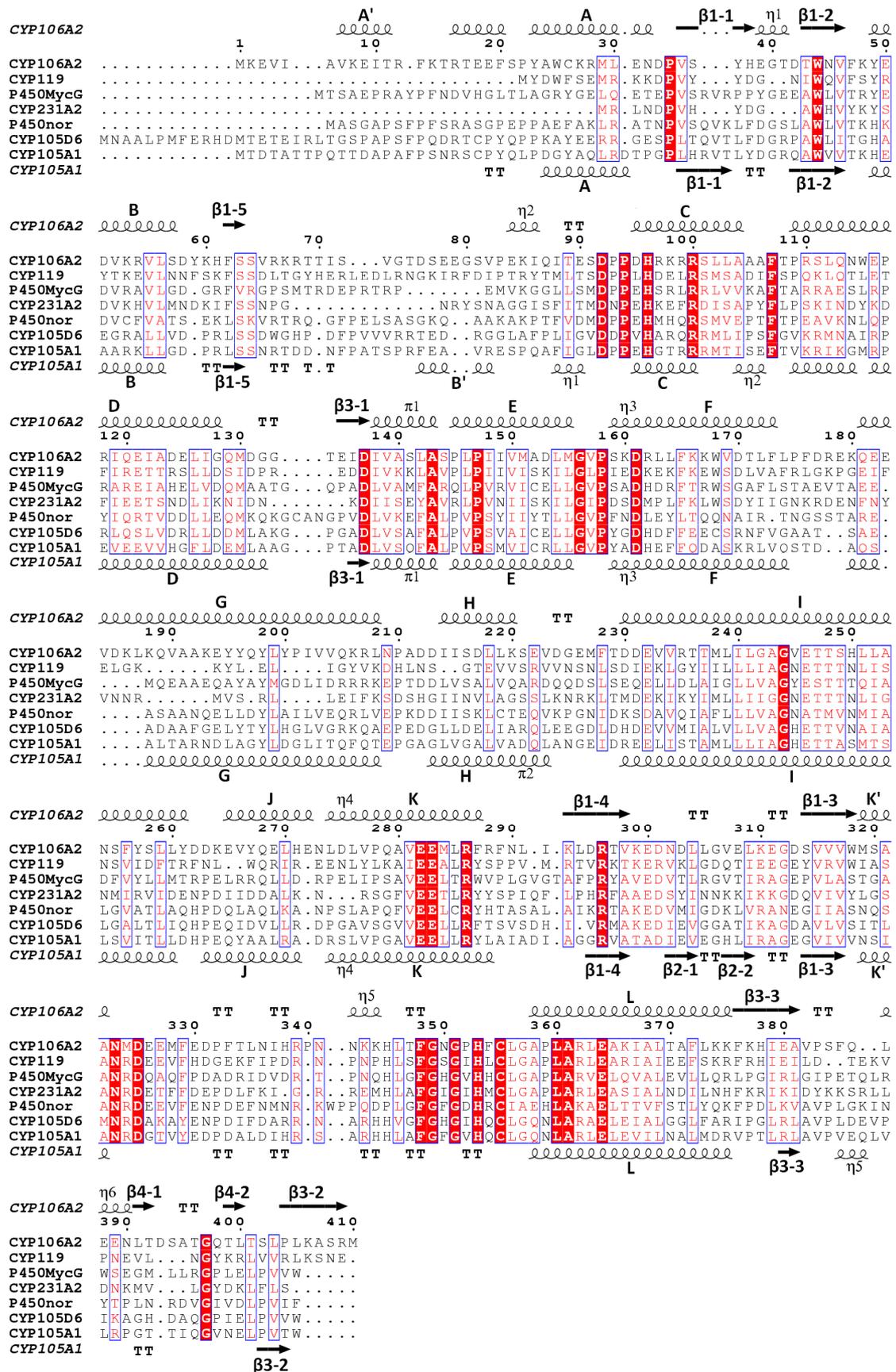
Über die Sequenzhomologie hinaus liegt bei der Superfamilie der Cytochrome P450 außerdem ein besonders hoher Konservierungsgrad der Tertiärstruktur vor. Um ein vollständigeres Bild über die Ähnlichkeiten von CYP105A1 und CYP106A2 mit den bis dato kristallisierten prokaryotischen P450s zu erhalten, wurde deshalb neben der Sequenzidentität auch die dreidimensionale Faltung der Enzyme verglichen. Tabelle 4.2 gibt eine Übersicht der P450s mit der größten Übereinstimmung in Bezug auf Sequenz und Struktur. Der Vergleich der Sequenzen erfolgte mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), der strukturelle Abgleich wurde mit PDBeFold durchgeführt (Krissinel und Henrick 2004). Der in der Tabelle angegebene Q-score ist ein

Maß für die Qualität des Alignments und berücksichtigt sowohl die Länge der alignierten Sequenz als auch die RMSD. Die höchste strukturelle Homologie mit dem CYP106A2 weist das P450 MycG mit einem Q-score von 0,57 auf. Das CYP119, dessen Struktur für den molekularen Ersatz verwendet wurde, weist trotz einer geringfügig höheren Sequenzidentität von 36 % im Vergleich zu 35 % für das MycG einen niedrigeren Q-score von 0,50 zu CYP106A2 auf. Hierbei spielen die im Vergleich zu anderen P450 mit 368 Aminosäuren deutlich verkürzte Länge der Polypeptidkette des thermophilen Cytochroms und die dadurch zwangsweise verringerte Länge des Alignments jedoch eine große Rolle. Die physiologische Funktion des CYP119 ist bislang noch nicht geklärt. Das P450 MycG ist Teil des Mycinamycin-Biosyntheseweges von *Micromonospora griseorubida* und katalysiert die Hydroxylierung und Epoxidierung von Mycinamycin IV, einem Makrolidantibiotikum (Anzai *et al.* 2008). Eine analoge Funktion des CYP106A2 ist unwahrscheinlich, da *B. megaterium* über keinen entsprechenden Biosyntheseweg verfügt.

**Tabelle 4.2:** Paarweiser Vergleich der strukturellen Ähnlichkeiten und der Sequenzidentität ausgewählter Cytochrome P450. Die hellgrau hinterlegten Felder zeigen die mit BLAST ermittelte Sequenzidentität in Prozent. Die Werte in Klammern geben die prozentuale Abdeckung des Alignments an. Die weiß hinterlegten Felder geben den Q-Wert als Maß für die Übereinstimmung der dreidimensionalen Faltung an.  $Q = N_{\text{align}} * N_{\text{align}} / (1 + (\text{RMSD}/R_0)^2) * N_{\text{res1}} * N_{\text{res2}}$  mit  $N_{\text{res1}}$  und  $N_{\text{res2}}$  als Anzahl der alignierten Reste in den entsprechenden Sequenzen,  $R_0 = 3 \text{ \AA}$  und  $N_{\text{align}} = \text{Länge des Alignments}$ .

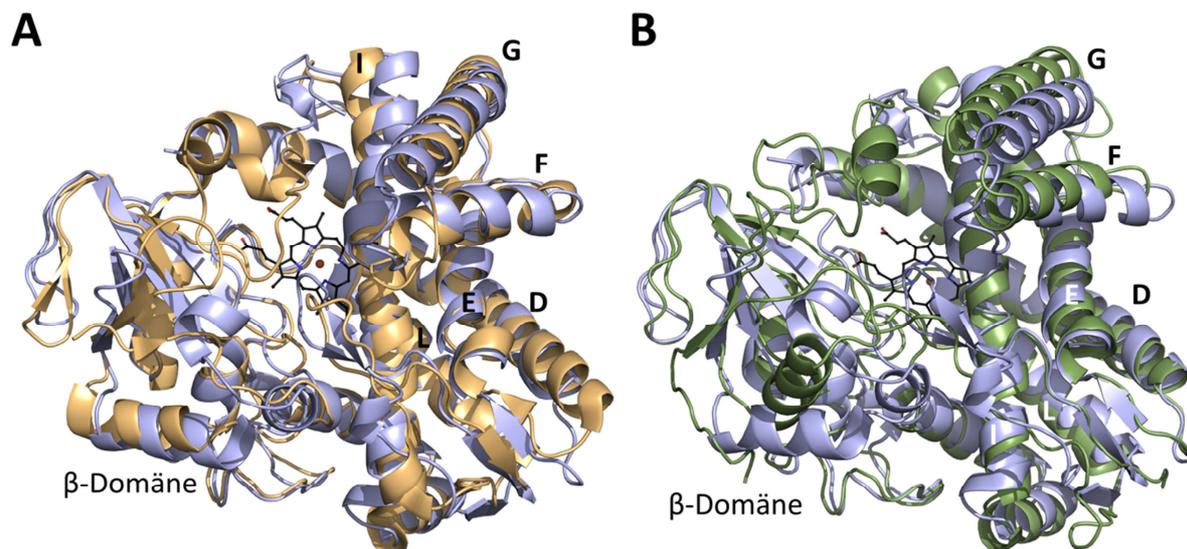
CYP	106A2	119	MycG	231A2	Nor	105D6	105A1
<b>106A2</b>	-	0,50	<b>0,57</b>	0,50	0,44	0,50	0,43
<b>119</b>	<b>36 (87)</b>	-	0,44	0,63	0,49	0,51	0,50
<b>MycG</b>	35 (87)	31 (92)	-	0,54	0,49	0,58	0,53
<b>231A2</b>	32 (85)	36 (96)	25 (86)	-	0,50	0,54	0,50
<b>Nor</b>	29 (90)	27 (92)	32 (100)	28 (93)	-	0,55	<b>0,69</b>
<b>105D6</b>	28 (85)	28 (74)	37 (94)	28 (91)	37 (99)	-	0,65
<b>105A1</b>	30 (90)	27 (91)	38 (98)	27 (94)	37 (97)	<b>48 (100)</b>	-

In Abbildung 4.3 ist ein strukturbasiertes Sequenzalignment zwischen den Cytochromen P450 aus Tabelle 4.2 dargestellt. Es lassen sich deutlich die konservierten Bereiche wie zum Beispiel das ExxR Motiv in der K-Helix oder die Häm-Bindetasche um das Cystein erkennen. Die größten Unterschiede zwischen den Proteinen sowohl in Bezug auf die Primärstruktur als auch bezüglich Insertionen und Deletionen bestehen am N-terminalen Ende (Aminosäuren 1-22) und in den für die Substraterkennung wichtigen Regionen im BC-Loop inklusive der Helix B' (Aminosäuren 65-85).



**Abbildung 4.3:** Alignment ausgewählter Cytochrom P450 Sequenzen. Der Vergleich der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Clustal Omega (Goujon *et al.* 2010, Sievers *et al.* 2011). Die Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Rechenprogramm DSSP ermittelt (Kabsch und Sander 1983, Joosten *et al.* 2011) und die Abbildung wurde mit dem Programm ESPript (Gouet *et al.* 1999) erstellt. Identische Aminosäuren im Alignment sind rot hinterlegt, Aminosäuren mit homologen Eigenschaften sind rot gedruckt.

Abbildung 4.4 A zeigt eine Übereinanderlagerung der Strukturen von CYP106A2 und P450 MycG. Besonders in dem Bereich um den strukturellen Kern mit den Helices D, E, I und L lässt sich der hohe Konservierungsgrad der P450-Tertiärstruktur gut erkennen. Die größten Abweichungen zwischen den beiden Strukturen sind am N-Terminus sowie zwischen den Helices B und C zu finden. Zum Vergleich zeigt Abbildungsteil 4.4 B die Übereinanderlagerung der Kristallstruktur des CYP106A2 mit dem Homologie-Modell des Enzyms (Lisurek *et al.* 2008). Auch hier ist die Übereinstimmung um das Vierer-Helixbündel D, E, I und L am Besten. Eine deutlich niedrigere Homologie lässt sich bei den flexiblen und an der Substraterkennung beteiligten Helices F und G ausmachen. Die schlechteste Übereinstimmung weist das Modell in der  $\beta$ -Domäne des Enzyms auf, deren Übereinanderlagerung mit der Struktur bis auf wenige Bereiche ( $K'$ -Helix,  $\beta$ -Stränge 1-3 und 1-4) insgesamt sehr ungeordnet erscheint. Dies ist auch der Grund dafür, dass die Versuche das Homologie-Modell als Vorlage für die Lösung des Phasenproblems über molekularen Ersatz zu verwenden, nicht erfolgreich waren.



**Abbildung 4.4:** Übereinanderlagerung von CYP106A2 (blau) mit A) P450 MycG (orange) und B) dem Homologie-Modell des CYP106A2 (grün). Die  $\alpha$ -Helices des strukturellen Kerns sowie die Helices F und G sind gekennzeichnet.

#### 4.2.2 Flexible Regionen des CYP106A2 und ihre Bedeutung

Aufgrund fehlender Elektronendichte war bei der Auswertung und Verfeinerung des Datensatzes die Modellierung einiger Aminosäuren des CYP106A2 nicht möglich. Analog zu vielen weiteren P450-Strukturen, wie unter anderem P450cam (Poulos *et al.* 1985), P450eryF (Cupp-Vickery und Poulos 1995) oder dem ebenfalls in vorliegender Arbeit untersuchten CYP105A1, weist die Struktur beispielsweise einen schlecht definierten N-Terminus auf. Auch der flexible Bereich zwischen den Helices F und G sowie der Bereich des BC-Loops zwischen den Aminosäuren Arg66 und Ser81 konnte wegen fehlender Elektronendichte bei den substratfreien Molekülen nicht modelliert werden. Der Grund hierfür ist, dass es sich bei diesen Bereichen um sehr flexible Regionen von Cytochromen P450

handelt, die gemäß des *induced fit* Modells eine Konformationsänderung durch Bindung des Substrates erfahren (Li und Poulos 2004). Dabei bildet die BC-Loop-Region einen Deckel über dem aktiven Zentrum und hilft bei der Positionierung des Substrats über dem Häm. Durch den Übergang des Enzyms in eine geschlossene Konformation ist das aktive Zentrum außerdem nicht mehr zugänglich für Lösemittel.

Das Redoxpotential des Häm-Eisens ist abhängig vom Solvatations-Zustand der Bindestelle und steigt im Fall des P450cam nach Substratbindung von -300 mV auf -170 mV. Hierdurch wird die Aufwendung von Reduktionsäquivalenten für ein unbesetztes P450 und die Bildung von Wasserstoffperoxid und Wasser an Stelle von oxygeniertem Produkt verhindert (Hasemann *et al.* 1995). Durch die substratinduzierten Konformationsänderungen werden außerdem katalytisch wichtige Wassermoleküle repositioniert, was wie ein molekularer Schalter wirkt, durch den das Enzym von einer inaktiven Form in eine katalytisch wirksame Form übergeht (Haines *et al.* 2001). Davon abgesehen kann vor allem für P450s mit breitem Substratspektrum durch die unterschiedlichen Konformationen der flexiblen Regionen eine Voraussetzung für die Anpassung an Größe, Form und Polarität des jeweiligen Substrats geschaffen werden (Li und Poulos 2004). Dementsprechend wurden auch bei einer Reihe anderer P450-Strukturen in diesen Bereichen entweder schlecht bis gar nicht definierte Elektronendichte oder hohe Temperaturfaktoren beschrieben. So ließ sich beispielsweise bei der Kristallstruktur des OxyB ebenfalls der Bereich zwischen den Aminosäuren 65 und 83 nicht darstellen (Zerbe *et al.* 2002).

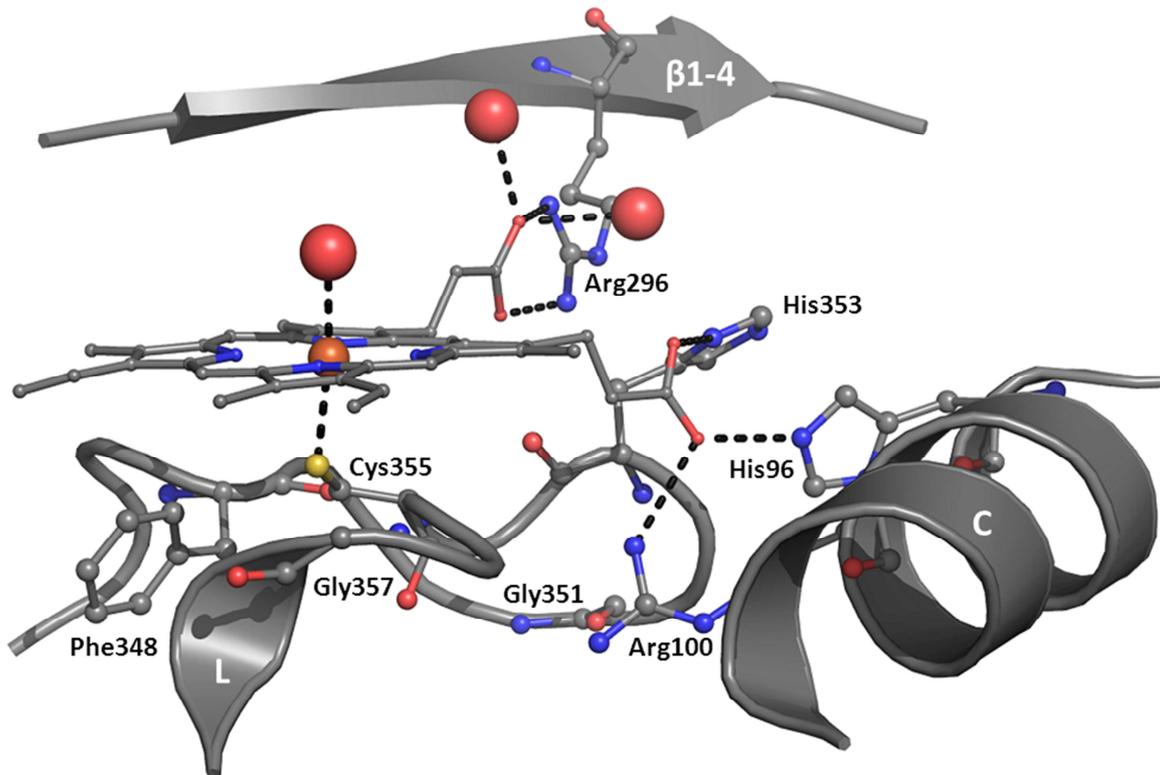
#### 4.2.3 Konservierte Struktur motive und struktureller Kern

Eine Übersicht der wichtigsten konservierten Struktur motive von Cytochromen P450 ist in Tabelle 4.3 gegeben. Die in der Diskussion angegebenen Aminosäurepositionen beziehen sich auf die Sequenz des CYP106A2.

**Tabelle 4.3:** Übersicht der konservierten Motive von Cytochromen P450 und ihr Vorkommen im CYP106A2.

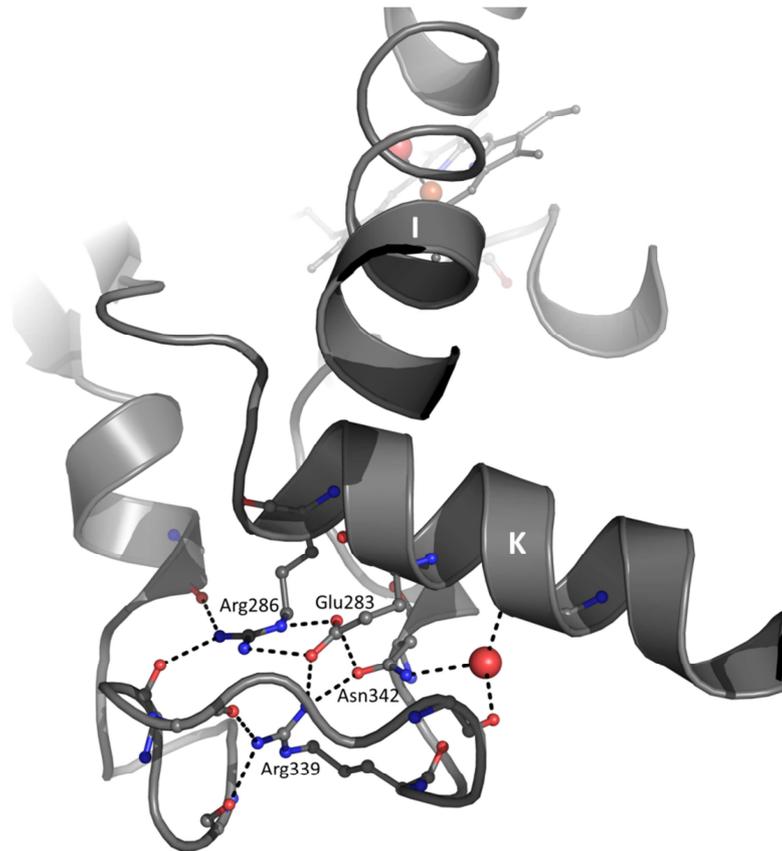
Konserviertes Motiv	Sequenz CYP106A2	Position CYP106A2	Lokalisation und Funktion
(W/H)xxx(H/R)	HRKRR	96-100	C-Helix, Koordination der Propionat-Seitenketten des Häm-Kofaktors
(A/G)Gx(E/D)T	AGVET	243-247	I-Helix, Ausbildung der <i>kink</i> -Struktur mit katalytischer Funktion
ExxR	EMLR	283-286	K-Helix, Stabilisierung der Mäander-Region
H/R	R	296	β-Strang 1-4, Interaktion mit dem Häm-Kofaktor
R	R	339	Mäander-Region, Stabilisierung
FxxGx(H/R)xCxG	FGNGPHFCLG	348-357	Cystein-Tasche, Bindung des Häm-Kofaktors

Das zentrale Alleinstellungsmerkmal der Cytochrome P450 ist der absolut konservierte Cysteinrest, welcher den axialen Liganden für den Häm-Kofaktor darstellt (siehe Abbildung 4.5). Generell weisen alle P450s in der benachbarten Region sowohl strukturell als auch von ihrer Aminosäuresequenz den höchsten Konservierungsgrad auf (Hasemann *et al.* 1995). Die Konsensussequenz dieser sogenannten Cystein-Tasche lautet FxxGx(H/R)xCxG. Das Phenylalanin 348 liegt dabei nahe an der Eisen-Schwefel-Bindung und Mutationen an dieser Position im P450cam deuten auf einen Einfluss bei der Übertragung von Elektronen hin (Yasukochi *et al.* 1994). Insgesamt enthält die Häm-Bindetasche hauptsächlich hydrophobe Seitenketten und das Redoxpotential des Häm-Eisens hängt direkt von der Hydrophobizität der unmittelbaren Umgebung ab (Kassner 1973). Der Glycinrest 351 ist wichtig für die Ausbildung einer  $\beta$ -Haarnadel-Struktur, während das Glycin an Position 357 eine scharfe Biegung des Rückgrats in unmittelbarer Nähe des Häms erlaubt, welche den Übergang in die L-Helix darstellt. Das Histidin 353 tritt in Wechselwirkung mit der Propionat-Seitenkette am Pyrrolring D des Häms. Die Koordination der Propionat-Seitenketten erfordert polare und/oder geladene Seitenketten, welche die Polarität und negative Ladung der Carbonsäurefunktion auffangen können. Die C-Helix enthält das konservierte Motiv (W/H)xxx(H/R) mit den basischen Aminosäuren His96 und Arg100, die neben dem His353 mit der Propionat-Seitenkette vom Pyrrolring D interagieren. Die Koordination der Propionat-Seitenkette am Pyrrolring A erfolgt in zweizähliger Weise über die Guanidingruppe der Seitenkette des Arginin 296. Diese Aminosäure ist Teil der  $\beta$ 1-Faltblattstruktur. Darüber hinaus existieren noch weitere Wasserstoffbrückenbindungen zu koordinierten Wassermolekülen. So wird beispielsweise über ein Wassermolekül eine Bindung zur Seitenkette des Serin 64 im BC-Loop ausgebildet.



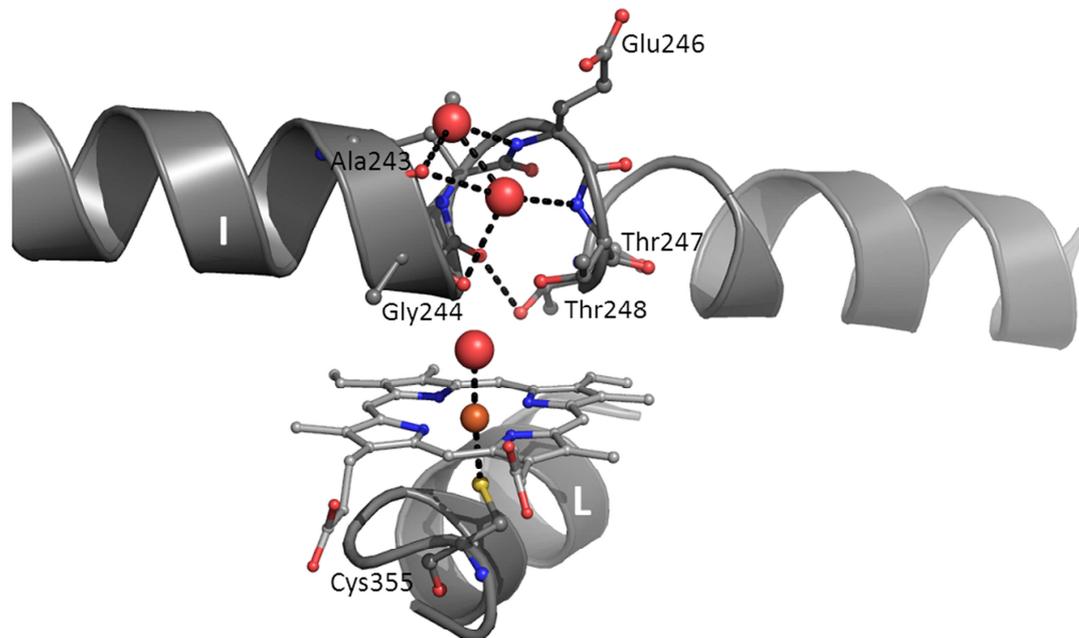
**Abbildung 4.5:** Einbau des Häm-Kofaktors im CYP106A2. Das Häm-Molekül wird über den Cysteinrest 355 gebunden. Konservierte basische Aminosäuren sorgen für eine Neutralisierung der negativen Ladungen der Propionat-Seitenketten. Arginin 296 koordiniert die Propionat-Gruppe des Pyrrolrings A auf eine zweizählige Art. Die Propionat-Gruppe des D-Rings tritt mit den Histidinen 96 und 353 sowie Arginin 100 in Wechselwirkung. Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt.

Ein weiteres hochkonserviertes Motiv bei Cytochromen P450 befindet sich in der K-Helix. Es handelt sich dabei um die Sequenz ExxR. Zusammen mit einem weiteren Argininrest, welcher in manchen Sequenzen allerdings durch ein Histidin oder Asparagin substituiert ist, bilden diese Aminosäuren die sogenannte ERR-Triade (Hasemann *et al.* 1995). Durch mehrere Salzbrückenbindungen der terminalen Arginin-Stickstoffatome mit Carbonyl-Sauerstoffatomen verschiedener Seitenketten wird auf diese Weise die „Mäander“ genannte Region in der Nähe der Cystein-Bindetasche stabilisiert. In Folge dieser Wechselwirkungen ergibt sich eine konservierte dreidimensionale Struktur in diesem ansonsten an Sekundärstrukturen armen Bereich (Hasemann *et al.* 1995). Beim CYP106A2 wird die ERR-Triade durch das Glutamat 283 und Arginin 286 in der K-Helix sowie den Argininrest 339 gebildet. Darüber hinaus scheint beim CYP106A2 auch der Asparaginrest 342 an der Stabilisierung der Mäander-Region beteiligt zu sein. Eine Übersicht dieser Proteinregion ist in Abbildung 4.6 gezeigt.



**Abbildung 4.6:** Darstellung der Mäander-Region von CYP106A2. Die Seitenketten der Aminosäuren, die miteinander interagieren und die Region stabilisieren („ERR-Triade“), sind als Kugel-Stab-Modell dargestellt und beschriftet. Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt.

Ein charakteristisches Merkmal aller P450s ist die lange I-Helix, die nahezu das gesamte Enzym durchspannt. Sie bildet eine Begrenzung der Substratbindetasche und enthält das Aminosäure-Motiv (A/G)Gx(E/D)T. Diese Aminosäuren führen in fast allen bekannten Cytochromen P450 dazu, dass die I-Helix nicht vollständig gerade ist, sondern einen „Knick“, den sogenannten *kink*, ausbildet. Der Grund hierfür liegt in der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenkette des konservierten Threoninrestes und dem *i-4* Alanin- oder Glycinrest. Dies führt zu einer Unterbrechung der Wasserstoffbrückenbindungen im Rückgrat der Helix und infolgedessen zu einer Weitung der Helix. Hierin binden Lösemittelmoleküle, die ersatzweise für die weggefallenen Bindungen der Sekundärstruktur über Wasserstoffbrückenbindungen koordiniert sind (siehe Abbildung 4.7). Diese geordneten Wassermoleküle spielen als potentielle Protonenlieferanten für die Übergangszustände des gebundenen Sauerstoffs eine wichtige Rolle beim Katalysemechanismus der Cytochrome P450 (Hasemann *et al.* 1995). Beim CYP106A2 besteht das Motiv aus Ala243 und Gly244, Glu246 sowie Thr247, wobei der Knick zwischen Ala243 und Thr247 gebildet wird. Als Besonderheit in der Struktur des CYP106A2 liegt hier ein erweiterter *kink* vor, denn die Seitenkette des Thr248 bildet ebenfalls eine Bindung zum Rest *i-4*, in diesem Fall dem Gly244, aus. Dieser erweiterte *kink* kommt beispielsweise auch in den Strukturen von CYP105P1 (PDB-Eintrag 3ABA) und CYP199A4 (PDB-Eintrag 4EGP) vor.



**Abbildung 4.7:** Detaillierte Übersicht der *kink*-Region in der I-Helix des CYP106A2. Die konservierten Reste des (A/G)Gx(E/D)T-Motivs sind als Kugel-Stab-Modell dargestellt. Die erweiterte Furche in der Helix-Struktur erlaubt die Koordination zweier Wassermoleküle in unmittelbarer Nähe des Häm-Kofaktors. Die Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt.

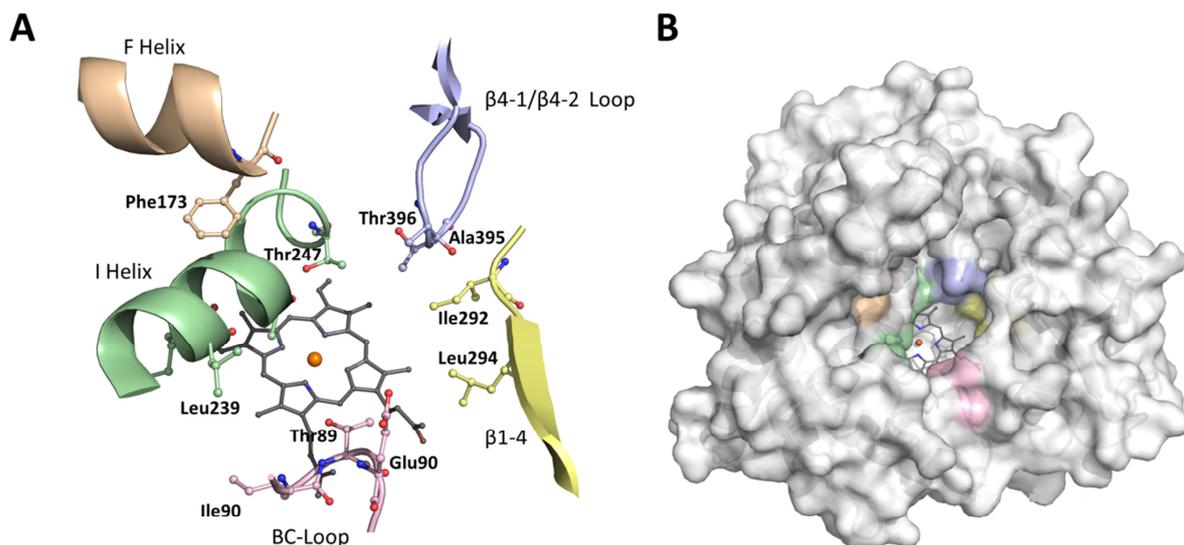
#### 4.2.4 Substraterkennungsstellen

Insgesamt weist das CYP106A2 alle für Cytochrome P450 typischen konservierten Strukturmerkmale auf. Grundlage für das angesichts der konservierten Faltung und 3D-Struktur dieser Enzymfamilie erstaunlich breite Substratspektrum ist eine hohe Varianz in bestimmten Regionen der Proteine. Diese variablen Regionen werden dementsprechend *substrate recognition sites* (SRS, Substraterkennungsstellen) genannt und wurden erstmals von Gotoh beschrieben (Gotoh 1992). Die sechs SRS bilden die Begrenzung des aktiven Zentrums. Beim CYP106A2 erfolgt die Bindung des Substrats hauptsächlich über nicht-konservierte hydrophobe Aminosäuren sowie einzelne Seitenketten, die Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Interaktionen ausbilden. Tabelle 4.4 gibt eine Übersicht der Aminosäuren, die die Substratbindetasche des CYP106A2 auskleiden, sowie ihre Zuordnung zu den entsprechenden SRS. Ein Alignment des CYP106A2 mit den ursprünglich von Gotoh zur Vorhersage der SRS herangezogenen P450-Sequenzen ist im Anhang (6.4) zu finden.

**Tabelle 4.4:** Übersicht über die Aminosäuren, die das aktive Zentrum von CYP106A2 auskleiden sowie ihre Zugehörigkeit zu den Sekundärstrukturelementen und Substrat-Erkennungstellen (SRS).

Aminosäuren	Lokalisation	SRS
I71, V73	B-C Loop	1
I88, T89, E90	B-C Loop	1
F173	F-Helix	2
L239, I240, A243, T247	I-Helix	4
I292, L294	$\beta$ 1-4	5
A395, T396	$\beta$ 4-1/ $\beta$ 4-2 Loop	6

Das aktive Zentrum von CYP106A2 ist in Abbildung 4.8 gezeigt. Zu beachten ist hierbei, dass bei der substratfreien Struktur der Bereich zwischen Arg66 und Ser81 nicht aufgeklärt werden konnte, da es sich bei diesen Aminosäuren als Teil des BC-Loops um eine sehr flexible Proteinregion handelt, die in der offenen Enzymform verschiedene Konformationen annehmen kann.

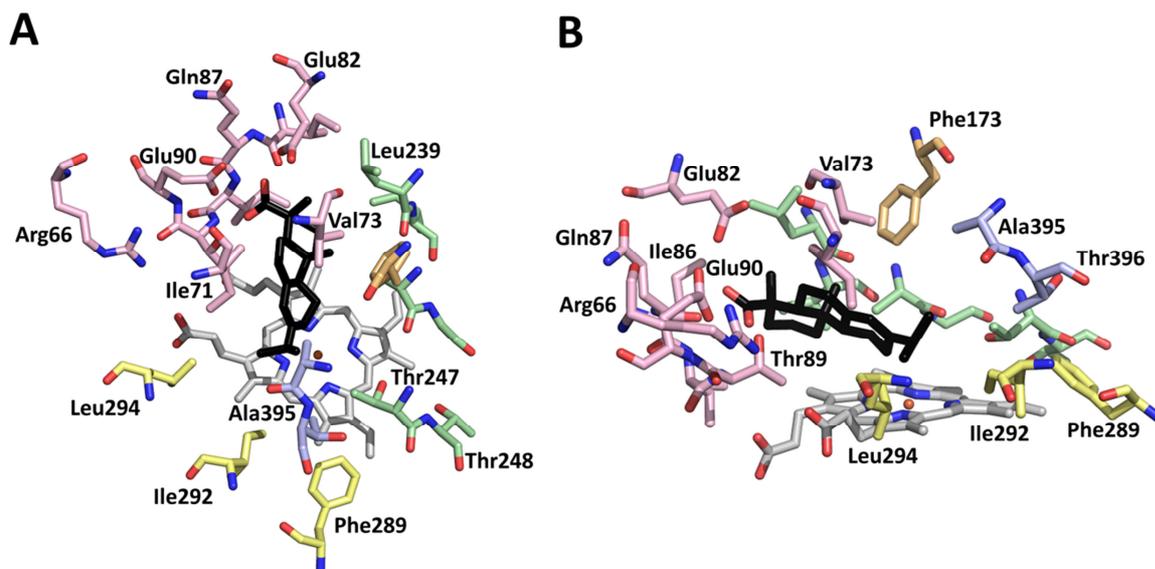


**Abbildung 4.8:** Übersicht über die Aminosäuren, die die Substratbindetasche von CYP106A2 auskleiden. A) Darstellung der Seitenketten als Kugel-Stab-Modell mit ihren zugehörigen Sekundärstrukturelementen. Die Farbcodierung entspricht der Zuordnung zu verschiedenen *substrate recognition sites*. Rosa: SRS 1, orange: SRS 2, grün: SRS 4, gelb: SRS 5, blau: SRS 6. B) Darstellung des Moleküls mit eingefärbter Substratbindetasche als Oberflächenmodell. Die Farbcodierung der SRS entspricht Abbildungsteil A.

#### 4.2.5 Substratgebundene Form des CYP106A2

Durch Ko-Kristallisation des CYP106A2 mit Abietinsäure und Analyse mehrerer Kristalle gelang es letztendlich, einen Datensatz zu gewinnen, bei dem eine gut definierte Elektronendichte über dem Häm-Kofaktor auf ein gebundenes Substratmolekül schließen ließ. Dabei erscheint ein Einfluss des als Additiv eingesetzten Calciumchlorids durchaus möglich: Obwohl in den bekannten P450-Strukturen keine Kationen sichtbar sind, wurde ein stabilisierender Effekt von  $Mg^{2+}$  und anderen divalenten Metallkationen auf das Kristallgitter beschrieben, vermutlich in Folge der Neutralisation geladener Aminosäure an der Proteinoberfläche (Li und Poulos 2004).

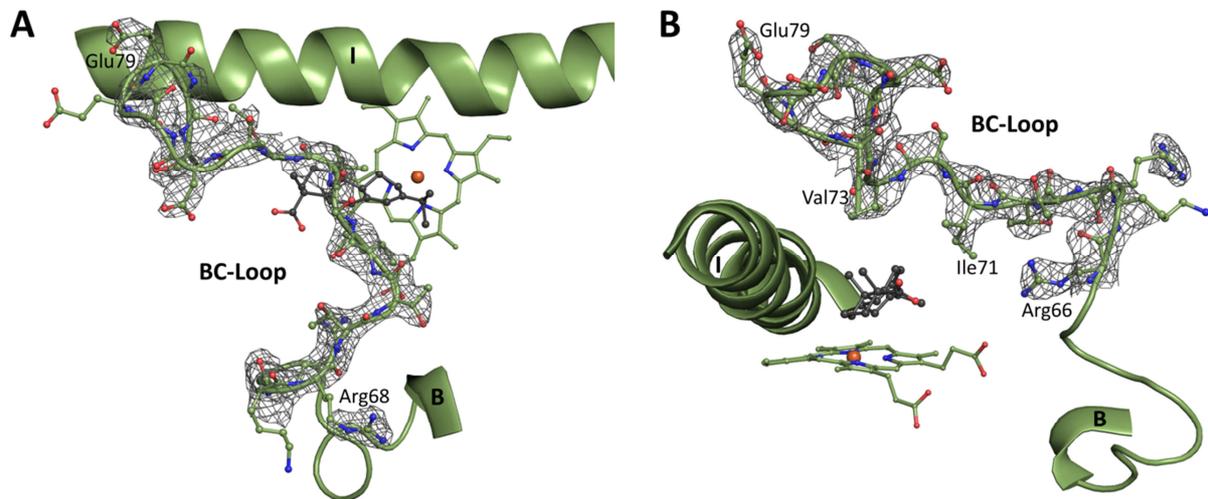
Insgesamt weist der Datensatz eine geringere Auflösung und Vollständigkeit sowie höhere B-Faktoren auf als der zuvor untersuchte. Wie bei der substratfreien Struktur befanden sich auch hier zwei CYP106A2 Moleküle in der Elementarzelle, wobei das Substrat nur in einem der beiden gebunden hatte. Dabei ist die longitudinale Achse der Abietinsäure parallel zur Häm-Ebene orientiert, und das Molekül ist entlang der I-Helix ausgerichtet (siehe Abbildung 3.13). Die Carboxylfunktion liegt in unmittelbarer Reichweite des BC-Loops und zeigt in Richtung des Glu90. Die Sauerstoffatome des Substrats sind mit 2,4 Å und 3,0 Å in ausreichender Entfernung zu denen der Carboxylfunktion des Glutamates, um Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden zu können. Darüber hinaus tragen hauptsächlich hydrophobe Interaktionen zur Koordination der Abietinsäure im aktiven Zentrum bei. Die Isopropylgruppe des Substrats zeigt in Richtung des  $\beta$ 1-4-Strangs mit den Seitenketten Ile292 und Leu294. Das Phe173 aus der F-Helix sowie die Aminosäuren Ile71 und Val73 des BC-Loops schließen den Substrateintrittskanal über der Abietinsäure. Einen detaillierten Überblick über diese Interaktionen gibt Abbildung 4.9.



**Abbildung 4.9:** Orientierung der Abietinsäure im aktiven Zentrum des CYP106A2. Das Substratmolekül (schwarz) und die Aminosäuren der SRS sind als Stabmodell dargestellt. Die Farbcodierung entspricht Abbildung 4.8. A) Aufsicht auf das aktive Zentrum. B) Seitenansicht in Richtung der I-Helix.

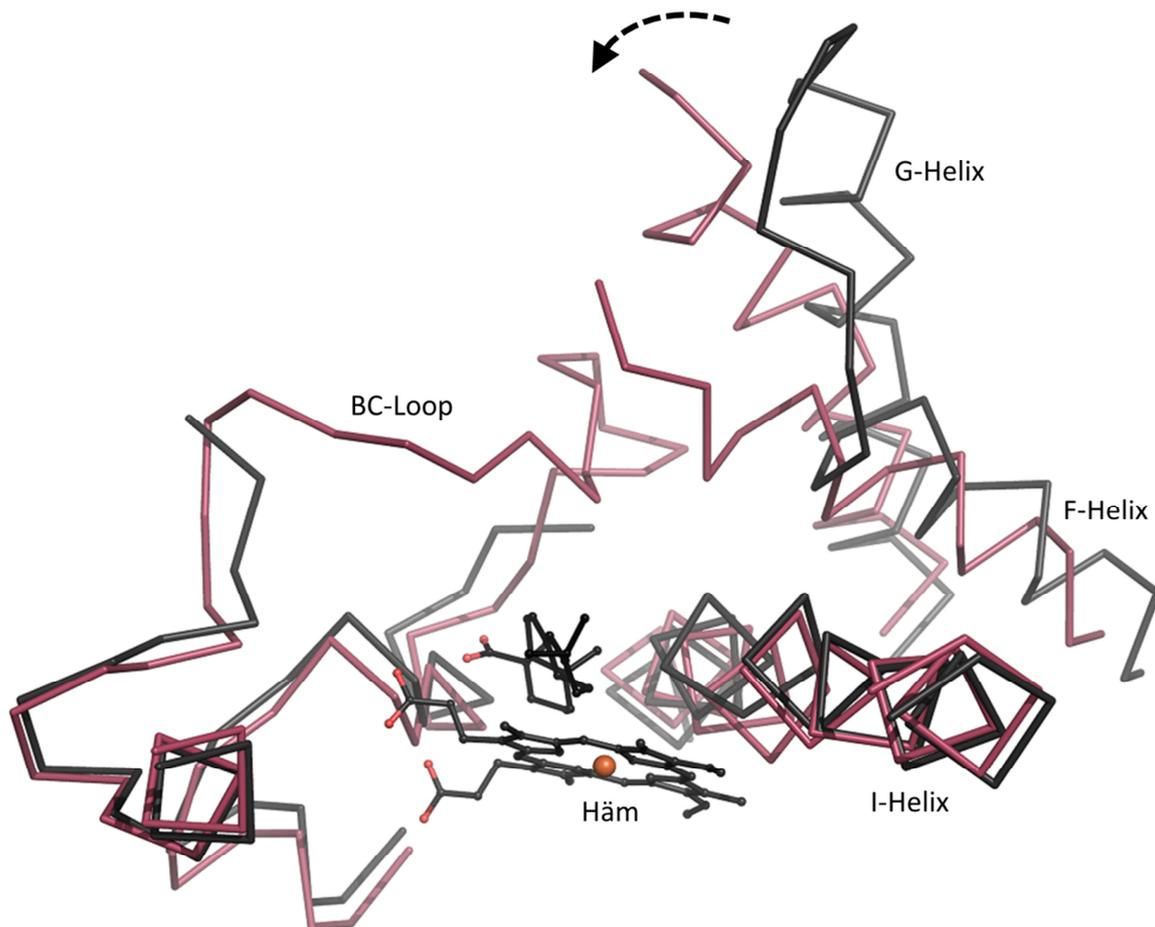
Das substratfreie Molekül A zeigte bis auf die der niedrigeren Qualität des Datensatzes geschuldeten Unterschiede keine nennenswerten Abweichungen zu der höher aufgelösten Struktur. Im Gegensatz dazu konnten im substratgebundenen Molekül B an mehreren Stellen Abweichungen festgestellt werden. Die prominentesten Unterschiede traten hierbei in der Region des BC-Loops auf. Trotz schlechterer Definition der Elektronendichte im Vergleich zu anderen Bereichen des Moleküls war im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Datensätzen die Modellierung der Aminosäuren zwischen Position 66 und 81 möglich. Eine Übersicht des Verlaufs des BC-Loops mit der Elektronendichte zeigt

Abbildung 4.10. Dabei sind die Seitenketten der Aminosäuren Ile71 und Val73 in Richtung des Substrats ausgerichtet und bilden eine hydrophobe Zange, welche die Abietinsäure in ihrer Position stabilisiert. Im Gegenzug wird durch den gebundenen Liganden die gesamte Proteinregion stabilisiert, was sich in der besseren Definition dieses Bereichs in der substratgebundenen Form zeigt.



**Abbildung 4.10:** BC-Loop des CYP106A2 in der substratgebundenen Form. Die Elektronendichte-Karte um die Aminosäuren 66-81 ist mit  $1,0 \sigma$  konturiert. A) Blickrichtung auf das aktive Zentrum von der distalen Seite B) Blickrichtung auf das aktive Zentrum von der Seite, entlang der I-Helix.

Erwartungsgemäß zeigt die Struktur in der Region um die Helices F und G sowie den von diesen eingeschlossenen FG-Loop ebenfalls Unterschiede zu der substratfreien Struktur. Allerdings war durch die schlecht definierte Elektronendichte die Modellierung des FG-Loops zwischen Aminosäureposition 176 und 181 nicht möglich. Aus dem gleichen Grund wurde der N-terminale Teil der G-Helix zwischen den Aminosäuren 181 und 192 lediglich als Poly-Alanin-Rückgrat modelliert. Dennoch ist beim Vergleich mit der substratfreien Struktur eine deutliche Repositionierung des gesamten Bereiches erkennbar. Wie Abbildung 4.11 zeigt, klappt dieser Teil des Enzyms über die geschlossene Substratbindetasche und trägt damit zur Stabilisierung des BC-Loops bei. Eine Übereinanderlagerung der substratfreien und -gebundenen Struktur ergab eine RMSD von  $0,989 \text{ \AA}$ . Während die beiden Strukturen über die meisten Bereiche deckungsgleich sind, verdeutlicht der Abstand von  $8,6 \text{ \AA}$  der  $C_{\alpha}$ -Atome des C-terminalen Prolin 175 der F-Helix die hohe Flexibilität speziell in dieser Proteinregion.

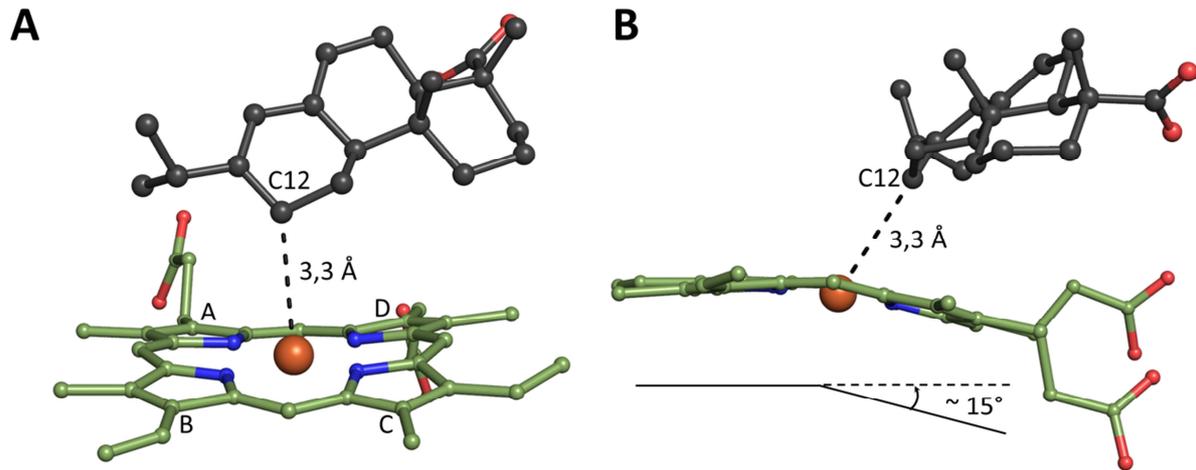


**Abbildung 4.11:** Ribbon-Darstellung der Übereinanderlagerung des BC-Loops und der Helices F und G von CYP106A2 in der substratgebundenen (rot) und der substratfreien (schwarz) Form. Zur besseren Anschaulichkeit sind ebenfalls der Häm-Kofaktor und die I-Helix dargestellt.

Abbildung 4.12 zeigt den Häm-Kofaktor mit gebundenem Substrat. Die Hydroxylierungsposition am C12 der Abietinsäure befindet sich in einer Entfernung von 3,3 Å zum zentralen Eisenatom des Häms. Dieser Abstand ist für ein Substrat verhältnismäßig klein. Vergleichbar geringe Entfernungen konnten beispielsweise für das P450cam mit den Substraten Pentachlorbenzen (3,32 Å, PDB-Eintrag 2GQX), Pinen (3,39 Å, PDB-Eintrag 1MPW) und Thiocampher (3,57 Å, PDB-Eintrag 8CPP) beobachtet werden. Diese Moleküle sind jedoch allesamt deutlich kleiner als die tricyclische Abietinsäure. Größere Moleküle, die in solch geringem Abstand binden, wie beispielsweise die Phytansäure am CYP124 (3,87 Å, PDB-Eintrag 2WM4) oder das Vitamin D<sub>3</sub> am P450 Vdh (3,21 Å, PDB-Eintrag 3A50), sind zumeist so orientiert, dass das langgestreckte Molekül die Substratbindetasche ausfüllt und die Hydroxylierung an terminalen Kohlenstoffatomen auftritt. Ähnlich verhält es sich bei der Orientierung der Anissäure (3,91 Å, PDB-Eintrag 4DNJ) und 4-Ethylbenzoesäure (3,47 Å, PDB-Eintrag 4EGM) bei P450s der 199A-Familie. Eine weitere Ursache für einen geringen Abstand zwischen zentralem Eisenatom und dem Substrat kann die Stapelung zweier Moleküle im aktiven Zentrum sein. Dies wurde zum Beispiel im Fall des Androstendions beim CYP113A1 (3,77 Å, PDB-Eintrag 1EUP), bei der Bindung des Naphthalen-Pentols im CYP158A1 (2,77 Å, PDB-Eintrag 2NZ5) und des 2-

Hydroxynaphtoquinons im CYP158A2 (3,75 Å PDB-Eintrag 2D0E) beobachtet. In den meisten Fällen kristallisierter P450-Substrat-Komplexe beträgt der Abstand der Hydroxylierungsposition zum zentralen Eisenatom jedoch etwa 4-5 Å. Im Unterschied dazu ist der Abstand zu Stickstoffatomen von Typ-II Liganden bei den meisten kristallisierten P450-Inhibitor-Komplexen im Mittel 2-3 Å (Poulos und Howard 1987, Montemiglio *et al.* 2010).

Auffallend ist außerdem die deutliche Krümmung des Häm-Kofaktors. Eine solche Torsion ist bereits bei vielen Häm-Proteinen beobachtet und beschrieben worden, wobei die Art der Verkrümmung bei verschiedenen Proteinklassen mit unterschiedlichen Funktionen voneinander abweicht (Hobbs und Shelnutz 1995, Jentzen *et al.* 1998). Es können im Wesentlichen fünf Grundarten der Porphyrin-Deformation unterschieden werden: *ruffled*, *saddled*, *waved*, *propelled* und *domed* (Ravikanth und Chandrashekar 1995). Durch Kombination dieser einfachen symmetrischen Deformationen können auch komplexere, nicht-planare Verkrümmungen entstehen (Song *et al.* 1996). Bei Cytochromen P450 existieren beispielsweise hauptsächlich Verkrümmungen der Form *ruffled* mit kleineren Beiträgen anderer Deformationstypen (Poulos *et al.* 1986, Hasemann *et al.* 1994, Li und Poulos 1995). Im Fall der substratgebundenen Form des CYP106A2 konnte ein Abknicken der Pyrrolringe A und D in proximale Richtung unter einem Winkel von etwa 15° beobachtet werden. Die Ursache hierfür sind wahrscheinlich hydrophobe Abstoßungseffekte durch die Abietinsäure, die durch den BC-Loop sehr dicht über den Porphyrinring gedrückt wird. Es existieren Studien, die mittels Dichtefunktionaltheorie den Einfluss geometrischer Deformationen des Porphyrinmoleküls auf den relativen Energiegehalt verschiedener Elektronenzustände des Häms analysieren. Im Rahmen dieser Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Deformationen bei einem für das aktive Zentrum von P450 benutzten Thiolat-ligiertem Eisen(III) Porphyrin Modell zu einem *spin*-Übergang vom *high spin* Sextett Zustand in den *low spin* Dublett Zustand führen (Groenhof 2007). Diese Untersuchungen belegen, dass ein Zusammenhang zwischen der im Rahmen der Kristallstrukturanalyse beobachteten substratinduzierten Verkrümmung des Häms und dem ungewöhnlichen *spin shift* Verhalten des CYP106A2 bei der Bindung von Abietinsäure durchaus denkbar ist.



**Abbildung 4.12:** Detailansicht der über dem Häm-Kofaktor gebundenen Abietinsäure. A) Die Entfernung des C12, an dem die Hydroxylierungsreaktion stattfindet, zum zentralen Eisenatom beträgt 3,3 Å. B) Im Unterschied zur substratfreien Form ist eine deutliche Krümmung des Häm zu erkennen. Die Pyrrolringe A und D, welche die Propionat-Seitenketten tragen, knicken in einem Winkel von etwa 15° zur horizontalen Häm-Ebene in proximale Richtung ab.

#### 4.2.6 Hinweis auf das natürliche Substrat

Obwohl das CYP106A2 bereits seit mehreren Jahrzehnten untersucht wird und inzwischen eine große Anzahl unterschiedlicher Substrate beschrieben wurde (siehe Tabelle 1.2), sind das natürliche Substrat sowie die genaue Funktion des Enzyms in *B. megaterium* nach wie vor unbekannt. Eine Möglichkeit, um Rückschlüsse auf die physiologische Bedeutung eines P450-Enzyms zu erhalten, beruht auf dem Vergleich mit strukturell ähnlichen Enzymen. Jedoch ist auch beispielsweise bei CYP119, dessen Strukturdaten für den molekularen Ersatz verwendet wurden, die natürliche Funktion nicht bekannt (Lim *et al.* 2010). Darüber hinaus bedeutet eine enge strukturelle Verwandtschaft nicht notwendigerweise eine ähnliche Funktion. Ein gutes Beispiel hierfür sind CYP105A1 und P450<sub>nor</sub>. Diese beiden Proteine zeigen eine ähnliche dreidimensionale Struktur und weisen über einen Bereich von 373 Aminosäuren einen sehr geringen RMSD-Wert von 1,51 Å auf. Während das CYP105A1 jedoch ein Xenobiotika-metabolisierendes P450 der Klasse I zu sein scheint (Janocha *et al.* 2013a), katalysiert das P450<sub>nor</sub> die Reduzierung von Stickstoffmonoxid zu Distickstoffmonoxid bei der anaeroben Atmung von *Fusarium oxysporum* (Shiro *et al.* 1995, Takaya *et al.* 1999). Dabei werden die benötigten Elektronen direkt vom Kofaktor NADH auf das Häm übertragen (Oshima *et al.* 2004), womit dieses P450 den einzigen bisher bekannten Vertreter einer eigenen Klasse darstellt (Hannemann *et al.* 2007).

Das Vorhandensein bestimmter struktureller Motive ermöglicht dennoch eine Aussage über potentielle Aktivitäten eines bestimmten Cytochroms P450. Ein Beispiel hierfür ist das hΦ-Pro Motiv, bei dem ein hydrophober Rest (hΦ = Phe, Ile, Val, Leu) einem Prolin unmittelbar vor der B'-Helix vorangeht (Pochapsky *et al.* 2010). Wie anhand des P450<sub>cam</sub> herausgefunden werden konnte, kommt es durch die Bindung eines Effektors, dem Elektronentransfer-Protein, zu einer trans-cis-

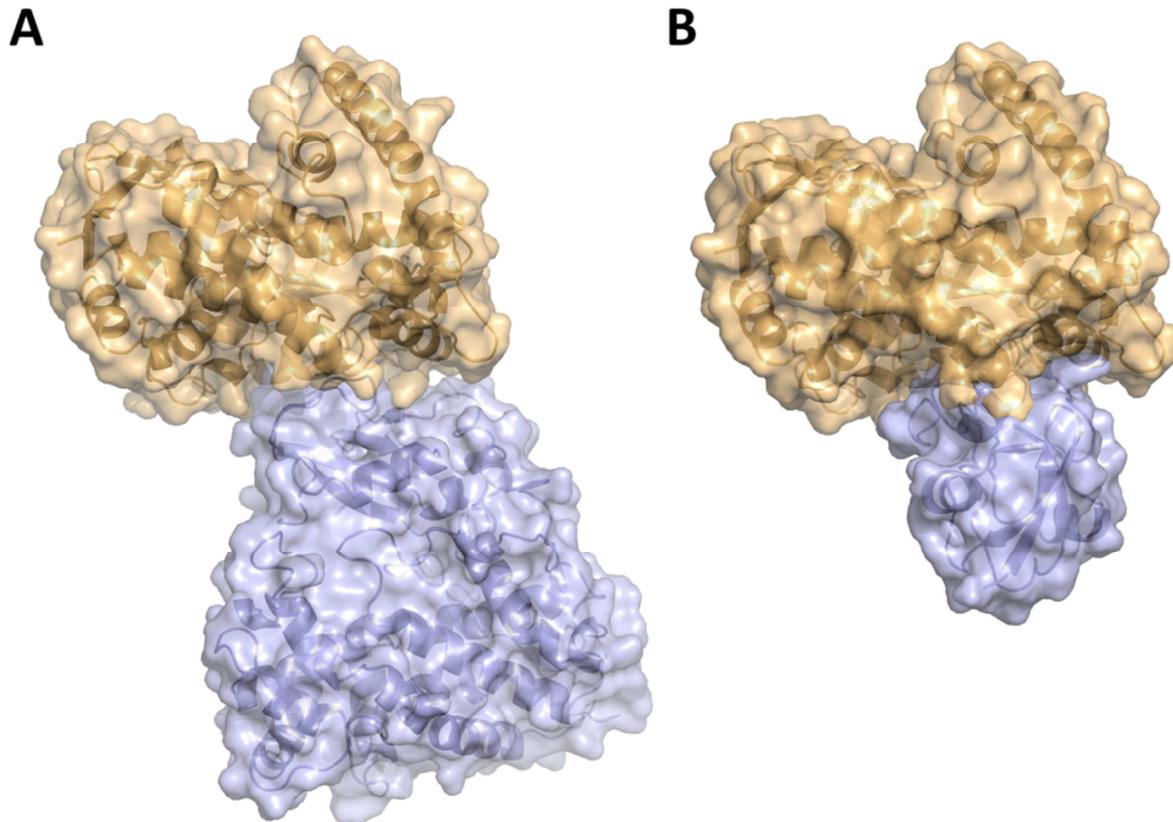
Isomerisierung dieser Bindung, was das Schließen des Substratkanals und die Reorientierung des Substrats im aktiven Zentrum zur Folge hat (OuYang *et al.* 2008, Ascitutto *et al.* 2009). Unter den bisher identifizierten Cytochromen mit h $\Phi$ -Pro Motiv befinden sich neben dem P450cam auch das CYP107 (EryF), CYP121, CYP2C5, CYP2C9 und P450 EpoK. Alle diese Enzyme setzen spezifische Substrate um und/oder katalysieren regio- und stereospezifische Reaktionen. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die durch einen Effektor ausgelöste Isomerisierung der Bindung in Verbindung mit der Umlagerung der B'-Helix der finale Schritt ist, um das Substrat in die korrekte Orientierung für die entsprechende Reaktion ins aktive Zentrum zu rücken. Als Folge hiervon wurde dieses Motiv als Marker für die Identifikation von P450 Enzymen beschrieben, die spezifisch für bestimmte Substrat/Produkt-Kombinationen sind (Pochapsky *et al.* 2010). Auch das CYP106A2 weist das h $\Phi$ -Pro Motiv auf. Hier findet sich im BC-Loop an Position 82 die Aminosäure Valin, gefolgt von einem Prolin unmittelbar vor einer helikalen Struktur. Dies deutet darauf hin, dass das CYP106A2 im Rahmen seiner natürlichen Funktion innerhalb des Organismus ein bestimmtes Substrat stereo- und regioselektiv oxidiert.

Eine weitere Möglichkeit, um Aussagen über das Substratspektrum sowie die Art des Substrats treffen zu können, bietet die Betrachtung der Aminosäuren, die das aktive Zentrum auskleiden. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Reste der SRS 4-6. Im Unterschied zu den Aminosäuren der SRS 1-3 (BC-Loop, F- und G-Helix), die erst nach einer Konformationsänderung des Enzyms ihre endgültigen Kontakte mit dem Substrat ausbilden, sind die Seitenketten in diesen Bereichen an der initialen Substratbindung und -erkennung beteiligt. Im Falle des CYP3A4, das ein sehr breites Substratspektrum besitzt, sind die Reste, die in das aktive Zentrum hereinragen eher klein und sterisch wenig restriktiv. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den Aminosäuren, welche die Substratbindetasche des CYP106A2 auskleiden, vorwiegend um sperrige, sterisch einschränkende  $\beta$ -verzweigte Aminosäuren (Leu239, Ile292, Leu294, Thr396). Darüber hinaus bietet insbesondere die Region um den  $\beta$ 1-4 Strang noch weitere Charakteristika, die Rückschlüsse auf das Substrat erlauben. Bei vielen P450 endet dieser Strang mit einem Arginin, welches eine Salzbrücke mit einem Häm-Propionat ausbildet. Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen der Größe des Substrates und der Entfernung dieses Argininrestes zu den Aminosäuren, die mit dem Substrat interagieren. Während bei P450 mit größeren Substraten der Abstand meist zwei Aminosäuren beträgt, liegen beim P450cam vier Reste dazwischen, wodurch das relativ kleine Substrat tiefer in die Substratbindetasche gelangen kann (Pochapsky *et al.* 2010). Der putative Substratkontakt beim CYP106A2 wird durch das Leu294 ausgebildet, zwei Aminosäuren vom Arg296 entfernt. Dies deutet auf eine Reaktion am Ende oder an einer vorstehenden Kante des Substratmoleküls hin. Das Vorhandensein mehrerer hydrophober Aminosäuren an den primären Substraterkennungsstellen weist außerdem entweder auf ein steroidales Substrat oder ein Substrat mit sperrigen Gruppen hin. Diese Vermutungen werden

durch die bisher identifizierten Substrate des CYP106A2 bestätigt. Eine mögliche physiologische Bedeutung des Enzyms könnte somit beispielsweise in der Funktionalisierung von Terpen-Grundgerüsten liegen, die über verschiedene Terpen-Zyklasten, wie eine neu in *B. megaterium* beschriebene bifunktionelle Triterpen/Sesquiterpen-Zyklase (Sato *et al.* 2011), synthetisiert werden.

#### 4.2.7 Nicht-kristallographische Symmetrie der CYP106A2 Kristalle

Von einer nicht-kristallographischen Symmetrie spricht man, wenn die Elementarzelle eines Kristalls zwei oder mehrere Kopien des Moleküls enthält, die sich nicht durch Symmetrieoperationen aufeinander abbilden lassen. Bei den Kristallen des CYP106A2 ist dies der Fall, denn die Elementarzelle enthält ein Dimer des Enzyms (siehe Abbildung 4.13 A). Die ermittelte Berührungsfläche des Komplexes, berechnet mit PISA (Krissinel und Henrick 2007), beträgt dabei etwa 840 Å<sup>2</sup>. Die Interaktion lässt sich auf Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken zurückführen. Dabei treten hauptsächlich saure Reste in den Bereichen des  $\beta$ 1-1 Stranges und im Loop zwischen den Helices K und L von Molekül A (blau) in Wechselwirkung mit basischen Aminosäuren in der B-Helix und im Umfeld der Cystein-Tasche von Molekül B (orange). Eine physiologische Relevanz dieses Komplexes ist fraglich. Obwohl für andere bakterielle P450, wie zum Beispiel das P450cam, eine Dimer-Bildung beschrieben wurde (Lipscomb *et al.* 1978, Nickerson und Wong 1997), gibt es keine Hinweise auf die Ausbildung funktioneller Dimere für das CYP106A2. Darüber hinaus findet die Wechselwirkung genau über die gleiche konservierte basische Domäne an der proximalen Seite des Cytochroms statt, für die ebenfalls eine Rolle bei der Interaktion mit dem Elektronendonator diskutiert wird (siehe Abbildungen 4.14 und 4.15). Es ist bekannt, dass die Bindung eines Redoxpartners an das P450 eine Konformationsänderung hervorruft, die auch einen Einfluss auf die Substratbindung hat (Wei *et al.* 2005). Als Folge der Kristallpackung des CYP106A2 ist somit ein Einfluss auf die Konformation des Enzyms und damit verbunden auf die Bindung des Substrats denkbar. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass das Protein mit Substratzugabe im Kristallisationsansatz zwar deutlich besser kristallisierte als in der substratfreien Form, im aktiven Zentrum jedoch nach der Strukturaufklärung keine eindeutige Elektronendichte vorhanden ist, die auf eine Koordination der Abietinsäure über dem Häm hindeutet.

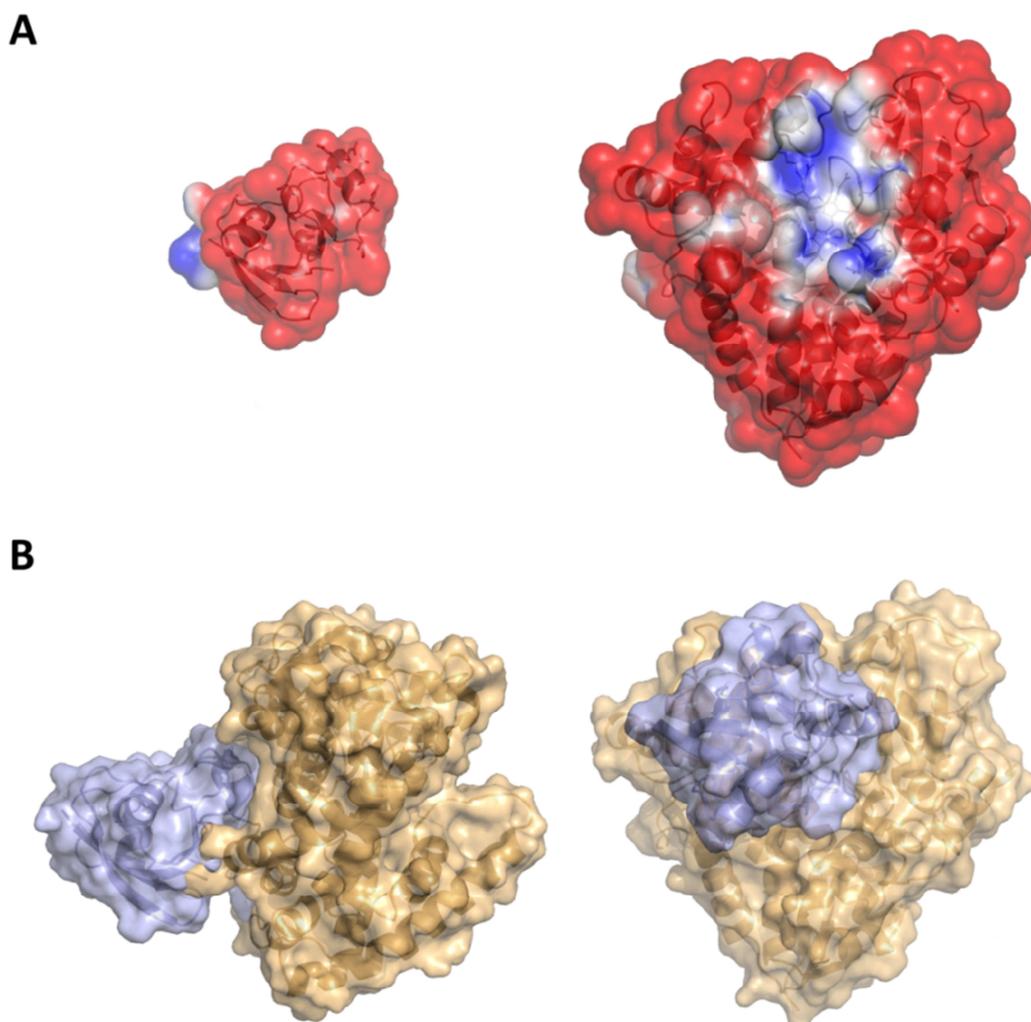


**Abbildung 4.13:** Wechselwirkung des CYP106A2 an der Interaktionsdomäne. A) Aufbau des CYP106A2 Dimers im Kristall. Die beiden CYP106A2 Moleküle sind unterschiedlich eingefärbt. Saure Aminosäuren-Seitenketten des blauen Moleküls treten mit basischen Aminosäuren des orangenen Moleküls in Wechselwirkung. Hierbei handelt es sich um die gleichen Aminosäuren, die auch für die Interaktion mit dem Elektronentransport-Protein verantwortlich sind. B) Docking-Komplex von CYP106A2 und Adx<sub>4-108</sub> (siehe Abbildung 4.14) als Vergleich.

#### 4.2.8 Redoxpartner-Interaktion

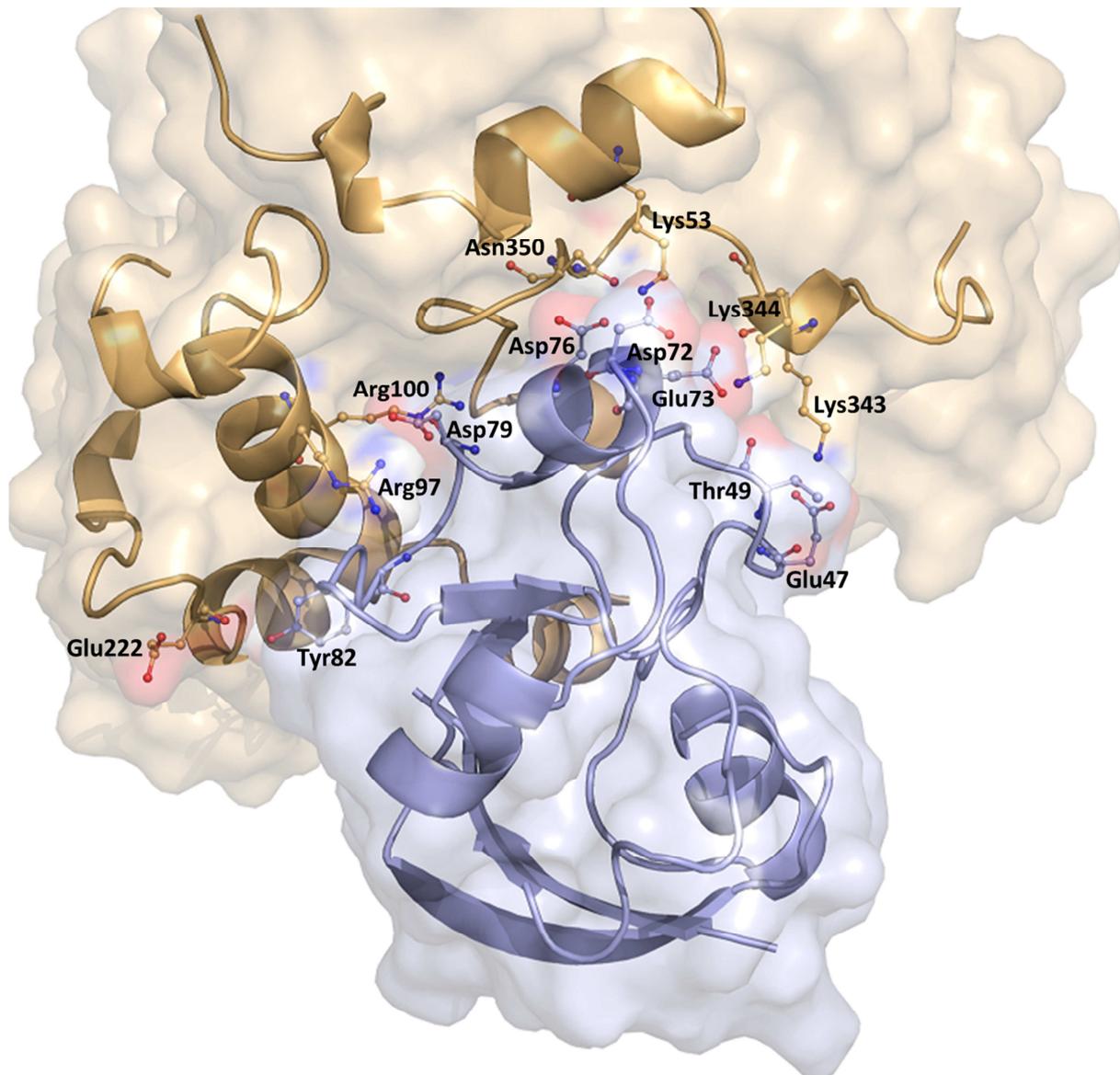
Die Wechselwirkung von Cytochromen P450 mit den jeweiligen Elektronendonoren erfolgt über elektrostatische Interaktionen. Dabei interagieren negativ geladene Aminosäuren an der Oberfläche der Elektronendonoren (Geren *et al.* 1984, 1986, Bernhardt *et al.* 1987, Coghlan und Vickery 1991) mit positiv geladenen Aminosäuren an der proximalen Seite der Cytochrome P450 (Bernhardt *et al.* 1984, 1987, Stayton und Sligar, 1990). Im Falle des Adrenodoxins wurden die sauren Reste im konservierten Bereich zwischen Glu65 und Asp79 als maßgeblich für die Interaktion sowohl mit der Adrenodoxin-Reduktase als auch mit verschiedenen P450-Enzymen identifiziert (Grinberg *et al.* 2000). Ferner wurde eine Beteiligung der Loop-Region um Threonin 49 an der Interaktion beschrieben (Hannemann *et al.* 2001). Eine der am besten beschriebenen Interaktionsdomänen bei Cytochromen P450 ist die des P450cam. Für die Interaktion mit dem natürlichen Redoxpartner Putidaredoxin sind im Wesentlichen die basischen Aminosäuren Arg72, Arg109 und Arg112 sowie Lys344 und Arg364 auf der proximalen Seite des Enzyms verantwortlich (Koga *et al.* 1993, Nakamura *et al.* 1994, Pochapsky *et al.* 1996, Unno *et al.* 1996). Anhand des Vergleichs der Struktur von

P450cam mit dem CYP106A2 Modell wurde eine Beteiligung der Aminosäuren Lys53, Arg97, Arg100 sowie Lys343 und Lys344 an der Interaktion mit dem Elektronendonator postuliert (Lisurek 2004). Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde ein Docking von Adx<sub>4-108</sub> und CYP106A2 mittels ClusPro (Comeau *et al.* 2004*a,b*, Kozakov *et al.* 2004, 2010) durchgeführt. Abbildung 4.14 A zeigt das Oberflächenpotential der beiden Proteine. Die konservierte basische Interaktionsdomäne des CYP106A2 ist gut an der blauen Färbung zu erkennen. Das Wildtyp-Adx ist, wie die meisten Ferredoxine, vorwiegend negativ geladen und hat einen isoelektrischen Punkt von 4,0 (Maruya *et al.* 1983, Ewen *et al.* 2011). Die besten Docking-Ergebnisse zeigen allesamt eine Interaktion der konservierten Wechselwirkungsdomäne zwischen Glu65 und Asp79 des Adx<sub>4-108</sub> mit der proximalen Interaktionsdomäne des CYP106A2. Eine Übersicht des gedockten Proteinkomplexes liefert Abbildung 4.14 B.



**Abbildung 4.14:** Wechselwirkung von CYP106A2 und Adx<sub>4-108</sub>. A) Oberflächenpotential von Adx<sub>4-108</sub> (PDB-Code: 1AYF) und CYP106A2. Das elektrostatische Potential wurde mit dem Programm APBS (Baker *et al.* 2001) berechnet und die Oberfläche der Proteine entsprechend eingefärbt. Ein negatives Potential ist rot, ein positives Potential blau dargestellt. B) Docking-Komplex von CYP106A2 (orange) und Adx<sub>4-108</sub> (blau). Die Orientierung der Proteine entspricht Abbildungsteil A. Das Docking erfolgte mit ClusPro (Comeau *et al.* 2004*a,b*, Kozakov *et al.* 2004, 2010).

Anhand der detaillierteren Ansicht der Wechselwirkungsregion in Abbildung 4.15 lassen sich die Wechselwirkungen zwischen den sauren Resten im Adrenodoxin und den basischen Resten im CYP106A2 genauer erkennen. Für die Interaktion sind hauptsächlich Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen verantwortlich.



**Abbildung 4.15:** Übersicht über die an der Interaktion zwischen CYP106A2 (orange) und Adx<sub>4-108</sub> (blau) beteiligten Aminosäuren. Die Seitenketten der sauren Aminosäuren des Adx<sub>4-108</sub> und der basischen Aminosäuren des CYP106A2, welche miteinander interagieren, sind als Kugel-Stab-Modell dargestellt und beschriftet.

### 4.3 In vitro Untersuchungen des CYP105A1

Actinobacteria der Gattung *Streptomyces* sind bekannt für ihren ausgeprägten Sekundärstoffwechsel und die Synthese einer großen Bandbreite von antibiotisch wirksamen Substanzen. An vielen solcher Synthesewege sind Cytochrome P450 beteiligt (Lamb *et al.* 2003). Die Analyse des genetischen Kontexts von CYP105A1 zeigte jedoch keine Lokalisierung in einem biosynthetischen Cluster und gibt daher keinen Hinweis auf eine mögliche Involvierung des Enzyms in einen solchen Syntheseweg. Im Hinblick auf das breit gefächerte Substratspektrum, welches verschiedene Herbizide, Antidiabetika, Vitamin D<sub>3</sub> und die Norisoprenoide  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ionon umfasst, ist eine wahrscheinliche physiologische Funktion des CYP105A1 der Abbau verschiedener Xenobiotika. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass andere Mitglieder der CYP105-Familie ebenfalls die Fähigkeit besitzen, ein breites Spektrum an strukturell unterschiedlichen Substanzen umzusetzen (Yasutake *et al.* 2007). Als bodenbewohnender Organismus, der beispielsweise auf zerfallener Vegetation und Holzabfällen wächst, kommt *S. griseolus* auf natürliche Weise in Kontakt mit Biomaterial, welches eine Vielzahl pflanzlicher Sekundärmetabolite wie Terpenoide enthält. Hierdurch ergibt sich ein möglicher physiologischer Hintergrund zum Umsatz von Harzsäuren durch das CYP105A1, weswegen zur genaueren Untersuchung der Substratspezifität des Enzyms *in vitro* Analysen der Diterpenoid-Substanzbibliothek erfolgten.

Analog zu den Untersuchungen mit CYP106A2 wurde die Bindung der Harzsäuren im aktiven Zentrum des CYP105A1 differenzspektroskopisch untersucht. Dabei konnte bei allen acht Substanzen ein Typ-I shift beobachtet werden. Für die Substrate Abietinsäure, Dehydroabietinsäure und Isopimarsäure wurden die Dissoziationskonstanten bestimmt. Die Bindung dieser Substrate erfolgte mit hoher Affinität bei  $K_d$ -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich. Ein Vergleich dieser Werte mit Dissoziationskonstanten zuvor beschriebener Substrate ist aufgrund fehlender Literaturdaten nicht möglich. Folglich handelt es sich bei den Harzsäuren um die ersten beschriebenen Typ-I Substrate des CYP105A1.

Mit einem rekonstituierten *in vitro* System konnte ein Substratumsatz aller acht Harzsäuren nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten die korrespondierenden Aldehyde und Olefine dabei keine Produktbildung, wohingegen die Alkohole unselektiv umgesetzt wurden. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf die Art der Bindung der Terpenoid-Substrate im aktiven Zentrum ableiten. Sowohl die Carbonsäuren als auch die Alkohole enthalten eine Hydroxylgruppe, die als Donor für eine Wasserstoffbrückenbindung fungieren kann. Im Gegensatz dazu besitzt die Aldehydgruppe kein sauerstoffgebundenes Wasserstoffatom. Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen kann in diesem Fall nur über die Elektronen des Sauerstoffatoms als Akzeptor geschehen. Die strukturellen Grundlagen dieser Unterschiede im Umsatz der verschiedenen Substrate wurden durch Docking-Studien aufgeklärt. Diese zeigten eine deutliche Präferenz für die Orientierungen der Liganden, die zu

den experimentell beobachteten Hydroxylierungsmustern führten (siehe Abbildung 3.20). Eine Bestätigung dieser Ergebnisse durch Analyse der Kristallstruktur war aufgrund der gleichzeitigen Bindung von Abietinsäure und dem Lösemittel DMSO im aktiven Zentrum des CYP105A1 jedoch nicht möglich.

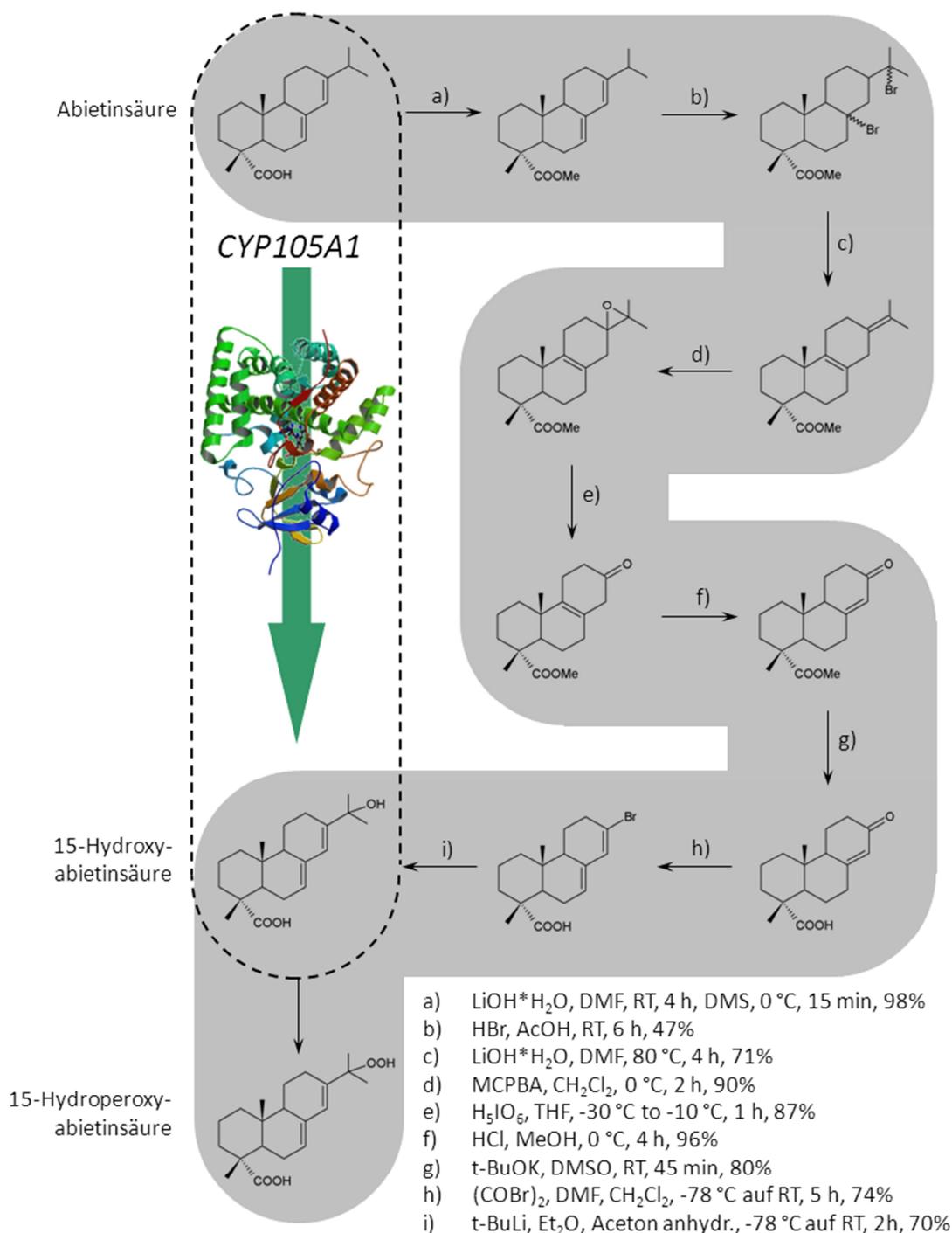
Der Umsatz von Abietinsäure, Dehydroabietinsäure und Isopimarsäure wurde genauer untersucht und die Kenngrößen der Enzymkinetik wurden bestimmt. Die Umsetzung dieser Harzsäuren erfolgte regioselektiv und resultierte in der Bildung jeweils eines Produktes. Dabei lagen die ermittelten  $K_m$ -Werte im gleichen Bereich, der für die 1 $\alpha$ - und 25-Hydroxylierung des Vitamin D<sub>3</sub> durch die Wildtyp-Variante und verschiedene Mutanten des CYP105A1 bestimmt wurde (Hayashi *et al.* 2008). Im Gegensatz dazu ist der  $V_{max}$ -Werte der Hydroxylierung von Abietinsäure mit 1,18 nmol Produkt pro nmol CYP105A1 pro Minute um den Faktor 150 bzw. 450 höher als die  $V_{max}$ -Werte für die 1 $\alpha$ - und 25-Hydroxylierung des Vitamin D<sub>3</sub> durch das Wildtyp-Enzym (Sakaki *et al.* 2011).

Die unterschiedlichen Reaktionsprodukte wurden mittels NMR-Spektroskopie untersucht und konnten im Fall der Abietan-Derivate als 15-Hydroxyabietinsäure und 15-Hydroxydehydroabietinsäure identifiziert werden. Die Isopimarsäure, bei der sich als Harzsäure des Pimaran-Typs an Stelle der Isopropylgruppe eine Methyl- und eine Vinyl-Gruppe als Substituent am C13 befinden, wurde zu 15,16-Epoxyisopimarsäure umgesetzt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass CYP105A1 als effiziente Harzsäuren-Hydroxylase mit hohen Produktbildungsrate identifiziert wurde, die sowohl Terpenoide des Abietan- als auch des Pimaran-Typs umzusetzen vermag. Im Hinblick auf den Lebensraum von *Streptomyces griseolus* ist eine physiologische Relevanz dieser Reaktionen bei der Detoxifizierung von pflanzlichen Sekundärmetaboliten denkbar. Zwar wurde der Umsatz der pflanzlichen Norisoprenoide  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ionon bereits zuvor beschrieben (Celik *et al.* 2005), jedoch erfolgte die Produktbildung bei diesen Substraten unselektiv und mit sehr niedriger Aktivität. Die im Unterschied dazu hohe katalytische Effizienz sowie die Regioselektivität der Harzsäure-Umsätze machen das CYP105A1 zu einem interessanten Kandidaten für die biotechnologische Nutzbarmachung dieser Reaktionen.

#### 4.4 Konstruktion und Charakterisierung eines CYP105A1 basierten Ganzzellsystems in *E. coli*

Durch ihre Fähigkeit zur Oxidation nicht-aktivierter Kohlenstoffatome besitzen Cytochrome P450 ein hohes biotechnologisches Potential. Dies zeigte sich auch an den durch CYP105A1 katalysierten Umsätzen, deren Reaktionsprodukte über chemische Methoden nur schwer zugänglich sind. Für die Epoxidierung der Vinylgruppe in Pimarsäure wurde in der Literatur ein mehrstufiger Syntheseweg beschrieben (Arreguy-San Miguel *et al.* 1989). Die chemische Hemisynthese und die NMR-Analyse von 15,16-Epoxyisopimarsäure wurden in der zugänglichen Literatur bisher nicht beschrieben, es handelt sich in vorliegender Arbeit daher um die erste Beschreibung dieser Substanz. Derivate der Isopimarsäure könnten sich insofern als interessant erweisen, da diese Substanz als Öffner des durch hohe  $K^+$ -Leitfähigkeit charakterisierten spannungs- und  $Ca^{2+}$ -abhängigen BK-Kanals bekannt ist (Imaizumi *et al.* 2002). Eine direkte Anwendung ergibt sich für die Hydroxylierung der Abietinsäure am C15, denn die der 15-Hydroxyabietinsäure sehr ähnliche 15-Hydroperoxyabietinsäure (15-HPA) ist als starkes Kontaktallergen der Hauptauslöser von Kontaktdermatitis gegenüber Kolophonium, welche zu den zehn häufigsten allergischen Reaktionen gehört (Karlberg *et al.* 1988, Downs und Samson 1999). Schon früher wurde eine Verwendung von 15-HPA für die Entwicklung effektiverer Allergie-Testmethoden vorgeschlagen (Hausen *et al.* 1993). Darüber hinaus besteht ein hoher Bedarf an dieser Substanz für die Erforschung der genauen Reaktionsmechanismen von Hydroperoxiden mit Hautproteinen, was zur Auslösung der Kontaktdermatitis führt. Entsprechende Studien werden häufig mit Modellsubstanzen durchgeführt (Lepoittevin und Karlberg 1994), da die Isolierung von 15-HPA aus biologischem Material sehr aufwendig ist (Karlberg *et al.* 1988). Eine alternative Quelle für diese Substanz ist die Hemisynthese aus Abietinsäure, bei der zunächst die 15-Hydroxyabietinsäure synthetisiert wird, die schließlich in einem letzten Reaktionsschritt in die 15-HPA überführt wird (Haberkorn *et al.* 2001). Aufgrund der einfachen Aromatisierung des C-Rings sind für die Einführung der Hydroxygruppe an der Isopropylfunktion der Abietinsäure auf chemischem Weg insgesamt neun Reaktionsschritte nötig, wobei die Endausbeute lediglich bei etwa 10 % liegt. Abbildung 4.16 gibt eine Übersicht über den heutigen Stand der sehr kosten- und zeitaufwändigen Synthese. Das hier vorgeschlagene kombinierte Verfahren aus der Biotransformation von Abietinsäure zu 15-Hydroxyabietinsäure mit anschließender chemischer Peroxidierung umgeht vollständig die dargestellten Reaktionsschritte a) bis i) und stellt somit eine weitaus wirtschaftlichere und umweltfreundlichere Alternative für die Produktion von 15-HPA dar.



**Abbildung 4.16:** Schematisierte Vorgehensweise bei der Hemisynthese von 15-Hydroperoxyabietinsäure aus Abietinsäure nach Abad *et al.* (1985) und Haberkorn *et al.* (2001).

Um einen wesentlichen Schritt in Richtung der Anwendung dieser ressourcensparenden Alternative zu gehen, bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit daher in der Konstruktion, Evaluierung und Optimierung eines Ganzzellsystems für die Biokonversion von Harzsäuren. Zwar konnte in unserer Gruppe vor kurzem ein effektives Ganzzell-Umsatzsystem für Terpenoide mit CYP106A2 in *Bacillus megaterium* entwickelt werden (Bleif *et al.* 2012), im Unterschied hierzu wurde für die CYP105A1-basierten Umsätze jedoch *E. coli* als Wirt ausgewählt. Dabei standen zwei Kriterien im Vordergrund:

Auf der einen Seite zeigen die meisten Harzsäuren eine stärkere antibakterielle Wirkung gegenüber Gram-positiven als gegenüber Gram-negativen Bakterien (Söderberg *et al.* 1990). Daher wurde erwartet, dass *E. coli* eine höhere Resistenz gegenüber großen Mengen des Substrats aufweist. Auf der anderen Seite enthält das Genom von *B. megaterium* mehrere endogene Cytochrome P450, die bei einer Verwendung des Organismus als Bioreaktor zu einer möglichen Konkurrenzsituation der Enzyme um das Substrat und unerwünschten Nebenprodukten führen könnte. Da jedoch *E. coli* aufgrund fehlender P450-Gene auch keine passenden Elektronentransfer-Proteine besitzt, wurde ein Vektor für die Koexpression der heterologen Redoxpartner Etp1<sup>skf</sup> und Arh1 aus *S. pombe* kloniert. Diese Proteine, die in einer Studie verschiedener heterologer Redoxsysteme für das CYP105A1 zusammen mit dem Ferredoxin und der Ferredoxin-Reduktase aus Spinat die höchste Reduktionseffizienz zeigten (Kleser 2011), wurden bereits mit Erfolg für CYP105A1-basierte Biokonversionen in *B. megaterium* eingesetzt (Kleser *et al.* 2012). Alle Enzyme konnten erfolgreich in *E. coli* überexprimiert werden. Die Abschätzung der Proteinmenge mittels Western Blot nach Optimierung der Expressionsbedingungen ergab, dass Etp1<sup>skf</sup> mit einer etwa sechsmal höheren molaren Konzentration im Vergleich zu Arh1 und CYP105A1 exprimiert wurde (siehe Abbildung 3.32). Somit betrug das stöchiometrische Verhältnis der Redoxkomponenten 1:6:1 (Reduktase:Ferredoxin:P450). Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Konzentration der Proteinkomponenten der Redoxkette wurden für das ebenfalls aus *Streptomyces* stammende CYP105D5 erzielt, bei dem die höchste Aktivität in einem molaren Verhältnis von Ferredoxin-Reduktase zu Ferredoxin zu P450 von 1:3:1 erzielt wurde (Chun *et al.* 2007).

Da die Versorgung mit dem Kofaktor oftmals der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Ganzzellumsetzung mit Cytochromen P450 ist, wurde in dieser Arbeit ein zusätzlicher Vektor, der die DNA der Alkoholdehydrogenase aus *L. brevis* enthält, für die Regeneration von NADPH konstruiert. Die Anwendung eines enzymbasierten Systems zu Kofaktor-Regeneration ist eine verbreitete Methode und resultiert häufig in signifikanten Verbesserungen der Umsatzraten im Ganzzellsystem (Mouri *et al.* 2006, Torres Pazmiño *et al.* 2010, Zehentgruber *et al.* 2010). Überraschenderweise konnte der Umsatz durch das enzymbasierte Regenerationssystem jedoch lediglich um etwa 10 % gesteigert werden (siehe Abbildung 3.37). Dies deutet darauf hin, dass die Kofaktor-Versorgung nicht der limitierende Faktor während der Ganzzellumsetzung ist. Tatsächlich stellte der Aufbau der Gram-negativen Bakterienmembran als selektive Permeabilitätsbarriere für das Substrat eine deutlich größere Herausforderung dar. Probleme mit der Substratverfügbarkeit innerhalb der Zelle bei der Verwendung von Harzsäuren im Ganzzellsystem mit *E. coli* konnten bereits zuvor beobachtet werden (Bleif *et al.* 2011). Eine gängige Methode zur Vermeidung dieses Problems ist die Schwächung oder das Aufbrechen der Zellmembran als Diffusionsbarriere, was beispielsweise durch die Zerstörung der Zellen erreicht werden kann (Zehentgruber *et al.* 2010). In dieser Arbeit wurden mehrere Substanzen

auf ihre permeabilisierende Wirkung gegenüber der Bakterienmembran und damit verbunden auf die Umsatzsteigerung des Ganzzellsystems getestet. Von den untersuchten Permeabilisierern zeigte das Peptid-Antibiotikum Polymyxin B die beste Wirkung. Die Umsatzsteigerung um den Faktor fünf bei der Verwendung dieser Substanz deutet darauf hin, dass in der Tat die Substratzugänglichkeit der limitierende Faktor des Ganzzellsystems ist.

Ein wichtiger Punkt bei der Erforschung des biokatalytischen Anwendungspotentials von Cytochromen P450 ist die Optimierung der Reaktionsbedingungen (Julsing *et al.* 2008). Daher wurde in vorliegender Arbeit ein starkes Gewicht auf das Reaktions-Engineering gelegt. Die optimalen Bedingungen für die Proteinexpression und den Substratumsatz wurden getrennt voneinander betrachtet (siehe Abschnitt 3.8). Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung ruhender Zellen für die Biokonversion nicht nur in einer höheren Produktausbeute resultiert, sondern auch die Bildung unerwünschter Nebenprodukte minimiert, was deutliche Vorteile bei der Isolation und organischen Aufarbeitung des Produktes mit sich bringt. Die Kombination von optimierten Expressions- und Umsatzbedingungen führte insgesamt zu einer Steigerung der Produktbildungsrate nach zweistündiger Reaktion um den Faktor fünf. Diese Verbesserung belegt die Bedeutung des Reaktions-Engineering bei der Etablierung von biotechnologischen Prozessen mit Potential für industrielle Anwendungen. Die Kombination aller Optimierungsparameter führte zu einer vollständigen Umsetzung von 200  $\mu\text{M}$  Substrat innerhalb von zwei Stunden mit einer anfänglichen Umsatzrate von 125  $\mu\text{M}/\text{Stunde}$ .

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Entwicklung und Charakterisierung eines CYP105A1-basierten Ganzzellsystems zum Umsatz von Harzsäuren in *E. coli* zu einem erfolgreichen Abschluss geführt werden konnte. Durch die Kombination eines enzymgekoppelten Regenerationssystems, einer effektiven Strategie zur Permeabilisierung der Zellmembran und einer Optimierung von sowohl Expressions- als auch Reaktionsbedingungen, wurde eine theoretische Produktivität von 0,764  $\text{g l}^{-1} \text{Tag}^{-1}$  für die Bildung von 15-Hydroxyabietinsäure erreicht (Janocha *et al.* 2013b). Eine solche Ausbeute erfüllt die minimalen Prozessbedingungen für die biokatalytische Produktion von pharmazeutischen Produkten (Straathof *et al.* 2002) und liegt in der gleichen Größenordnung wie die Produktivität von 1  $\text{g l}^{-1} \text{Tag}^{-1}$  bei der industriell angewandten Biokonversion von Compactin zu Pravastatin durch das CYP105A3 (Park *et al.* 2003).

## 4.5 Kristallstruktur des CYP105A1 mit gebundener Abietinsäure

Da bereits mehrere Strukturen des CYP105A1 existieren (siehe Tabelle 4.5), fokussiert sich die Diskussion der Daten auf die Bindung der Abietinsäure und die Wechselwirkung mit den heterologen Redoxpartnern.

Die Faltung der Polypeptidkette und die Orientierung der Aminosäure-Seitenketten des CYP105A1 weisen keine nennenswerten Unterschiede zu der für den molekularen Ersatz verwendeten Struktur auf. Ein Vergleich der Faltung der beiden Strukturen ergab einen Q-score (siehe Abschnitt 4.2.1) von 0,97 bei einer RMSD von 0,36 Å.

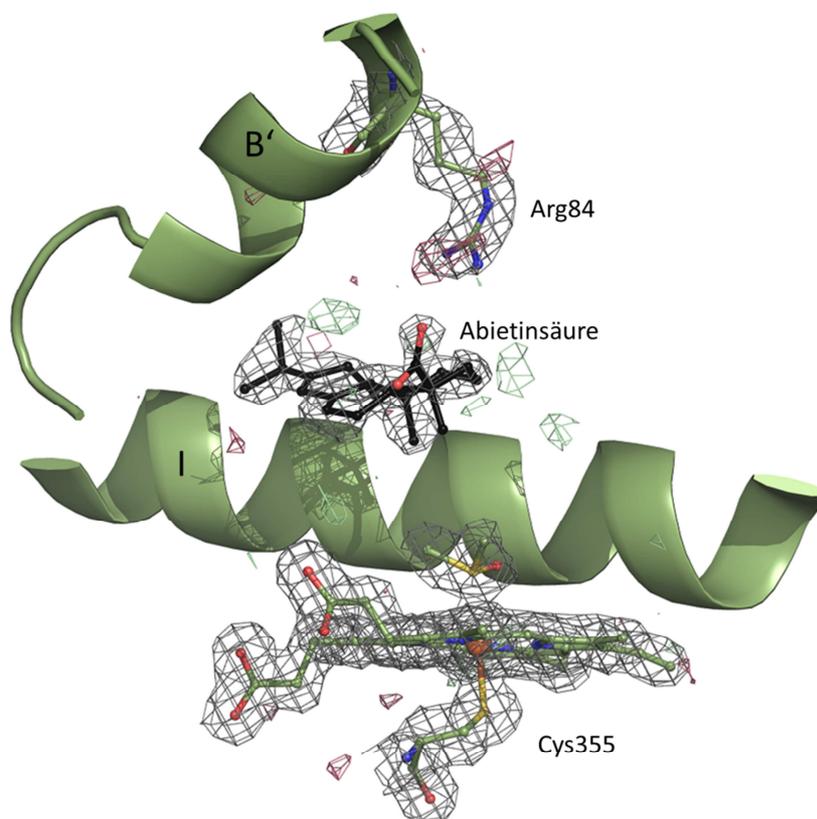
**Tabelle 4.5:** Auflistung der bereits publizierten Strukturen des CYP105A1.

PDB-Code	Variante	Ligand	Auflösung [Å]
2ZBX	Wildtyp	Imidazol	1,5
2ZBY	R84A	---	1,6
2ZBZ	R84A	1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>	1,9
3CV8	R84F	---	2,0
3CV9	R73A/R84A	1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>	1,7

### 4.5.1 Aktives Zentrum von CYP105A1

Durch Ko-Kristallisation von CYP105A1 mit Abietinsäure konnte eine Kristallstruktur mit gut definierter Elektronendichte des Substrats im aktiven Zentrum erhalten werden. Wie in Abbildung 4.17 zu erkennen ist, erfolgte die Substratbindung dergestalt, dass die Ebene des tricyclischen Ringsystems der Abietinsäure in einer Entfernung von etwa 8,5-9,5 Å parallel zur Hämebene liegt. Dabei bildet ein Sauerstoffatom der Carboxylfunktion des Substrats eine Salzbrücke mit einem Abstand von 2,9 Å zur Guanidingruppe des Arginin 84 im BC-Loops aus. Die zentrale Bedeutung dieser Aminosäure als einer von drei Argininresten, welche die Substratbindetasche des CYP105A1 auskleiden, wurde bereits früher beschrieben (Sugimoto *et al.* 2008). Die Orientierung der Abietinsäure im aktiven Zentrum ist unerwartet, da sie sich deutlich von den Vorhersagen in den Substratdocking-Studien unterscheidet (siehe Abschnitt 3.5). Im Unterschied zu diesen zeigt die Isopropylfunktion der Abietinsäure in Richtung der I-Helix, und die Entfernung des C15, an dem die Hydroxylierungsreaktion stattfindet, zum zentralen Eisenatom des Häms beträgt 12,7 Å. Normalerweise ist die Entfernung der Hydroxylierungsposition zum Eisen in Substrat-Protein-Komplexen von Cytochromen P450 deutlich geringer. So beträgt der Abstand bei P450cam, CYP167A1 und CYP107A1 beispielsweise 4,5 Å, 4,7 Å bzw. 4,8 Å (Cupp-Vickery *et al.* 1996, Nagano *et al.* 2003, Poulos *et al.* 1987). Zwar wurden auch bei dem Komplex von CYP105A1 mit 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> mit 10,9 und 11,9 Å ähnlich große Entfernungen zwischen den Hydroxylierungspositionen festgestellt (Sugimoto *et al.* 2008), jedoch erfolgte in diesem Fall die Bindung derart, dass die entsprechenden C-Atome in Richtung des Häm-Kofaktors weisen. Besonders

der Vergleich mit der Struktur des CYP106A2 in Komplex mit der Abietinsäure, bei dem die Entfernung der Hydroxylierungsposition lediglich 3,3 Å beträgt, verdeutlicht, dass es sich bei der observierten Bindung der Abietinsäure nicht um die finale Orientierung zur Hydroxylierung handeln kann. Dass im Laufe des mehrstufigen Reaktionszyklus der P450-Enzyme eine Reorientierung des Substrats im aktiven Zentrum stattfinden kann, wurde bereits für andere Cytochrome gezeigt. So konnte beispielsweise beim P450BM3 nach der Reduktion eine Bewegung des Substrats Palmitinsäure von mehreren Angström in Richtung des Häm-Eisens nachgewiesen werden (Modi *et al.* 1995, 1996). Auch beim P450cam wurde mittels NMR-Studien eine Bewegung des Substrates Campher in Richtung des zentralen Häm-Eisenatoms nach Bindung des Redoxpartners Putidaredoxin in einem Bereich zwischen 0,15 und 0,7 Å beobachtet (Tosha *et al.* 2003). Die experimentellen Daten deuten darauf hin, dass es beim CYP105A1 durch die Bindung des Redoxpartners und/oder die damit verbundene Reduktion des Enzyms ebenfalls zu einer induzierten Umlagerung bestimmter Aminosäuren innerhalb des Enzyms kommt, was einen direkten Einfluss auf die Bindung des Substrates im aktiven Zentrum hat. Im Fall der Abietinsäure erfolgt dies wahrscheinlich zusammen mit einem Umklappen des Substrats, wodurch die Isopropylgruppe von der I-Helix in Richtung Häm-Ebene wegbewegt wird.

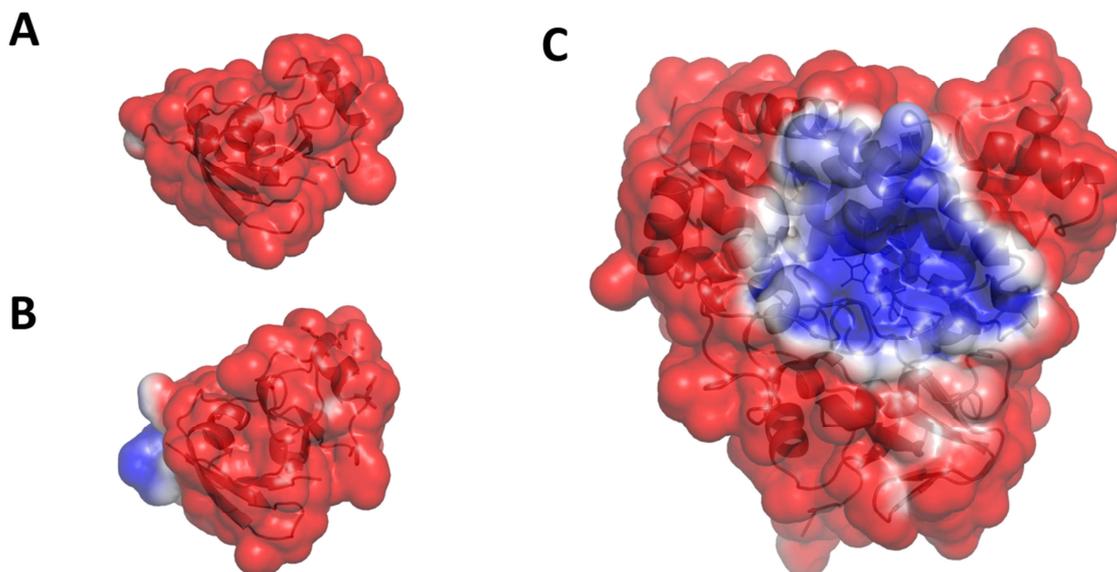


**Abbildung 4.17:** Aktives Zentrum des CYP105A1 mit gebundener Abietinsäure. Die Elektronendichte-Karte für das Häm, den Cysteinrest 355 sowie das DMSO-Molekül und die Abietinsäure ist mit 1,0  $\sigma$  konturiert. Die  $F_0$ - $F_c$  Elektronendichte-Karte ist bei 3,0  $\sigma$  (blau) und -3,0  $\sigma$  (rot) konturiert.

Eine weitere Besonderheit des CYP105A1 Datensatzes ist die sehr gut definierte Elektronendichte im aktiven Zentrum direkt über dem Häm-Molekül. Bei diesem sechsten Liganden handelt es sich nicht um ein Wassermolekül, sondern um ein Molekül DMSO, das als Lösungsmittel für das Substrat verwendet wurde. Die Bindung eines DMSO-Moleküls an den Häm-Kofaktor konnte schon früher beim P450BM3 beobachtet werden (Kuper *et al.* 2007). Allerdings erfolgte bisher noch keine Beschreibung einer P450-Struktur, bei der gleichzeitig sowohl DMSO als auch das Substrat im aktiven Zentrum gebunden haben. Besonders interessant ist dieses Ergebnis vor dem Hintergrund, dass DMSO häufig als Lösemittel für P450-Substrate Verwendung findet.

#### 4.5.2 Redoxpartner-Interaktion

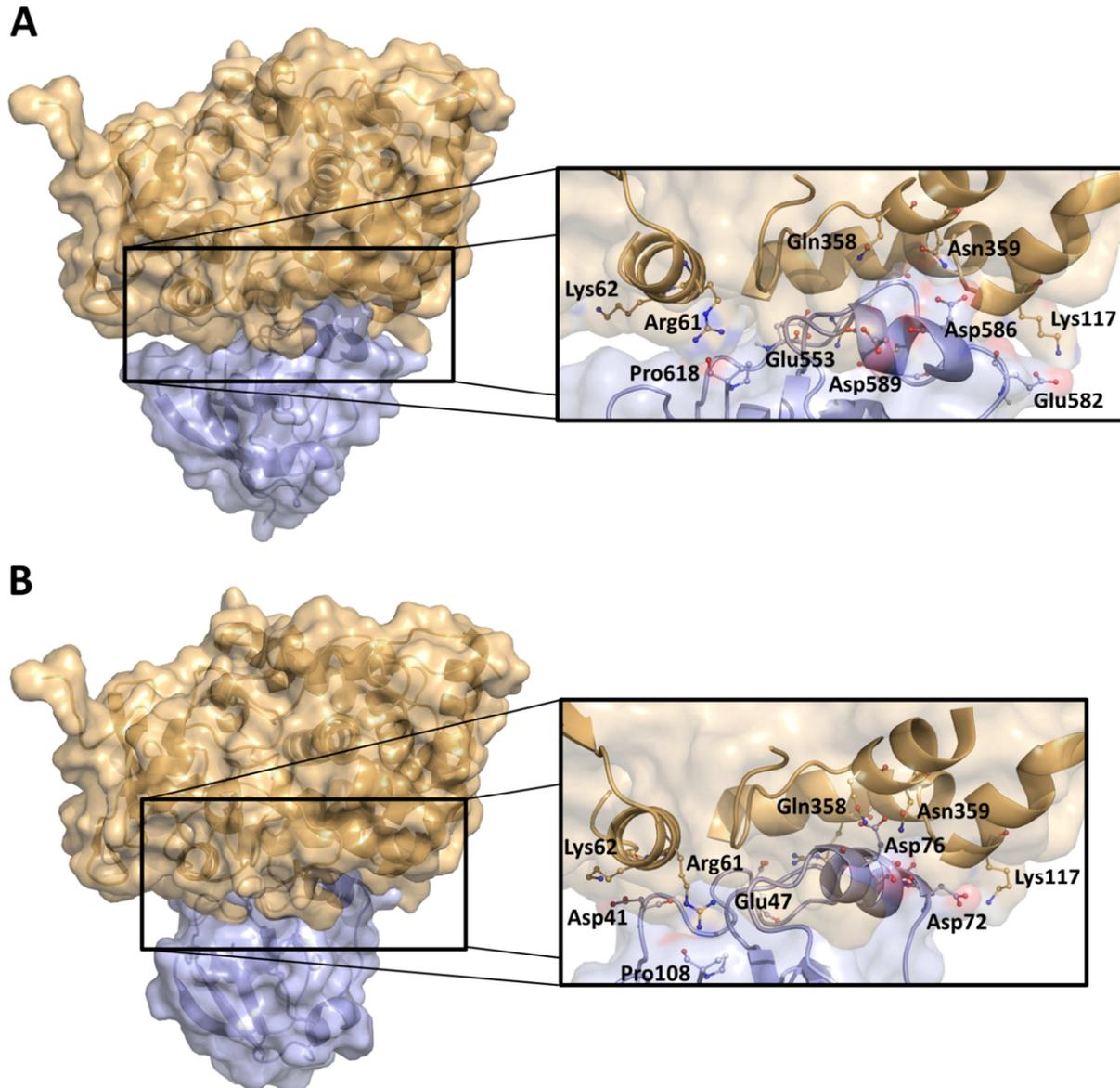
Analog zur Evaluierung der Interaktion zwischen  $\text{Adx}_{4-108}$  und CYP106A2 wurden sowohl die Interaktionsdomäne des CYP105A1 als auch anhand von Docking-Analysen die Wechselwirkung zwischen CYP105A1 und den heterologen Elektronendonoren  $\text{Adx}_{4-108}$  und  $\text{Etp1}^{\text{skf}}$  analysiert. Abbildung 4.18 zeigt das Oberflächenpotential der stark negativ geladenen Redoxpartner  $\text{Adx}_{4-108}$  und  $\text{Etp1}^{\text{skf}}$  sowie die konservierte positiv geladene Wechselwirkungsdomäne des CYP105A1 auf der proximalen Seite des Enzyms.



**Abbildung 4.18:** Oberflächenpotential des CYP105A1 und der heterologen Elektronendonoren. A)  $\text{Adx}_{4-108}$  (PDB-Code: 1AYF), B)  $\text{Etp1}^{\text{skf}}$  (PDB-Code: 2WLB) und C) CYP105A1. Das elektrostatische Potential wurde mit dem Programm APBS (Baker *et al.* 2001) berechnet und die Oberfläche der Proteine entsprechend eingefärbt. Ein negatives Potential ist rot, ein positives Potential blau dargestellt.

Abbildung 4.19 zeigt die mittels ClusPro errechneten Docking-Komplexe zwischen CYP105A1 und den heterologen Redoxpartnern  $\text{Adx}_{4-108}$  und  $\text{Etp1}^{\text{skf}}$ . Wie anhand der gezoomten Ansicht der Kontaktregionen erkennbar ist, findet die Interaktion bei beiden Proteinen über konservierte saure Aminosäuren in der Region um die Helix F statt. Darüber hinaus ist sowohl beim  $\text{Adx}_{4-108}$  als auch

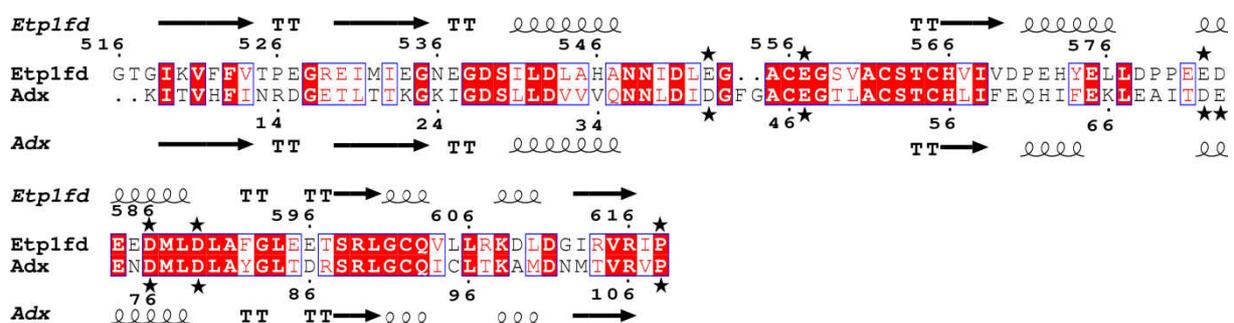
beim Etp1<sup>skf</sup> jeweils der C-terminale Prolinrest, der eine Salzbrücke zum Arg61 im CYP105A1 ausbildet, an der Wechselwirkung beteiligt. Dieses Prolin ist absolut konserviert in allen Ferredoxinen des Hydroxylase-Typs und spielt außerdem eine wichtige Funktion beim Zusammenhalt der C- und N-terminalen Regionen der Proteine (Grinberg *et al.* 2000).



**Abbildung 4.19:** Übersicht des Docking-Komplexes von CYP105A1 (orange) und den heterologen Redoxpartnern (blau). A) Adx<sub>4-108</sub> B) Etp1<sup>skf</sup>. Die Seitenketten der sauren Aminosäuren der Elektronentransportproteine und der basischen Aminosäuren des CYP105A1, die Salzbrücken zueinander ausbilden, sind als Kugel-Stab-Modell dargestellt und beschriftet. Das Docking erfolgte mit ClusPro (Comeau *et al.* 2004a,b, Kozakov *et al.* 2004, 2010).

Anhand des Sequenzabgleichs in Abbildung 4.20 lässt sich gut der hohe Konservierungsgrad der beiden Proteine mit einer Aminosäure-Identität von 46 % erkennen. Trotz dieser großen Ähnlichkeit der Elektronenüberträger verläuft die Reduktion des CYP105A1 durch die heterologen Elektronentransportproteine Arh1 und Etp1<sup>skf</sup> deutlich effektiver als durch das bovine System (Kleser

2011). Zwar konnte in derselben Arbeit gezeigt werden, dass sich durch die Verwendung der verkürzten Form Adx<sub>4-108</sub> mit einem Redoxpotential von -344 mV (Uhlmann *et al.* 1997) die Reduktionseffizienz im Vergleich zum Wildtyp-Adx mit dessen deutlich höherem Reduktionspotential von -274 mV (Uhlmann und Bernhardt 1995) etwa verdoppeln ließ, jedoch war das Etp1<sup>skf</sup> immer noch um etwa den Faktor drei effizienter. Das Reduktionspotential von Etp1<sup>fd</sup> ist mit -353 mV (Schiffler *et al.* 2004) vergleichbar mit dem der verkürzten Adx-Variante. Die trotz ähnlich großem Reduktionspotential deutlich unterschiedliche Reduktionseffizienz deutet darauf hin, dass weitere Faktoren wie die Interaktion der Proteine eine Auswirkung auf die Elektronenübertragung haben. Wie sich bei der Untersuchung der Interaktionsdomänen zeigte, befinden sich einige der an der Wechselwirkung mit dem Cytochrom beteiligten Reste in Regionen mit einem niedrigeren Konservierungsgrad. Allerdings spielen die ladungsneutralen Austausch von Glutamat- und Aspartatresten bei der elektrostatischen Interaktion lediglich eine untergeordnete Rolle und bieten somit keine nachhaltige Erklärung für die unterschiedliche Effektivität der Redoxsysteme.



**Abbildung 4.20:** Alignment der heterologen Redoxpartner Etp1<sup>skf</sup> und Adx<sub>4-108</sub>. Der Vergleich der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Clustal Omega (Goujon *et al.* 2010, Sievers *et al.* 2011). Die Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Rechenprogramm DSSP ermittelt (Kabsch und Sander 1983, Joosten *et al.* 2011) und die Abbildung wurde mit dem Programm ESPript (Gouet *et al.* 1999) erstellt. Die Sterne kennzeichnen die Aminosäuren, die laut Docking-Untersuchungen Salzbrücken zum CYP105A1 ausbilden.

Einen Hinweis auf die Ursache der Unterschiede in der Interaktion zwischen Adx<sub>4-108</sub>/CYP105A1 und Etp1<sup>skf</sup>/CYP105A1 geben die von ClusPro gefundenen Clustergrößen der Docking-Komplexe. Diese Größe wird für die Bewertung der Modelle herangezogen und dient als Maß ihrer Signifikanz. Der hier dargestellte Komplex des CYP105A1 mit dem Adx<sub>4-108</sub> hat eine Clustergröße von 202 Mitgliedern, während der im Ranking folgende Cluster lediglich 110 Mitglieder hat. Im Unterschied dazu beträgt die Mitgliederzahl des Clusters zwischen CYP105A1 und Etp1<sup>skf</sup> 295, gefolgt von 145 für den an zweiter Stelle gewichteten Komplex. Das große Gefälle zwischen den beiden wahrscheinlichsten Docking-Komplexen für die zwei Proteine spiegelt zum einen die physiologische Signifikanz der Modelle wider, zum anderen stimmt die deutlich höhere Clustergröße des CYP105A1/Etp1<sup>skf</sup>-Komplexes gut mit der beobachteten höheren Reduktionseffizienz dieses Redoxsystems überein. Hierfür könnten hydrophobe Aminosäuren an der Oberfläche der Proteine ursächlich sein. So findet

sich beispielsweise an Position 592 des Etp1<sup>skf</sup> ein Phenylalanin, welches in räumlicher Nähe zum Phenylalanin 350 des CYP105A1 liegt. An entsprechender Position im Adx<sub>4-108</sub> findet sich ein Tyrosinrest, der aufgrund seiner Hydroxygruppe einen größeren Abstand einnimmt. Somit könnten zusätzliche hydrophobe Interaktionen zwischen Etp1<sup>skf</sup> und CYP105A1 für die Ausbildung eines stabileren Komplexes verantwortlich sein. Denkbar wäre auch ein Einfluss dieser Wechselwirkungen beim Elektronentransport, denn für die Cytochrom-P450-Reduktase wurde eine Beteiligung hydrophober Aminosäuren an der Elektronenübertragung auf P450-Enzyme diskutiert (Nadler und Strobel 1988, Strobel *et al.* 1989).

## 4.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Interaktion und der Umsatz verschiedener Diterpen-Harzsäuren des Abietan- und Pimaran-Typs mit den bakteriellen Cytochromen CYP105A1 aus *Streptomyces griseolus* und CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* untersucht.

Nachdem kürzlich CYP106A2 als erste allylische Diterpen-Hydroxylase für Abietinsäure beschrieben wurde (Bleif *et al.* 2011), konnte das Substratspektrum dieses Enzyms in vorliegender Arbeit auf weitere Harzsäuren des Abietan- und Pimaran-Typs ausgedehnt werden. Ein weiterführender Forschungsansatz sind die Herstellung ausreichender Produktmengen dieser Umsetzungen für NMR-spektroskopische Analysen und die Untersuchung der Reaktionen hinsichtlich ihres Potentials für industrielle Biokonversionen. Eine wertvolle Grundlage zur biotechnologischen Nutzbarmachung des CYP106A2 liefert außerdem die hier erfolgte Strukturaufklärung des Enzyms. Dadurch wurde die Basis für Methoden wie rationales Proteindesign geschaffen, die eine Veränderung des Enzyms beispielsweise im Hinblick auf Substratelektivität und -spezifität erlauben. Ferner können anhand der Strukturdaten die an der Redoxpartner-Interaktion beteiligten Aminosäuren identifiziert werden, um über die gezielte Optimierung der Wechselwirkungsdomäne für heterologe Redoxpartner zur effektiveren Elektronenübertagung auf das Cytochrom einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms zu nehmen. In eine ähnliche Richtung zielte der bereits früher verfolgte Ansatz zur Herstellung von Fusionsproteinen aus CYP- und Redoxdomäne (Lisurek 2004). Losgelöst davon können die gewonnenen Strukturdaten außerdem als Vorlage für die Aufklärung weiterer ähnlicher P450-Strukturen über die Methode des molekularen Ersatzes dienen. Als Beispiel sei das CYP106A1 genannt, ein Cytochrom P450 aus *B. megaterium* MS941, das eine Sequenzidentität von 63 % zum CYP106A2 aufweist und ebenfalls ein hohes biotechnologisches Potential besitzt (Brill *et al.* 2013). Die erfolgreiche Ko-Kristallisation des CYP106A2 mit dem Substrat Abietinsäure lieferte außerdem einen Erklärungsansatz für das in den *in vitro* Untersuchungen beobachtete ungewöhnliche *spin shift* Verhalten des Cytochroms gegenüber diesem Substrat. Zur genaueren Untersuchung dieses Phänomens sind weitere Analysen nötig. Hierfür bieten sich NMR-Untersuchungen an, mit denen es möglich sein wird, Konformationsänderungen im aktiven Zentrum zu identifizieren und die strukturellen Einflüsse von Substratbindung und Änderung des Oxidationszustands zu lokalisieren.

Aber nicht nur hinsichtlich des CYP106A2 liefert die vorliegende Arbeit zukunftsweisende Ansätze. Die CYP105A1-katalysierten Umsätze der Harzsäuren erwiesen sich auch deshalb als interessante Alternative, weil sowohl die Hydroxylierung der Abietane an Position 15 als auch die 15,16-Epoxydierung der Pimarane auf chemischem Weg nur sehr schwer zu erreichen sind. Eine nähere Untersuchung der biologischen Eigenschaften dieser Produkte scheint vor allem vor dem Hintergrund der vielfältigen biologischen Wirkungen der Harzsäuren lohnenswert. Da beispielsweise die Isopimarsäure als potenter Öffner von BK-Kanälen beschrieben wurde, bieten sich speziell für das

Reaktionsprodukt 15,16-Epoxyisopimarsäure Untersuchungen zum Einfluss des eingeführten Sauerstoffs auf die Wirkung der Substanz als Kanalöffner an. Darüber hinaus besitzen Harzsäuren im Allgemeinen eine hohe Wassertoxizität. Diese Toxizität zeigt eine reverse Korrelation zur Löslichkeit der Substanzen: Während die am wenigsten lösliche Isopimarsäure die höchste Toxizität aufweist, ist die Dehydroabietinsäure mit einer deutlich höheren Löslichkeit am geringsten toxisch (Peng und Roberts 2000). Mittels Ermittlung der Wassertoxizität der durch die Einführung einer polaren Hydroxygruppe leichter löslichen Substanzen kann das Potential dieser Reaktion für die biologische Dekontaminierung von harzsäurehaltigen Industrieabwässern untersucht werden. Es existieren beispielsweise bereits detaillierte Studien über die Eignung des Bodenpilzes *Mortierella isabellina* zur Entgiftung von Abwässern aus Kraftzellstoffanlagen (Kutney *et al.* 1985, 1988). Untersuchungen dieser Zellen zeigten analog zum CYP105A1 eine Aktivität gegenüber der Isopropylgruppe von Abietin- und Dehydroabietinsäure und an der Vinylgruppe der Isopimarsäure (Kutney *et al.* 1981, 1982).

Das biotechnologische Anwendungspotential des CYP105A1 beschränkt sich jedoch nicht auf Diterpenoid-Substrate. Die strukturelle Vielfalt der bisher beschriebenen Substrate lässt vermuten, dass dieses Enzym in der Lage ist, eine große Zahl weiterer interessanter Substanzen umzuwandeln. Im Rahmen einer von mir betreuten Diplomarbeit erfolgte bereits ein Screening mit einer 502 Naturstoffe umfassenden Substanzbibliothek, wodurch das pentazyklische Triterpen Oleanolsäure als neues Substrat identifiziert wurde (Sagadin 2012). Für solche Arbeiten bilden die hohen Umsatzraten des in der vorliegenden Arbeit entwickelten Ganzzellsystems eine ausgezeichnete Grundlage, denn sie erlauben bereits im kleinen Reaktionsmaßstab eine ausreichende Produktbildung für NMR-spektroskopische Untersuchungen und somit die schnelle Identifizierung neuer Produkte von CYP105A1 katalysierten Umsätzen. Darüber hinaus erfüllt das entwickelte Ganzzellsystem mit einer rechnerischen Produktivität von  $0,764 \text{ g l}^{-1} \text{ Tag}^{-1}$  bereits die minimalen Prozessanforderungen biotechnologischer Verfahren zur Herstellung pharmazeutisch interessanter Produkte. Dabei sind die Möglichkeiten zur Steigerung der Umsatzraten noch nicht ausgeschöpft. So deuten die niedrigen Expressionsraten der *Arh1* und die rasche Abnahme der Produktbildung bei längeren Expressionszeiten darauf hin, dass die Expression und die Stabilität der Reduktase limitierende Faktoren für die Effizienz des Systems sind. Der in dem Kontrollexperiment ohne heterologe Redoxpartner beobachtete schwache Substratumsatz liefert darüber hinaus einen Hinweis darauf, dass das *E. coli* Reduktionssystem bestehend aus *Fpr* und *Fld* (Jenkins und Waterman 1994) ebenfalls in der Lage ist, Elektronen auf das CYP105A1 zu übertragen. Um diese Hypothese zu überprüfen und bei positivem Ergebnis eine weitere Steigerung der Produktbildung zu erzielen, könnte ein Vektor für die Überexpression der *E. coli* eigenen Enzyme *Fpr* und *Fld* konstruiert und die Produktbildungsrate mit diesem System untersucht werden. Durch die Überexpression der *Fpr* wurde bereits für andere

CYP-basierte Biokatalysatoren eine Steigerung der Produktbildungsrate erreicht (Ringle 2013). Um ferner den negativen Auswirkungen des Peptidantibiotikums Polymyxin B auf die Viabilität der Zellen entgegenzuwirken, besteht die Möglichkeit der Immobilisierung der Bakterien: Auf eine Verbesserung der thermalen Stabilität und auch eine verlängerte Lebensdauer verschiedener Biokatalysatoren durch den Einschluss von Enzymen und auch von ganzen Zellen in Alginat wurde bereits mehrfach hingewiesen (Lu und Mei 2007a).

Abschließend kann gesagt werden, dass durch die umfassenden Untersuchungen des Harzsäureumsatzes mit den bakteriellen Enzymen CYP105A1 und CYP106A2 eine Vielzahl neuer Erkenntnisse gewonnen wurden. Neben den molekularen Grundlagen der Substratbindung und der *in vitro* Charakterisierung von Bindung und Umsatz ausgewählter Harzsäuren mit CYP105A1 konnte ein Ganzzellsystem mit sehr vielversprechenden Umsatzraten entwickelt werden. Besonders hervorzuheben ist außerdem die erfolgreiche Strukturaufklärung des CYP106A2, die eine wertvolle Grundlage für weiterführende Arbeiten mit diesem biotechnologisch interessanten Protein darstellt.

## 5 Literatur

- Abad A, Arno M, Domingo LR, Zaragoza RJ (1985) Synthesis of (+)-Podocarp-8(14)-en-13-one and Methyl-(+)-13-oxo-Podocarp-8(14)-en-18-oate from Abietic Acid. *Tetrahedron* **41**:4937-4940.
- Ahlström MM, Zamora I (2008) Characterization of type II ligands in CYP2C9 and CYP3A4 *J Med Chem* **51**:1755-1763.
- Amann E, Ochs B, Abel KJ (1988) Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused Proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**:301-315.
- Anzai Y, Li S, Chaulagain MR, Kinoshita K, Kato F, Montgomery J, Sherman DH (2008) Functional analysis of MycI and MycG, cytochrome P450 enzymes involved in biosynthesis of mycinamicin macrolide antibiotics. *Chem Biol* **15**:950-959.
- Aoyama Y, Noshiro M, Gotoh O, Imaoka S, Funae Y, Kurosawa N, Horiuchi T, Yoshida Y (1996) Sterol 14-demethylase P450 (P45014DM\*) is one of the most ancient and conserved P450 species. *J Biochem* **119**:926-933.
- Appleby CA (1967) A soluble haemoprotein P-450 from nitrogen-fixing *Rhizobium* bacteroids. *Biochim Biophys Acta* **147**:399-402.
- Arreguy San Miguel B, Taran M, Picard P, Delmond B (1989) Stereoselective Synthesis of Methyl 15,16-Epoxyimmarates. *Synth Commun* **19**:979-986.
- Asciutto EK, Madura JD, Pochapsky SS, OuYang B, Pochapsky TC (2009) Structural and dynamic implications of an effector-induced backbone amide cis-trans isomerization in cytochrome P450cam. *J Mol Biol* **388**:801-814.
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**:10037-10041.
- Battye TG, Kontogiannis L, Johnson O, Powell HR, Leslie AG (2011) iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**:271-281.
- Berg A, Carlstrom K, Gustafsson JA, Ingelman-Sundberg M (1975) Demonstration of a cytochrome P-450-dependent steroid 15beta-hydroxylase in *Bacillus megaterium*. *Biochem Biophys Res Commun* **66**:1414-1423.
- Berg A, Gustafsson JA, Ingelman-Sundberg M (1976) Characterization of a cytochrome P-450 dependent steroid hydroxylase system present in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* **251**:2831-2838.
- Berg A, Ingelman-Sundberg M, Gustafsson JA (1979a) Isolation and characterization of cytochrome P-450meg. *Acta Biol Med Ger* **38**:333-344.
- Berg A, Ingelman-Sundberg M, Gustafsson JA (1979b) Purification and characterization of cytochrome P-450meg. *J Biol Chem* **254**:5264-5271.

- 
- Berg A, Rafter JJ (1981) Studies on the substrate specificity and inducibility of cytochrome P-450<sub>meq</sub>. *Biochem J* **196**:781-786.
- Bergfors T (2003) Seeds to crystals. *J Struct Biol* **142**:66-76.
- Bernhardt R, Makower A, Janig GR, Ruckpaul K (1984) Selective chemical modification of a functionally linked lysine in cytochrome P-450 LM2. *Biochim Biophys Acta* **785**:186-190.
- Bernhardt R, Pommerening K, Ruckpaul K (1987) Modification of carboxyl groups on NADPH-cytochrome P-450 reductase involved in binding of cytochromes c and P-450 LM2. *Biochem Int* **14**:823-832.
- 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**:128-145.
- Bleif S (2007) Identifizierung neuer potentieller Substrate von CYP106A2. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Bleif S, Hannemann F, Lisurek M, von Kries JP, Zapp J, Dietzen M, Antes I, Bernhardt R (2011) Identification of CYP106A2 as a regioselective allylic bacterial diterpene hydroxylase. *Chembiochem* **12**:576-582.
- Bleif S (2012) Von der Identifizierung neuer Substrate der 15 $\beta$ -Hydroxylase (CYP106A2) zur Cytochrom P450-Ganzzellkatalyse in *Bacillus megaterium*. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- 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**:1135-1146.
- Bohlmann J, Keeling CI (2008) Terpenoid biomaterials. *Plant J* **54**:656-669.
- Borchardt-Ott W (2008) Kristallographie – Eine Einführung für Naturwissenschaftler. 7. Auflage, Springer Verlag.
- 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* [Epub ahead of print].
- Brünger AT (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**:472-475.
- Bureik M, Schiffler B, Hiraoka Y, Vogel F, Bernhardt R (2002) Functional expression of human mitochondrial CYP11B2 in fission yeast and identification of a new internal electron transfer protein, etp1. *Biochemistry* **41**:2311-2321.
- Celik A, Flitsch SL, Turner NJ (2005) Efficient terpene hydroxylation catalysts based upon P450 enzymes derived from *actinomycetes*. *Org Biomol Chem* **3**:2930-2934.

- Chatterjee P, Kouzi SA, Pezzuto JM, Hamann MT (2000) Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Appl Environ Microbiol* **66**:3850-3855.
- Chen RR (2007) Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**:730-738.
- Chun YJ, 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**:17486-17500.
- Coghlan VM, Vickery LE (1991) Site-specific mutations in human ferredoxin that affect binding to ferredoxin reductase and cytochrome P450<sub>sc</sub>. *J Biol Chem* **266**:18606-18612.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst* **D50**:760-763.
- Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ (2004a) ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics* **20**:45-50.
- Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ (2004b) ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking *Nucleic Acids Research* **32**:W96-99.
- Cooper DY, Levin S, Narasimhulu S, Rosenthal O (1965) Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* **147**:400-402.
- Cross BE, Myers PL (1968) The bacterial transformation of abietic acid. *Biochem J* **108**:303-310.
- Croteau R, Kutcahn TM, Lewis NG (2000) Natural products. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan B, Gruissem W, Jones R). Rockville, MD: *American Society of Plant Physiologists* 1250–1318.
- Cupp-Vickery JR, Poulos TL (1995) Structure of cytochrome P450<sub>eryF</sub> involved in erythromycin biosynthesis. *Nat Struct Biol* **2**:144-153.
- Cupp-Vickery JR, Han O, Hutchinson CR, Poulos TL (1996) Substrate-assisted catalysis in cytochrome P450<sub>eryF</sub>. *Nat Struct Biol* **3**:632-637.
- DeLano WL (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. *DeLano Scientific*, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>
- Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I (2005) Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev* **105**:2253-2277.
- Dietrich JA, Yoshikuni Y, Fisher KJ, Woolard FX, Ockey D, McPhee DJ, Renninger NS, Chang MC, Baker D, Keasling JD (2009) A novel semi-biosynthetic route for artemisinin production using engineered substrate-promiscuous P450(BM3). *ACS Chem Biol* **4**:261-267.
- Downs AMR, Sansom JE (1999) Colophony allergy: a review. *Contact Dermatitis* **41**:305-310.
- Drenth J (1995) Principles of Protein X-ray Crystallography. 2<sup>nd</sup> Ed. *Springer Verlag*.

- Dror Y, Freeman A (1995) Stabilization of microbial cytochrome P-450 activity by creation of station-phase conditions in a continuously operated immobilized-cell reactor. *Appl Environ Microbiol* **61**:855-859.
- Ekroos M, Sjögren T (2006) Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:13682-13687.
- Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**:2126-2132.
- Evans PR (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Cryst* **D62**:72-82.
- Ewen KM, Schiffler B, Uhlmann-Schiffler H, Bernhardt R, Hannemann F (2008) The endogenous adrenodoxin reductase-like flavoprotein arh1 supports heterologous cytochrome P450-dependent substrate conversions in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* **8**:432-441.
- Ewen KM (2009) *In vitro* Untersuchung potentieller Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* So ce56. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken
- Ewen KM, Kleser M, Bernhardt R (2011) Adrenodoxin: the archetype of vertebrate-type [2Fe-2S] cluster ferredoxins. *Biochim Biophys Acta* **1814**:111-125.
- Estabrook RW, Cooper DY, Rosenthal O (1963) The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem Z* **338**:741-755.
- Feio SS, Franca S, Silva AM, Gigante B, Roseiro JC, Marcelo Curto MJ (2002) Antimicrobial activity of methyl cis-7-oxo deisopropyldehydroabietate on *Botrytis cinerea* and *Lophodermium seeditiosum*: ultrastructural observations by transmission electron microscopy. *J Appl Microbiol* **93**:765-771.
- Fernández MA, Tornos MP, García MD, De las Heras B, Villar AM, Sáenz MT (2001) Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from *Pimenta racemosa* var. *grisea*. *J Pharm Pharmacol* **53**:867-872.
- Fried J, Thoma RW, Gerke JR, Herz JE, Donin MN, Perlman D (1952) Oxidation of steroids by microorganisms. II. Hydroxylation in position 11 and synthesis of cortisone from Reichstein's compound S. *J Am Chem Soc* **74**:3962-3963.
- Galindo E, Salcedo G (1996) Detergents improve xanthan yield and polymer quality in cultures of *Xanthomonas campestris*. *Enzyme Microb Technol* **19**:145-149.
- Gavira C, Höfer R, Lesot A, Lambert F, Zucca J, Werck-Reichhart D (2013) Challenges and pitfalls of P450-dependent (+)-valencene bioconversion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* **18**:25-35.
- Geren LM, O'Brien P, Stonehuerner J, Millett F (1984) Identification of specific carboxylate groups on adrenodoxin that are involved in the interaction with adrenodoxin reductase. *J Biol Chem* **259**:2155-2160.
- Geren LM, Tuls J, O'Brien P, Millett F, Peterson JA (1986) The involvement of carboxylate groups of putidaredoxin in the reaction with putidaredoxin reductase. *J Biol Chem* **261**:15491-15495.

- Gershenzon J, Dudareva N (2007) The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol* **3**:408-414.
- Ghosh D, Lo J, Morton D, Valette D, Xi J, Griswold J, Hubbel S, Eqbuta C, Jiang W, An J, Davies HM (2012) Novel aromatase inhibitors by structure-guided design. *J Med Chem* **55**:8464-8476.
- Gigante B, Santos C, Silva AM, Curto MJ, Nascimento MS, Pinto E, Pedro M, Cerqueira F, Pinto MM, Duarte MP, Laires A, Rueff J, Goncalves J, Pegado MI, Valdeira ML (2003) Catechols from abietic acid synthesis and evaluation as bioactive compounds. *Bioorg Med Chem* **11**:1631-1638.
- Girhard M, Klaus T, Khatri Y, Bernhardt R, Urlacher VB (2010) Characterization of the versatile monooxygenase CYP109B1 from *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**:595-607.
- Gotoh O (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* **267**:83-90.
- Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Métoz F (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**:305-308.
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* **38**:W695-699.
- Grinberg AV, Hannemann F, Schiffler B, Müller J, Heinemann U, Bernhardt R (2000) Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins* **40**:590-612.
- Groenhof AR (2007) Theoretical investigation of the hydroxylation mechanism by cytochromes P450. *Dissertation*, Freie Universität Amsterdam, Amsterdam.
- Gunsalus IC, Ganguli BN, Katagiri M, Tsibris JC, Debrunner P, Frauenfelder H (1968) Oxygenation: a specific soluble cytochrome p-450 coupled enzyme complex. *Science* **160**:438-439.
- Haberkorn L, Mutterer V, Giménez Arnau E, Lepoittevin J (2001) Conversion of a Cyclic  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Ketone into a Tertiary Dienyl Hydroperoxide: Application to the First Hemisynthesis of 15-Hydroperoxyabietic Acid. *Synlett* **11**:1723-1726.
- Haines DC, Tomchick DR, Machius M, Peterson JA (2001) Pivotal role of water in the mechanism of P450BM-3. *Biochemistry* **40**:13456-13465.
- Hamberger B, Bohlmann J (2006) Cytochrome P450 mono-oxygenases in conifer genomes: discovery of members of the terpenoid oxygenase superfamily in spruce and pine. *Biochem Soc Trans* **34**:1209-1214.
- Hamberger B, Ohnishi T, Hamberger B, Séguin A, Bohlmann J (2011) Evolution of diterpene metabolism: Sitka spruce CYP720B4 catalyzes multiple oxidations in resin acid biosynthesis of conifer defense against insects. *Plant Physiol* **157**:1677-1695.
- Hannemann F, Rottmann M, Schiffler B, Zapp J, Bernhardt R (2001) The loop region covering the iron-sulfur cluster in bovine adrenodoxin comprises a new interaction site for redox partners. *J Biol Chem* **276**:1369-1375.

- 
- Hannemann F, Virus C, Bernhardt R (2006) Design of an *Escherichia coli* system for whole cell mediated steroid synthesis and molecular evolution of steroid hydroxylases. *J Biotechnol* **124**:172-181.
- Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, Bernhardt R (2007) Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta* **1770**:330-344.
- Harder PA, O'Keefe DP, Romesser JA, Leto KJ, Omer CA (1991) Isolation and characterization of *Streptomyces griseolus* deletion mutants affected in cytochrome P-450-mediated herbicide metabolism. *Mol Gen Genet* **227**:238-244.
- Hasemann CA, Ravichandran KG, Peterson JA, Deisenhofer J (1994) Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* **236**:1169-1185.
- Hasemann CA, Kurumbail RG, Boddupalli SS, Peterson JA, Deisenhofer J (1995) Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* **3**:41-62.
- Hausen BM, Böurries M, Budianto E, Krohn K (1993) Contact allergy due to colophony. (IX). Sensitization studies with further products isolated after oxidative degradation of resin acids and colophony. *Contact Dermatitis* **29**:234-240.
- Hayashi K, Sugimoto H, Shinkyo R, Yamada M, Ikeda S, Ikushiro S, Kamakura M, Shiro Y, Sakaki T (2008) Structure-based design of a highly active vitamin D hydroxylase from *Streptomyces griseolus* CYP105A1. *Biochemistry* **47**:11964-11972.
- Hildebrandt A, Remmer H, Estabrook RW (1968) Cytochrome P-450 of liver microsomes: one pigment or many. *Biochem Biophys Res Commun* **30**:607-612.
- Hobbs JD, Shelnett JA (1995) Conserved nonplanar heme distortions in cytochromes c. *J Protein Chem* **14**:19-25.
- Huey R, Morris GM, Olson AJ, Goodsell DS (2007) A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J Comput Chem* **28**:1145-1152.
- Hussain HA, Ward JM (2003) Enhanced heterologous expression of two *Streptomyces griseolus* cytochrome P450s and *Streptomyces coelicolor* ferredoxin reductase as potentially efficient hydroxylation catalysts. *Appl Environ Microbiol* **69**:373-382.
- Imai M, Shimada H, Watanabe Y, Matsushima-Hibiya Y, Makino R, Koga H, Horiuchi T, Ishimura Y (1989) Uncoupling of the cytochrome P-450cam monooxygenase reaction by a single mutation, threonine-252 to alanine or valine: possible role of the hydroxy amino acid in oxygen activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:7823-7827.
- Imaizumi Y, Sakamoto K, Yamada A, Hotta A, Ohya S, Muraki K, Uchiyama M, Ohwada T (2002) Molecular basis of pimarane compounds as novel activators of large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel alpha-subunit. *Mol Pharmacol* **62**:836-846.
- Incardona MF, Bourenkov GP, Levik K, Pieritz RA, Popov AN, Svensson O (2009) EDNA: a framework for plugin-based applications applied to X-ray experiment online data analysis. *J Synchrotron Radiat* **16**:872-879.
- Jancarik J, Kim SH (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J Appl Cryst* **24**:409-411.
-

- 
- Janocha S, Bichet A, Zöllner A, Bernhardt R (2011) Substitution of lysine with glutamic acid at position 193 in bovine CYP11A1 significantly affects protein oligomerization and solubility but not enzymatic activity. *Biochim Biophys Acta* **1814**:126-131.
- Janocha S, Zapp J, Hutter M, Kleser M, Bohlmann J, Bernhardt R (2013a) Resin acid conversion with CYP105A1: An enzyme with potential for the production of pharmaceutically relevant diterpenoids. *ChembioChem* **14**:467-473.
- Janocha S, Bernhardt R (2013b) Design and characterization of an efficient CYP105A1-based whole-cell biocatalyst for the conversion of resin acid diterpenoids in permeabilized *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:7639-7649.
- Jefcoate CR (1978) Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy. *Methods Enzymol* **52**:258-279.
- Jenkins CM, Waterman MR (1994) Flavodoxin and NADPH-flavodoxin reductase from *Escherichia coli* support bovine cytochrome P450c17 hydroxylase activities. *J Biol Chem* **269**:27401-27408.
- Jensen NB, Zagrobelny M, Hjernø K, Olsen CE, Houghton-Larsen J, Borch J, Møller BL, Bak S (2011) Convergent evolution in biosynthesis of cyanogenic defence compounds in plants and insects. *Nat Commun* **2**:273.
- Jentzen W, Ma JG, Shelnutz JA (1998) Conservation of the conformation of the porphyrin macrocycle in hemoproteins. *Biophys J* **74**:753-763.
- Joosten RP, te Beek TA, Krieger E, Hekkelman ML, Hooft RW, Schneider R, Sander C, Vriend G (2011) A series of PDB related databases for everyday needs. *Nucleic Acids Res* **39**:D411-419.
- Julsing MK, Cornelissen S, Bühler B, Schmid A (2008) Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts?. *Curr Opin Chem Biol* **12**:177-186.
- Kabsch W, Sander C (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**:2577-2637.
- Kabsch W (2010) XDS. *Acta Cryst D* **66**:125-132.
- Karlberg AT, Bohlinder K, Boman A, Hacksell U, Hermansson J, Jacobsson S, Nilsson JL (1988) Identification of 15-hydroperoxyabietic acid as a contact allergen in Portuguese colophony. *J Pharm Pharmacol* **40**:42-47.
- Kassner RJ (1973) A theoretical model for the effects of local nonpolar heme environments on the redox potentials in cytochromes. *J Am Chem Soc* **95**:2674-2677.
- Katagiri M, Ganguli BN, Gunsalus IC (1968) A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation. *J Biol Chem* **243**:3543-3546.
- Keeling CI, Bohlmann J (2006a) Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol* **170**:657-675.
- Keeling CI, Bohlmann J (2006b) Diterpene resin acids in conifers. *Phytochemistry* **67**:2415-2423.

- Kleser M (2011) Etablierung einer Biotransformation zur stereoselektiven Hydroxylierung der Sulfonylharnstoffe Glimepirid und Glibenclamid sowie Vitamin D<sub>3</sub> 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**:405-412.
- Klingenberg M (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **75**:376-386.
- Koga H, Sagara Y, Yaoi T, Tsujimura M, Nakamura K, Sekimizu K, Makino R, Shimada H, Ishimura Y, Yura K (1993) Essential role of the Arg112 residue of cytochrome P450cam for electron transfer from reduced putidaredoxin. *FEBS Lett.* **331**:109-113.
- Koshland DE (1958) Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **44**:98-104.
- Kozakov D, Hall DR, Beglov D, Brenke R, Comeau SR, Shen Y, Li K, Zheng J, Vakili P, Paschalidis IC, Vajda S (2010) Achieving reliability and high accuracy in automated protein docking: ClusPro, PIPER, SDU, and stability analysis in CAPRI rounds 13-19. *Proteins* **78**:3124-3130.
- Kozakov D, Brenke R, Comeau SR, Vajda S (2006) PIPER: An FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins* **65**:392-406.
- Krissinel E, Henrick K (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**:2256-2268.
- Krissinel E, Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* **372**:774-797.
- Kumaki K, Sato M, Kon H, Nebert DW (1978) Correlation of type I, type II, and reverse type I difference spectra with absolute changes in spin state of hepatic microsomal cytochrome P-450 iron from five mammalian species. *J Biol Chem* **253**:1048-1058.
- Kuper J, Wong TS, Roccatano D, Wilmanns M, Schwaneberg U (2007) Understanding a mechanism of organic cosolvent inactivation in heme monooxygenase P450 BM-3. *J Am Chem Soc* **129**:5786-5787.
- Kutney JP, Singh M, Dimitriadis E, Hewitt GM, Salisbury PJ, Worth BR, Servizi JA, Martens DW, Gordon RW (1981) Studies Related to Biological Detoxification of Kraft Pulp Mill Effluent. II. The Biotransformation of Isopimaric Acid with *Mortierella isabellina*. *Can J Chem* **59**:3350-3355.
- Kutney JP, Dimitriadis E, Hewitt GM, Singh M, Worth BR (1982) Studies Related to Biological Detoxification of Kraft Pulp Mill Effluent. III. The Biodegradation of Abietic Acid with *Mortierella isabellina*. *Helv Chim Acta* **65**:661-670.
- Kutney JP, Choi LS, Hewitt GM, Salisbury PJ, Singh M (1985) Biotransformation of dehydroabietic acid with resting cell suspensions and calcium alginate-immobilized cells of *Mortierella isabellina*. *Appl Environ Microbiol* **49**:96-100.
- Kutney JP, Berset JD, Hewitt GM, Singh M (1988) Biotransformation of Dehydroabietic, Abietic, and Isopimaric Acids by *Mortierella isabellina* Immobilized in Polyurethane Foam. *Appl Environ Microbiol* **54**:1015-1022.

- 
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lamb DC, Ikeda H, Nelson DR, Ishikawa J, Skaug T, Jackson C, Omura S, Waterman MR, Kelly SL (2003) Cytochrome P450 complement (CYPome) of the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* and comparison to that of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochem Biophys Res Commun* **307**:610-619.
- Lamb DC, Lei L, Warrilow AG, Lepesheva GI, Mullins JG, Waterman MR, Kelly SL (2009) The first virally encoded cytochrome p450. *J Virol* **83**:8266-8269.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**:2947-2948.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst*, **26**:283-291.
- Leach JM, Thakore AN (1977) Compounds toxic to fish in pulp mill waste streams. *Progr Water Tech* **9**:787-798.
- Lepoittevin JP, Karlberg AT (1994) Interactions of allergenic hydroperoxides with proteins: a radical mechanism? *Chem Res Toxicol* **7**:130-133.
- Leslie AGW, Powell HR (2007) Processing Diffraction Data with Mosflm. In: *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography* **245**:41-51.
- Li H, Poulos TL (1995) Modeling protein-substrate interactions in the heme domain of cytochrome P450(BM-3). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **51**:21-32.
- Li H, Poulos TL (2004) Crystallization of cytochromes P450 and substrate-enzyme interactions. *Curr Top Med Chem* **4**:1789-1802.
- Lim YR, Eun CY, Park HG, Han S, Han JS, Cho KS, Chun YJ, Kim D (2010) Regioselective oxidation of lauric acid by CYP119, an orphan cytochrome P450 from *Sulfolobus acidocaldarius*. *J Microbiol Biotechnol* **20**:574-578.
- Lipscomb JD, Harrison JE, Dus KM, Gunsalus IC (1978) Cytochrome P450 cam: SS- dimer and -SH derivative reactivities. *Biochem Biophys Res Commun* **83**:771-778.
- Liss SN, Bicho PA, Saddler JN (1997) Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview. *Can J Microbiol* **75**:599-611.
- Lisurek M (2004) Homologie-Modellierung und Protein-Engineering der Steroid-15 $\beta$ -Hydroxylase (CYP106A2) aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- 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**:1439-1449.
- Loughlin WA (2000) Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology* **74**:49-62.
-

- Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, de Bakker PIW, Word JM, Prisant MG, Richardson JS, Richardson DC (2003) Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins* **50**:437-450.
- Lu Y, Mei L (2007a) Production of Indigo by Immobilization of *E. coli* BL21 (DE3) Cells in Calcium-Alginate Gel Capsules. *Chin J Chem Eng* **15**:387-390.
- Lu Y, Mei L (2007b) Co-expression of P450 BM3 and glucose dehydrogenase by recombinant *Escherichia coli* and its application in an NADPH-dependent indigo production system. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**:247-253.
- Luft JR, DeTitta GT (1999) A method to produce microseed stock for use in the crystallization of biological macromolecules. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**:988-993.
- Martínez-Gómez K, Flores N, Castañeda HM, Martínez-Batallar G, Hernández-Chávez G, Ramírez OT, Gosset G, Encarnación S, Bolivar F (2012) New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. *Microb Cell Fact* **11**:46.
- Martinis SA, Atkins WM, Stayton PS, Sligar SG (1989) A conserved residue of cytochrome P-450 is involved in heme-oxygen stability and activation. *J Am Chem Soc* **111**:9252-9253.
- Maruya N, Hiwatashi A, Ichikawa Y, Yamano T (1983) Purification and characterization of renal ferredoxin from bovine renal mitochondria. *J Biochem* **93**:1239-1247.
- Massa W (2009) Kristallstrukturbestimmung. 6. Auflage, Vieweg + Teubner.
- Mast N, Charvet C, Pikuleva IA, Stout CD (2010) Structural basis of drug binding to CYP46A1, an enzyme that controls cholesterol turnover in the brain. *J Biol Chem* **285**:31783-31795.
- Matthews BW (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* **33**:491-497.
- McAleer WJ, Jacob TA, Turnbull LB, Schoenewaldt EF, Stoudt TH (1958) Hydroxylation of progesterone by *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *Arch Biochem Biophys* **73**:127-130.
- McFerrin MB, Snell EH (2002) The development and application of a method to quantify the quality of cryoprotectant solutions using standard area-detector X-ray images. *J Appl Cryst* **35**:538-545.
- Messerschmidt A (2007) X-ray crystallography of biomacromolecules – A practical guide. 1<sup>st</sup> Edition. Wiley-VCH.
- Michielsen M, Meijer E, Wijffels R, Tramper J, Beeftink H (1998) Kinetics of d-Malate Production by Permeabilized *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Enzyme and Microbial Technology* **22**:621-628.
- Modi S, Primrose WU, Boyle JM, Gibson CF, Lian LY, Roberts GC (1995) NMR studies of substrate binding to cytochrome P450 BM3: Comparisons to cytochrome P450 cam. *Biochemistry* **34**:8982-8988.
- Modi S, Sutcliffe MJ, Primrose WU, Lian LY, Roberts GC (1996) The catalytic mechanism of cytochrome P450 BM3 involves a 6 Å movement of the bound substrate on reduction. *Nat Struct Biol* **3**:414-417.

- 
- Mohn WW, Wilson AE, Bicho P, Moore ER (1999) Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acids. *Syst Appl Microbiol* **22**:68-78.
- Montemiglio LC, Gianni S, Vallone B, Savino C (2010) Azole drugs trap cytochrome P450 EryK in alternative conformational states. *Biochemistry* **49**:9199-9206.
- Morgan CA, Wyndham RC (2002) Characterization of tdt genes for the degradation of tricyclic diterpenes by *Pseudomonas diterpeniphila* A19-6a. *Can J Microbiol* **48**:49-59.
- Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem* **19**:1639-1662.
- Mouri T, Michizoe J, Ichinose H, Kamiya N, Goto M (2006) A recombinant *Escherichia coli* whole cell biocatalyst harbouring a cytochrome P450cam monooxygenase system coupled with enzymatic cofactor regeneration. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**:514-520.
- Murataliev MB, Feyereisen R (2000) Functional interactions in cytochrome P450BM3. Evidence that NADP(H) binding controls redox potentials of the flavin cofactors. *Biochemistry* **39**:12699-12707.
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**:240-255.
- Nadler SG, Strobel HW (1988) Role of electrostatic interactions in the reaction of NADPH-cytochrome P-450 reductase with cytochromes P-450. *Arch Biochem Biophys* **261**:418-429.
- Nagano S, Li H, Shimizu H, Nishida C, Ogura H, Ortiz de Montellano PR, Poulos TL (2003) Crystal structures of epothilone D-bound, epothilone B-bound, and substrate-free forms of cytochrome P450epoK. *J Biol Chem* **278**:44886-44893.
- Nakamura K, Horiuchi T, Yasukochi T, Sekimizu K, Hara T, Sagara Y (1994) Significant contribution of arginine-112 and its positive charge of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450cam in the electron transport from putidaredoxin. *Biochim Biophys Acta* **1207**:40-48.
- 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**:7160-7169.
- Nebert DW, Gonzalez FJ (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* **56**:945-993.
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K, Nebert DW (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* **12**:1-51.
- Nelson DR (1999) Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* **369**:1-10.
- Nelson DR (2009) The cytochrome P450 homepage. *Hum Genomics* **4**:59-65.
- Nelson DR (2013) A world of cytochrome P450s. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **368**:20120430.
-

- 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**:1161-1166.
- Nickerson DP, Wong LL (1997) The dimerization of *Pseudomonas putida* cytochrome P450cam: practical consequences and engineering of a monomeric enzyme. *Protein Eng* **10**:1357-1361.
- Noordermeer MA, Veldink GA, Vliegthart JF (2001) Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome p450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *Chembiochem* **2**:494-504.
- Ohtsu H, Tanak R, In Y, Matsunaga S, Tokuda H, Nishino H (2001) Abietane diterpenoids from the cones of *Larix kaempferi* and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation. *Planta Med* **67**:55-60.
- O'Keefe DP, Romesser JA, Leto KJ (1987) Plant and Bacterial Cytochromes P-450: Involvement in Herbicide Metabolism. *Recent Adv Phytochem* **21**:151-173.
- O'Keefe DP, Romesser JA, Leto KJ (1988) Identification of constitutive and herbicide inducible cytochromes P-450 in *Streptomyces griseolus*. *Arch Microbiol* **149**:406-412.
- O'Keefe DP, Gibson KJ, Emptage MH, Lenstra R, Romesser JA, Litle PJ, Omer CA (1991) Ferredoxins from two sulfonylurea herbicide monooxygenase systems in *Streptomyces griseolus*. *Biochemistry* **30**:447-455.
- O'Keefe DP, Tepperman JM, Dean C, Leto KJ, Erbes DL, Odell JT (1994) Plant Expression of a Bacterial Cytochrome P450 That Catalyzes Activation of a Sulfonylurea Pro-Herbicide. *Plant Physiol* **105**:473-482.
- Olaofe OA, Fenner CJ, Gudimanchi RK, Smit MS, Harrison ST (2013) The influence of microbial physiology on biocatalyst activity and efficiency in the terminal hydroxylation of n-octane using *Escherichia coli* expressing the alkane hydroxylase, CYP153A6. *Microb Cell Fact* **12**:8.
- Omer CA, Lenstra R, Litle PJ, Dean C, Tepperman JM, Leto KJ, Romesser JA, O'Keefe DP (1990) Genes for two herbicide-inducible cytochromes P-450 from *Streptomyces griseolus*. *J Bacteriol* **172**:3335-3345.
- Omura T, Sato R (1962) A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* **237**:1375-1376.
- Omura T, Sato R (1963) Fractional solubilization of haemoproteins and partial purification of carbon monoxide-binding cytochrome from liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* **71**:224-226.
- Omura T, Sato R (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* **239**:2370-2378.
- Omura T, Sato R (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties. *J Biol Chem* **239**:2379-2385.
- Ortiz de Monellano PR (2004) Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry. *Kluwer Academic/Plenum Publisher* 3<sup>rd</sup> Edition
- Ortiz de Montellano PR (2010) Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem Rev* **110**:932-948.

- Oshima R, Fushinobu S, Su F, Zhang L, Takaya N, Shoun H (2004) Structural evidence for direct hydride transfer from NADH to cytochrome P450<sub>nor</sub>. *J Mol Biol* **342**:207-217.
- OuYang B, Pochapsky SS, Dang M, Pochapsky TC (2008) A functional proline switch in cytochrome P450<sub>cam</sub>. *Structure* **16**:916-923.
- Park JW, Lee JK, Kwon TJ, Yi DH, Kim YJ, Moon SH, Suh HH, Kang SM, Park YI (2003) Bioconversion of compactin into pravastatin by *Streptomyces sp.* *Biotechnol Lett* **25**:1827-1831.
- Park YM, Choi ES, Rhee SK (1994) Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by *Gluconobacter suboxydans* cells immobilized in calcium alginate. *Biotechnol Letters* **16**:345-348.
- Peng G, Roberts JC (2000) Solubility and toxicity of resin acids. *Wat Res* **34**:2779-2785.
- Peterson DH, Murray HC, Eppstein SH, Reineke LM, Weintraub A, Meister PD, Leigh HM (1952) Microbiological Transformations of Steroids. I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. *J Am Chem Soc* **74**:5933-5936.
- Peterson JA, Graham SE (1998) A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes P450. *Structure* **6**:1079-1085.
- Pochapsky TC, Lyons TA, Kazanis S, Arakaki T, Ratnaswamy G (1996) A structure-based model for cytochrome P450<sub>cam</sub>-putidaredoxin interactions. *Biochimie* **78**:723-733.
- Pochapsky TC, Kazanis S, Dang M (2010) Conformational plasticity and structure/function relationships in cytochromes P450. *Antioxid Redox Signal* **13**:1273-1296.
- 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**:3915-3923.
- Porter TD, Larson JR (1991) Expression of mammalian P450s in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **206**:108-116.
- Poulos TL, Finzel BC, Gunsalus IC, Wagner GC, Kraut J (1985) The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J Biol Chem* **260**:16122-16130.
- Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ (1986) Crystal structure of substrate-free *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Biochemistry* **25**:5314-5322.
- Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ (1987) High-resolution crystal structure of cytochrome P450<sub>cam</sub>. *J Mol Biol* **195**:687-700.
- Poulos TL, Howard AJ (1987) Crystal structures of metyrapone- and phenylimidazole-inhibited complexes of cytochrome P-450<sub>cam</sub>. *Biochemistry* **26**:8165-8174.
- Prabhune AA, Rao BS, Pundle AV, Sivaraman H (1992) Immobilization of permeabilized *Escherichia coli* cells with penicillin acylase activity. *Enzyme Microb Technol* **14**:161-163.
- Presnell SR, Cohen FE (1989) Topological distribution of four-alpha-helix bundles. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:6592-6596.

- Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V (1963) Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol* **7**:95-99.
- Rauschenbach R, Isernhagen M, Noeske-Jungblut C, Boidol W, Siewert G (1993) Cloning, sequencing and expression of the gene for cytochrome P450<sub>meg</sub>, the steroid-15 beta-monooxygenase from *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Mol Gen Genet* **241**:170-176.
- Ravikanth M, Chandrashekar TK (1995) Nonplanar Porphyrins and their biological relevance: ground and excited state dynamics. In: *Structure and bonding*. **82**:105-188.
- Read RJ, Schierbeek AJ (1988) A phased translation function. *J Appl Cryst* **21**:490-495.
- Rhodes G (2000) Crystallography made crystal clear: A guide for users of macromolecular models. 2<sup>nd</sup> Edition. *Academic Press*.
- 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* **97**:7741-7754.
- Ringle M (2013) Charakterisierung ausgewählter Cytochrome P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56 – Neue potentielle Biokatalysatoren. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MC, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R, Keasling JD (2006) Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* **440**:940-943.
- Robin A, Roberts GA, Kisch J, Sabbadin F, Grogan G, Bruce N, Turner NJ, Flitsch SL (2009) Engineering and improvement of the efficiency of a chimeric [P450<sub>cam</sub>-RhFR<sub>ed</sub> reductase domain] enzyme. *Chem Commun* **2009**:2478-2480.
- Romesser JA, Brown HM (1985) *Abstr Ann Mtg Am Soc Microbiol*, p. 248.
- Romesser JA, O'Keefe DP (1986) Induction of cytochrome P-450-dependent sulfonylurea metabolism in *Streptomyces griseolus*. *Biochem Biophys Res Commun* **140**:650-659.
- Ruinatscha R, Höllrigl V, Otto K, Schmid A (2006) Productivity of selective electroenzymatic reduction and oxidation reactions: theoretical and practical considerations. *Adv Synth Catal* **348**:2015-2026.
- Ruijsenaars HJ, Sperling EM, Wiegerinck PH, Brands FT, Wery J, De Bont JA (2007) Testosterone 15beta-hydroxylation by solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12. *J Biotechnol* **131**:205-208.
- Rupp B (2010) Biomolecular Crystallography – Principles, Practice, and Application to Structural Biology. 1<sup>st</sup> Ed. *Garland Science*.
- 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**:216-219.
- Sabbadin F, Hyde R, Robin A, Hilgarth EM, Delenne M, Flitsch S, Turner N, Grogan G, Bruce NC (2010) LICRED: a versatile drop-in vector for rapid generation of redox-self-sufficient cytochrome P450s. *Chembiochem* **11**:987-994.

- Sagadin T (2012) Untersuchung von CYP105A1 und CYP106A2 zur Erweiterung des Substratspektrums und Charakterisierung ausgewählter Prolinmutanten. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes.
- 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**:627-630.
- 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**:249-256.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, CSHL, Cold Spring Harbor.
- Sanner MF (1999) Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model* **17**:57-61.
- Sato T, Hoshino H, Yoshida S, Nakajima M, Hoshino T (2011) Bifunctional triterpene/sesquiterpene cyclase: tetraprenyl- $\beta$ -curcumene cyclase is also squalene cyclase in *Bacillus megaterium*. *J Am Chem Soc* **133**:17540-17543.
- Sawada N, Sakaki T, Yoneda S, Kusudo T, Shinkyo R, Ohta M, Inouye K (2004) Conversion of vitamin D<sub>3</sub> to 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> by *Streptomyces griseolus* cytochrome P450SU-1. *Biochem Biophys Res Commun* **320**:156-164.
- Schenkman JB, Remmer H, Estabrook RW (1967) Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol Pharmacol* **3**:113-123.
- Schenkman JB, Jansson I (1998) Spectral analysis of cytochrome P450; in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 107; Cytochrome P450 Protocols (Eds: I. R. Phillips, E. A. Shephard), Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp. 25-33.
- Schewe H, Kaup BA, Schrader J (2008) Improvement of P450(BM-3) whole-cell biocatalysis by integrating heterologous cofactor regeneration combining glucose facilitator and dehydrogenase in *E. coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**:55-65.
- 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**:1229-1237.
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**:258-268.
- Schmitz D, Zapp J, Bernhardt R (2012) Hydroxylation of the triterpenoid dipterocarpol with CYP106A2 from *Bacillus megaterium*. *FEBS J* **279**:1663-1674.
- Schmitz D (2013) Hydroxylierung bioaktiver Naturstoffe mit CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* – Screening, Biokatalyse und Produktcharakterisierung. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Schroer K, Mackfeld U, Tan IA, Wandrey C, Heuser F, Bringer-Meyer S, Weckbecker A, Hummel W, Dausmann T, Pfaller R, Liese A, Lütz S (2007) Continuous asymmetric ketone reduction processes with recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **132**:438-444.

- Schroer K, Zelic B, Oldiges M, Lütz S (2009) Metabolomics for biotransformations: Intracellular redox cofactor analysis and enzyme kinetics offer insight into whole cell processes. *Biotechnol Bioeng* **104**:251-260.
- Schüttelkopf AW, van Aalten DM (2004) PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**:1355-1363.
- Shiro Y, Fujii M, Iizuka T, Adachi S, Tsukamoto K, Nakahara K, Shoun H (1995) Spectroscopic and kinetic studies on reaction of cytochrome P450nor with nitric oxide. Implication for its nitric oxide reduction mechanism. *J Biol Chem* **270**:1617-1623.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins D (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**:539.
- Simgen B (2000) Die Steroid-15 $\beta$ -Hydroxylase (CYP106A2) aus *Bacillus megaterium*. Heterologe Expression und Charakterisierung von I-Helix Mutanten. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Sladek NE, Mannering GJ (1969) Induction of drug metabolism. II. Qualitative differences in the microsomal N-demethylating systems stimulated by polycyclic hydrocarbons and by phenobarbital. *Mol Pharmacol* **5**:186-199.
- Smith DJ, Martin VJ, Mohn WW (2004) A cytochrome P450 involved in the metabolism of abietane diterpenoids by *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9. *J Bacteriol* **186**:3631-3639.
- Smith DJ, Patrauchan MA, Florizone C, Eltis LD, Mohn WW (2008) Distinct roles for two CYP226 family cytochromes P450 in abietane diterpenoid catabolism by *Burkholderia xenovorans* LB400. *J Bacteriol* **190**:1575-1583.
- Söderberg TA, Gref R, Holm S, Elmros T, Hallmans G (1990) Antibacterial activity of rosin and resin acids *in vitro*. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* **24**:199-205.
- Song X, Jentzen W, Jia S, Jaquinod L, Nurco DJ, Medforth CJ, Smith KM, Shelnut JA (1996) Representation of Nonplanar Structures of Nickel(II) 5,15-Disubstituted Porphyrins in Terms of Displacements along the Lowest-Frequency Normal Coordinates of the Macrocyclic. *J Am Chem Soc* **118**:12975-12988.
- Sono M, Roach MP, Coulter ED, Dawson JH. Heme-Containing Oxygenases (1996) *Chem Rev* **96**:2841-2888.
- Stayton PS, Sligar SG (1990) The cytochrome P-450cam binding surface as defined by site-directed mutagenesis and electrostatic modeling. *Biochemistry* **29**:7381-7386.
- Straathof AJ, Panke S, Schmid A (2002) The Production of fine chemicals by biotransformation. *Curr Opin Biotechnol* **13**:548-556.
- Strobel HW, Nadler SG, Nelson DR (1989) Cytochrome P-450: cytochrome P-450 reductase interactions. *Drug Metab Rev* **20**:519-533.
- Stura EA, Wilson IA (1990) Analytical and production seeding techniques. *Methods: A companion to methods in enzymology* **1**:38-49.

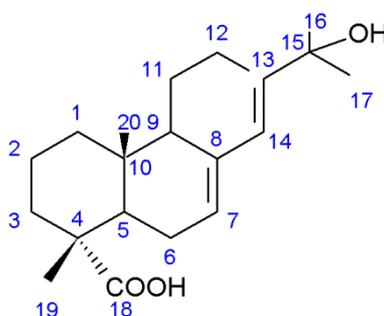
- 
- Stura EA, Wilson IA (1991) Applications of the streak seeding technique in protein crystallization. *J Cryst Growth* **110**:270-282.
- Sugimoto H, Shinkyo R, Hayashi K, Yoneda S, Yamada M, Kamakura M, Ikushiro S, Shiro Y, Sakaki T (2008) Crystal structure of CYP105A1 (P450SU-1) in complex with  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Biochemistry* **47**:4017-4027.
- 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**:143-149.
- Takaya N, Suzuki S, Kuwazaki S, Shoun H, Maruo F, Yamaguchi M, Takeo K (1999) Cytochrome p450<sub>nor</sub>, a novel class of mitochondrial cytochrome P450 involved in nitrate respiration in the fungus *Fusarium oxysporum*. *Arch Biochem Biophys* **372**:340-346.
- Torres Pazmiño DE, Winkler M, Glieder A, Fraaije MW (2010) Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *J Biotechnol* **146**:9-24.
- Tosha T, Yoshioka S, Takahashi S, Ishimori K, Shimada H, Morishima I (2003) NMR study on the structural changes of cytochrome P450<sub>cam</sub> upon the complex formation with putidaredoxin. Functional significance of the putidaredoxin-induced structural changes. *J Biol Chem* **278**:39809-39821.
- Uhlmann H, Beckert V, Schwarz D, Bernhardt R (1992) Expression of bovine adrenodoxin in *E.coli* and site-directed mutagenesis of [2-Fe-2S] cluster ligands. *Biochem Biophys Res Commun* **188**:1131-1138.
- 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**:29959-29966.
- Uhlmann H, Iametti S, Vecchio G, Bonomi F, Bernhardt R (1997) Pro108 is important for folding and stabilization of adrenal ferredoxin, but does not influence the functional properties of the protein. *Eur J Biochem* **248**:897-902.
- Unno M, Shimada H, Toba Y, Makino R, Ishimura Y (1996) Role of Arg112 of cytochrome p450<sub>cam</sub> in the electron transfer from reduced putidaredoxin. Analyses with site-directed mutants. *J Biol Chem* **271**:17869-17874.
- Urlacher VB, Eiben S (2006) Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol* **24**:324-330.
- Urlacher VB, Girhard M (2012) Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol* **30**:26-36.
- Vaara M (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* **56**:395-411.
- Vagin A, Teplyakov A (1997) MOLREP: An automated program for molecular replacement. *J Appl Cryst* **30**:1022-1025.

- Vaguine AA, Richelle J, Wodak SJ (1999) SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**:191-205.
- Virus C (2006) Etablierung und Evaluierung eines Screeningsystems für die molekulare Evolution der Steroid-15 $\beta$ -Hydroxylase (CYP106A2) aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Virus C, Lisurek M, Simgen B, Hannemann F, Bernhardt R (2006) Function and engineering of the 15beta-hydroxylase CYP106A2. *Biochem Soc Trans* **34**:1215-1218.
- Virus C, Bernhardt R (2008) Molecular evolution of a steroid hydroxylating cytochrome P450 using a versatile steroid detection system for screening. *Lipids* **43**:1133-1141.
- Warman AJ, Roitel O, Neeli R, Girvan HM, Seward HE, Murray SA, McLean KJ, Joyce MG, Toogood H, Holt RA, Leys D, Scrutton NS, Munro AW (2005) Flavocytochrome P450 BM3: an update on structure and mechanism of a biotechnologically important enzyme. *Biochem Soc Trans* **33**:747-753.
- Weber FJ, de Bont JA (1996) Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim Biophys Acta* **1286**:225-245.
- Wei JY, Pochapsky TC, Pochapsky SS (2005) Detection of a high-barrier conformational change in the active site of cytochrome P450cam upon binding of putidaredoxin. *J Am Chem Soc* **127**:6974-6976.
- Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, Mccree DE (2000) Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell* **5**:121-131.
- Wittchen KD, Meinhardt F (1995) Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**:871-877.
- Yano JK, Koo LS, Schuller DJ, Li H, Ortiz de Montellano PR, Poulos TL (2000) Crystal structure of a thermophilic cytochrome P450 from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem* **275**:31086-31092.
- Yasukochi T, Okada O, Hara T, Sagara Y, Sekimizu K, Horiuchi T (1994) Putative functions of phenylalanine-350 of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450cam. *Biochim Biophys Acta* **1204**:84-90.
- Yasutake Y, Imoto N, Fujii Y, Fujii T, Arisawa A, Tamura T (2007) Crystal structure of cytochrome P450 MoxA from *Nonomuraea recticatena* (CYP105). *Biochem Biophys Res Commun* **361**:876-882.
- Yu C, Gunsalus IC, Katagiri M, Suhara K, Takemori S (1974) Cytochrome P-450cam. I. Crystallization and properties. *J Biol Chem* **249**:94-101.
- Zehentgruber D, Hannemann F, Bleif S, Bernhardt R, Lütz S (2010) Towards preparative scale steroid hydroxylation with cytochrome P450 monooxygenase CYP106A2. *ChemBiochem* **11**:713-721.
- Zerbe K, Pylypenko O, Vitali F, Zhang W, Rousset S, Heck M, Vrijbloed JW, Bischoff D, Bister B, Süßmuth RD, Pelzer S, Wohlleben W, Robinson JA, Schlichting I (2002) Crystal structure of OxyB, a cytochrome P450 implicated in an oxidative phenol coupling reaction during vancomycin biosynthesis. *J Biol Chem* **277**:47476-47485.

## 6 Anhang

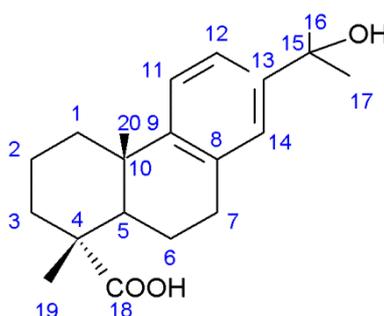
### 6.1 NMR-Daten

**15-Hydroxyabietinsäure:**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)  $\delta$  6.04 (*d*,  $J=2.5$  Hz, H-14), 5.46 (*brs*, H-7), 2.30 (*m*, H-12a), 2.07 (*m*, H-5), 2.05 (*m*, H-12b), 1.94 (*m*, H-9), 1.90 (*m*, H-6a), 1.87 (*m*, H-6b), 1.87 (*m*, H-1a), 1.83 (*m*, H-11a), 1.78 (*m*, H-3a), 1.67 (*m*, H-3b), 1.58 (*m*, 2H, 2x H-2), 1.32 (*s*, 3H, 3x H-16), 1.30 (*s*, 3H, 3x H-17), 1.24 (*s*, 3H, 3x H-19), 1.18 (*m*, H-11b), 0.81 (*s*, 3H, 3x H-20).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)  $\delta$  183.78 (C-18) 144.55 (C-13), 135.04 (C-8), 122.99 (C-7), 122.54 (C-14), 72.54 (C-15), 50.65 (C-9), 46.25 (C-4), 44.83 (C-5), 38.25 (C-1), 37.19 (C-3), 34.43 (C-10), 28.72 (C-16), 28.55 (C-17), 25.75 (C-6), 25.63 (C-12), 22.56 (C-11), 18.03 (C-2), 16.75 (C-19), 13.99 (C-20).



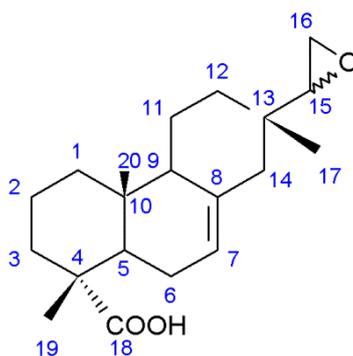
**Abbildung 6.1:** Strukturformel von 15-Hydroxyabietinsäure mit C-Atom-Nummerierung.

**15-Hydroxydehydroabietinsäure:**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)  $\delta$  7.22 (*dd*,  $J=8.5$  and 2.0 Hz, H-12), 7.19 (*d*,  $J=8.5$  Hz, H-11), 7.14 (*d*,  $J=2.0$  Hz, H-14), 2.94 (*m*, H-7a), 2.87 (*m*, H-7b), 2.30 (*m*, H-1a), 2.22 (*dd*,  $J=12.5$  and 2.0 Hz, H-5), 1.85 (*m*, H-6a), 1.80 (*m*, H-3a), 1.77 (*m*, H-2a), 1.73 (*m*, H-2b), 1.70 (*m*, H-3b), 1.54 (*m*, H-6b), 1.54 (*s*, 6H, 3x H-16 and 3x H-17), 1.50 (*m*, H-1b), 1.27 (*s*, 3H, 3x H-19), 1.20 (*s*, 3H, 3x H-20).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)  $\delta$  183.95 (C-18) 147.82 (C-13), 146.04 (C-9), 134.74 (C-8), 124.93 (C-14), 124.14 (C-11), 121.91 (C-12), 72.34 (C-15), 47.36 (C-4), 44.59 (C-5), 37.89 (C-1), 36.70 (C-3), 36.92 (C-10), 31.63 (C-16), 31.61 (C-17), 30.11 (C-7), 25.06 (C-20), 21.71 (C-6), 18.50 (C-2), 16.26 (C-19).



**Abbildung 6.2:** Strukturformel von 15-Hydroxydehydroabietinsäure mit C-Atom-Nummerierung.

**15,16-Epoxyisopimarsäure:**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)  $\delta$  5.32 (*m*, H-7), 2.69 (*dd*,  $J=4.5$  and 3.0 Hz, H-15), 2.65 (*dd*,  $J=4.5$  and 3.0 Hz, H-16a), 2.61 (*dd*,  $J=4.5$  and 3.0 Hz, H-16b), 1.99 (*m*, H-14a), 1.98 (*m*, H-6a), 1.91 (*m*, H-5), 1.85 (*m*, H-14b), 1.82 (*m*, H-1a), 1.76 (*m*, H-3a), 1.73 (*m*, H-9), 1.68 (*m*, H-6b), 1.65 (*m*, H-3b), 1.55 (*m*, H-11a), 1.53 (*m*, 2H, 2x H-2), 1.41 (*m*, H-12a), 1.34 (*m*, H-11b), 1.29 (*m*, H-12b), 1.25 (*s*, 3H, 3x H-19), 1.10 (*m*, H-1b), 0.87 (*s*, 3H, 3x H-20), 0.75 (*s*, 3H, 3x H-17).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 K)  $\delta$  183.95 (C-18) 134.79 (C-8), 121.33 (C-7), 60.74 (C-15), 52.07 (C-9), 46.22 (C-4), 44.96 (C-5), 43.50 (C-16), 42.97 (C-14) 38.80 (C-1), 36.99 (C-3), 35.03 (C-10), 33.94 (C-13), 31.98 (C-12), 25.18 (C-6), 19.45 (C-11), 18.53 (C-17), 17.91 (C-2), 17.17 (C-19), 15.28 (C-20).



**Abbildung 6.3:** Strukturformel von 15,16-Epoxyisopimarsäure mit C-Atom-Nummerierung.

## 6.2 Aminosäuresequenzen

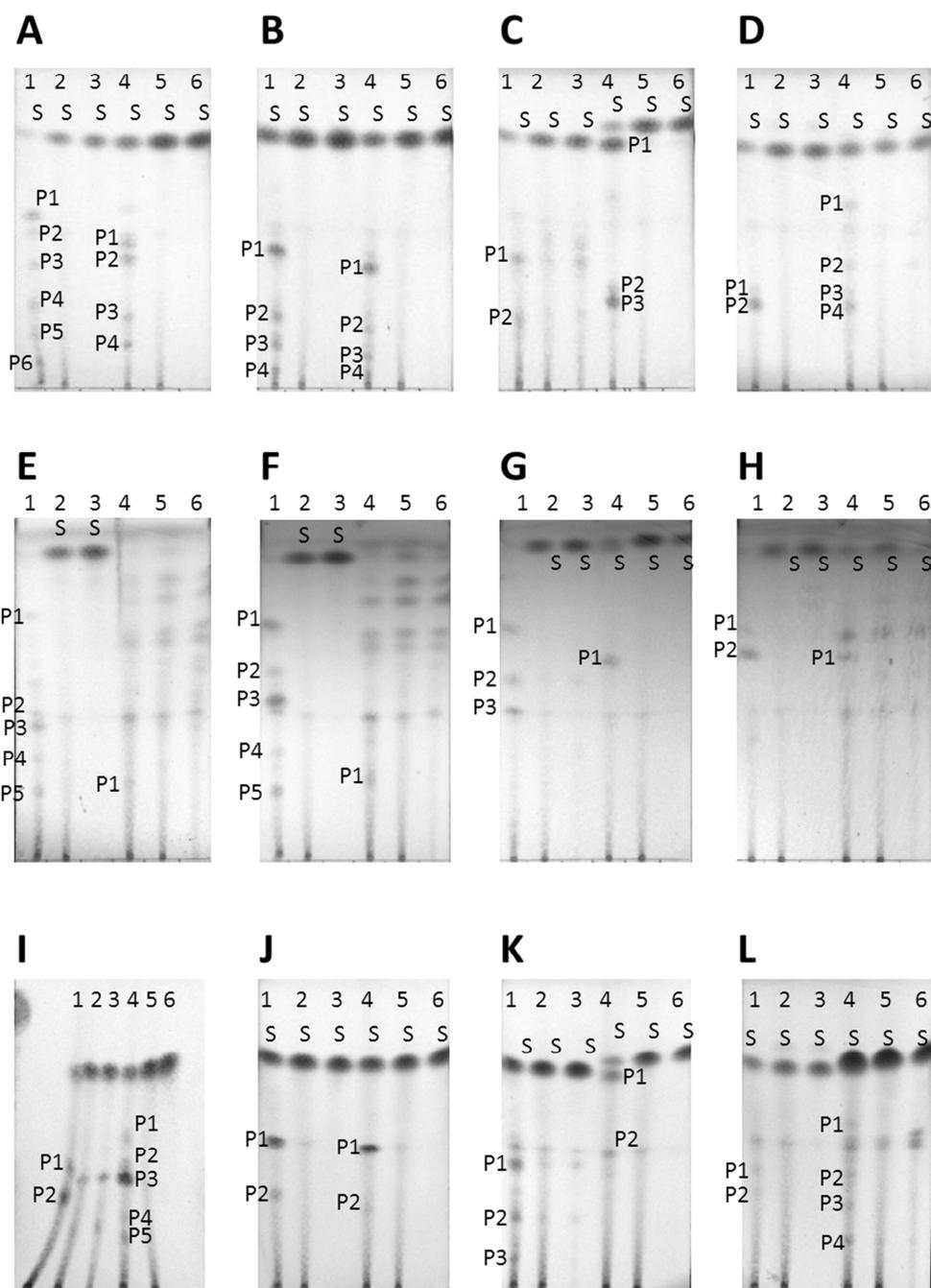
### CYP105A1

MTDTATTPQT TDAPAFPSNR SCPYQLPDGY AQLRDTPGPL HRVTLYDGRQ AWWVTKHEAA  
RKLLGDPRLS SNRTDDNFPA TSPRFEAVRE SPQAFIGLDP PEHGTRRRMT ISEFTVKRIK  
GMRPEVEEVV HGFLDEMLAA GPTADLVSQF ALPVPSMVIC RLLGVVPYADH EFFQDASKRL  
VQSTDAQSAL TARNDLAGYL DGLITQFQTE PGAGLVGALV ADQLANGEID REELISTAML  
LLIAGHETTA SMTSLSVITL LDHPEQYAAL RADRSLVPGA VEELRLYLAI ADIAGGRVAT  
ADIEVEGHLI RAGEGVIVVN SIANRDGTVY EDPDALDIHR SARHHLAFGF GVHQCLGQNL  
ARLELEVILN ALMDRVPTLR LAVPVEQLVL RPGTTIQGVN ELPVTW

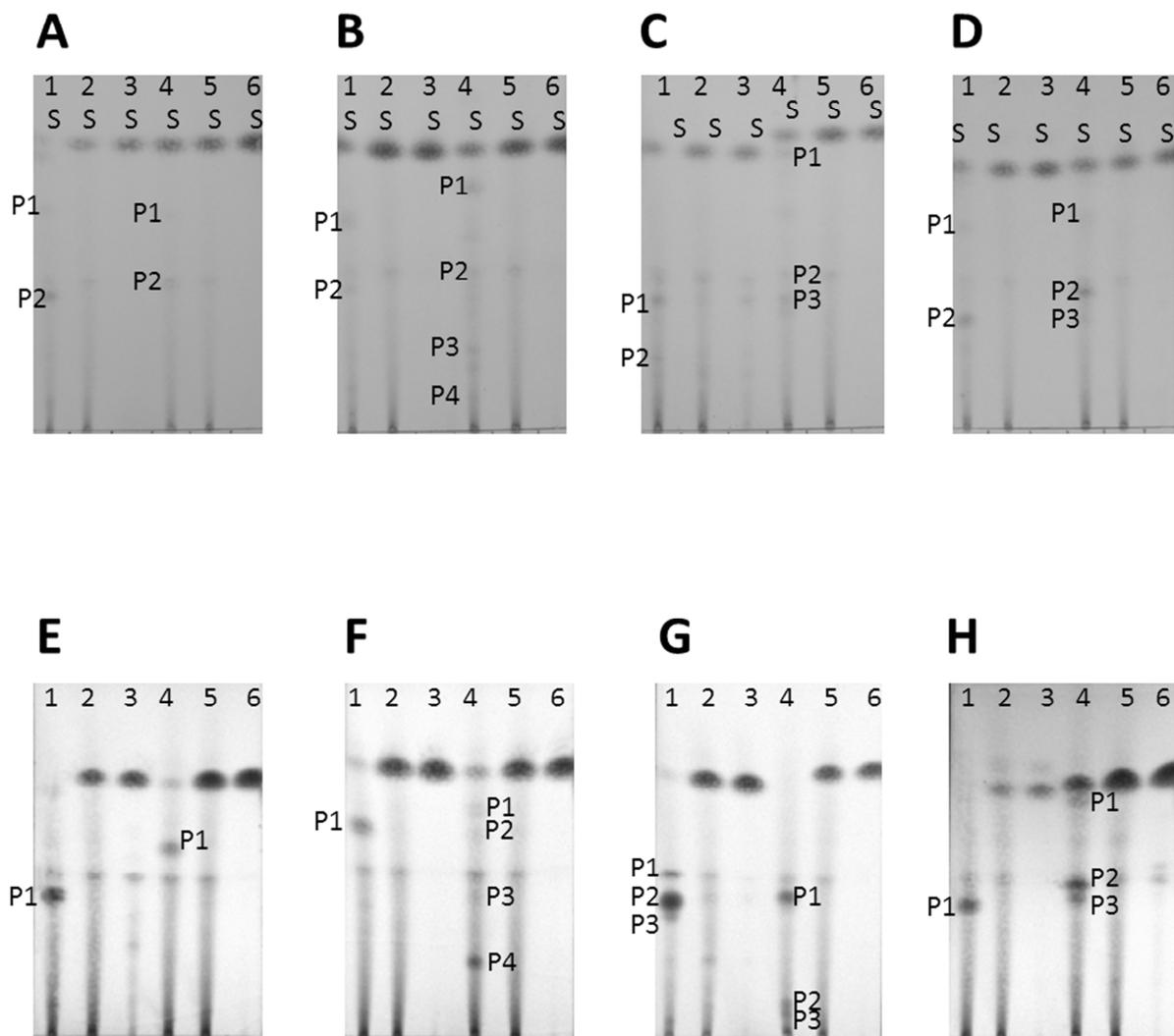
### CYP106A2

MKEVIAVKEI TRFKTRTEEF SPYAWCKRML ENDPVSYHEG TDTWNVFKYE DVKRVLSDYK  
HFSSVRKRTT ISVGTDSEEG SVPEKIQITE SDPPDHRKRR SLLAAAFTPR SLQNWEPRIQ  
EIADELIGQM DGGTEIDIVA SLASPLPIIV MADLMGVPSK DRLLFKKWVD TLFLEPFDRK  
QEEVDKLGQV AAKEYYQYLY PIVVQKRLNP ADDIISDLLK SEVDGEMFTD DEVVRTTMLI  
LGAGVETTSH LLANSFYSLI YDDKEVYQEL HENLDLVPQA VEEMLRFRFN LIKLDRTVKE  
DNDLLGVELK EGDSVVVWMS AANMDEEMFE DPFTLNIHRP NNKKHLTFGN GPHFCLGAPL  
ARLEAKIALT AFLKKFKHIE AVPSFQLEEN LTDSATGQTL TSLPLKASRM

## 6.3 DC-Chromatogramme der Substratumsätze



**Abbildung 6.4:** DC-Chromatogramm der *in vitro* Substratumsätze der Alkohole (A-D), Aldehyde (E-H) und Säuren (I-L) mit CYP106A2. Die Spuren 1 und 4 zeigen jeweils die Umsätze, die Spuren 2 und 5 die Negativkontrollen (gleicher Reaktionsansatz, jedoch ohne CYP106A2) und die Spuren 3 und 6 das reine Substrat. A) Abietadienol und Isopimaradienol B) Sandaracopimaradienol und Pimaradienol C) Neoabietadienol und Palustradienol D) Dehydroabietadienol und Lävopimaradienol E) Abietadienal und Isopimaradienal F) Sandaracopimaradienal und Pimaradienal G) Neoabietadienal und Palustradienal H) Dehydroabietadienal und Lävopimaradienal I) Abietinsäure und Isopimarsäure J) Sandaracopimarsäure und Pimarsäure K) Neoabietinsäure und Palustrinsäure L) Dehydroabietinsäure und Lävopimarsäure. Die Reaktion erfolgte in 500  $\mu$ l 50 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems für 30 min bei 30 °C. Anschließend wurden die Reaktionsansätze zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die DC-Analyse wurde mit einem Hexan/Ethylacetat-Gemisch (70:30 + 1 % Essigsäure) durchgeführt und die Detektion der Substanzen erfolgte durch Färbung mit Anisaldehyd.



**Abbildung 6.5:** DC-Chromatogramm der *in vitro* Substratumsätze der Alkohole (A-D), und Säuren (E-H) mit CYP105A1. Die Spuren 1 und 4 zeigen jeweils die Umsätze, die Spuren 2 und 5 die Negativkontrollen (gleicher Reaktionsansatz, jedoch ohne CYP105A1) und die Spuren 3 und 6 das reine Substrat. A) Abietadienol und Isopimaradienol B) Sandaracopimaradienol und Pimaradienol C) Neoabietadienol und Palustradienol D) Dehydroabietadienol und Lävopimaradienol E) Abietinsäure und Isopimarsäure F) Sandaracopimarsäure und Pimarsäure G) Neoabietinsäure und Palustrinsäure H) Dehydroabietinsäure und Lävopimarsäure. Die Reaktion erfolgte in 500  $\mu$ l 50 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems für 30 min bei 30 °C. Anschließend wurden die Reaktionsansätze zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die DC-Analyse wurde mit einem Hexan/Ethylacetat-Gemisch (70:30 + 1 % Essigsäure) durchgeführt und die Detektion der Substanzen erfolgte durch Färbung mit Anisaldehyd.

6.4 Alignment des CYP106A2 zur Identifikation der SRS

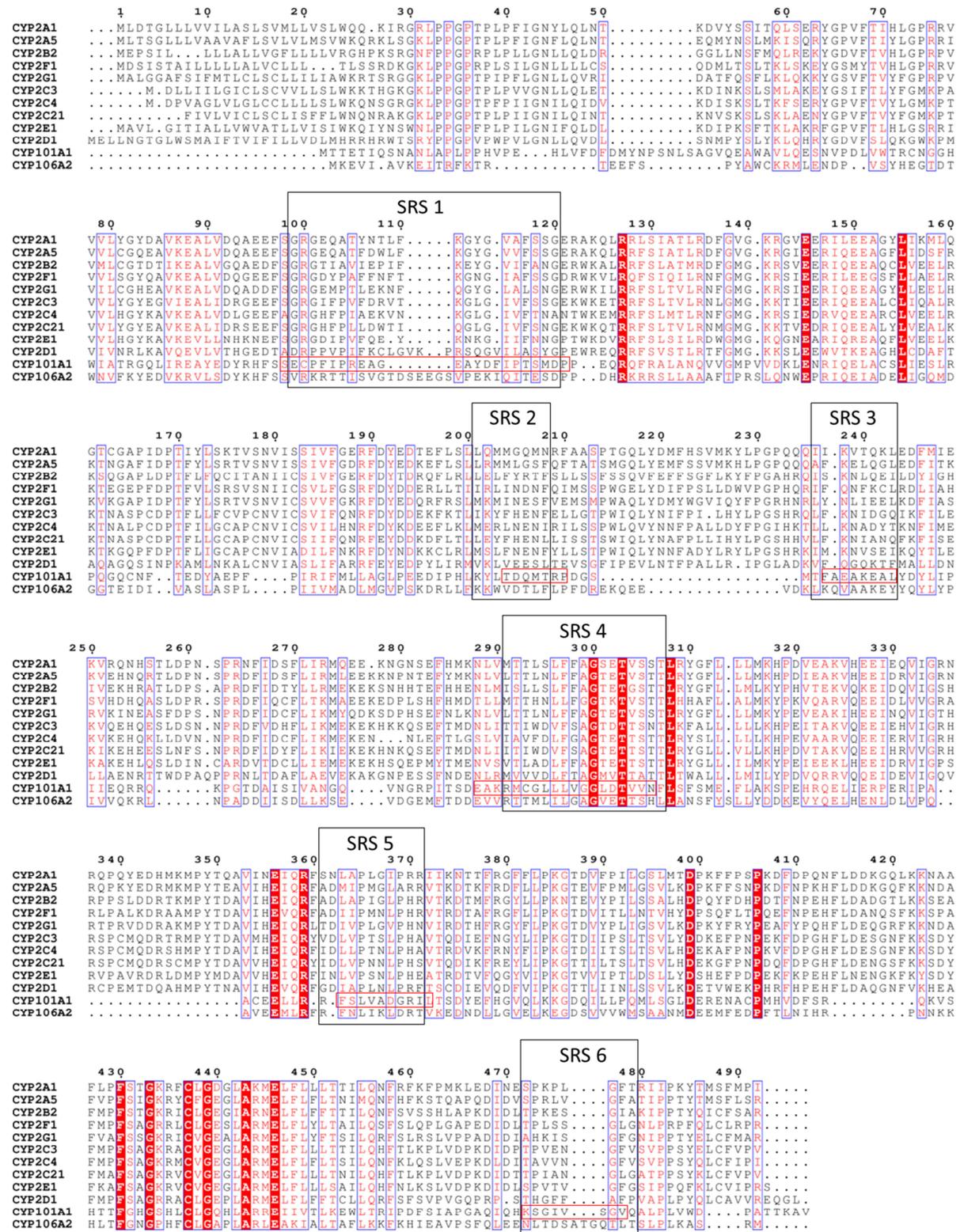


Abbildung 6.6: Alignment der ursprünglich von Gotoh (1991) zur Identifikation der Substraterkennungsstellen (SRS, *substrate recognition sites*) ausgewählten zehn CYP2 Proteine mit P450cam und CYP106A2. Die SRS der CYP2-Familie sind schwarz umrandet, die SRS des P450cam sind rot umrandet. Identische Aminosäuren im Alignment sind rot hinterlegt und Aminosäuren mit homologen Eigenschaften sind rot gedruckt.

## 6.5 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

**Tabelle 6.1:** Übersicht der Zusammensetzung der für die SDS-PAGE eingesetzten Lösungen und Puffer.

<b>SDS-Probenpuffer</b>	
Tris-HCl, pH 6,8	375 mM
β-Mercaptoethanol	5 %
Natriumdodecylsulfat	6 %
Bromphenolblau	0,03 %
Glycerin	30 %
<b>Trenngel (12 %)</b>	
4x Lower Tris-Puffer	3,75 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	8,00 ml
10 % Ammoniumpersulfat	100 µl
TEMED	10 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 20 ml
<b>Sammelgel (5 %)</b>	
4x Upper Tris-Puffer	2,50 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	1,60 ml
10 % Ammoniumpersulfat	50 µl
TEMED	5 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 10 ml
<b>4x Lower Tris-Puffer</b>	
Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M
Natriumdodecylsulfat	4 %
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
<b>4x Upper Tris-Puffer</b>	
Tris-HCl, pH 6,8	0,5 M
Natriumdodecylsulfat	4 %
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
<b>SDS-Elektrophoresepuffer</b>	
Tris-HCl	25 mM
Glycin	250 mM
Natriumdodecylsulfat	0,1 %
	Einstellen des pH auf 8,3
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	
Brilliant blue	0,1 %
Methanol	50 %
Essigsäure	10 %
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
<b>Coomassie-Entfärbelösung</b>	
Methanol	10 %
Essigsäure	10 %
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

## Publikationen

### Veröffentlichungen in Fachzeitschriften:

**Janocha S**, Bichet A, Zöllner A, Bernhardt R (2011)

Substitution of lysine with glutamic acid at position 193 in bovine CYP11A1 significantly affects protein oligomerization and solubility but not enzymatic activity.

*Biochim Biophys Acta* **1814**(1):126-131.

Diese Veröffentlichung enthält Arbeiten und deren Ergebnisse, die zu Beginn der Dissertation als Fortsetzung meiner Diplomarbeit durchgeführt wurden.

**Janocha S**, Zapp J, Hutter M, Kleser M, Bohlmann J, Bernhardt R (2013)\*

Resin acid conversion with CYP105A1: an enzyme with the potential for the production of pharmaceutically relevant diterpenoids.

*Chembiochem* **14**(4):467-473.

\*Von den Gutachtern und dem Journal als *Very Important Paper* eingestuft.

**Janocha S**, Bernhardt R (2013)

Design and characterization of an efficient CYP105A1-based whole-cell biocatalyst for the conversion of resin acid diterpenoids in permeabilized *Escherichia coli*.

*Appl Microbiol Biotechnol* **97**(17):7639-7649.

### Publikationen in Vorbereitung:

**Janocha S**, Carius Y, Lancaster CRD, Bernhardt R

Crystal structure of CYP106A2, a versatile enzyme capable of hydroxylating steroids and resin acids.

*In Vorbereitung*

**Janocha S**, Carius Y, Lancaster CRD, Bernhardt R

Structural basis for unusual substrate binding spectra with CYP105A1 from *Streptomyces griseolus*.

*In Vorbereitung*

**Patentanmeldung:**

**Janocha S** and Bernhardt R

Resin acid conversion with CYP105A1: an enzyme with the potential for the production of pharmaceutically relevant diterpenoids

US-Provisional 61/848,610 – Patent pending

**Konferenz-Beitrag:**

**Janocha S**, Hutter M, Bohlmann J, Bernhardt R

Resin acid conversion with bacterial cytochromes CYP105A1 and CYP106A2 - Posterpräsentation

17<sup>th</sup> International Conference on Cytochrome P450 – Biochemics, Biophysics and Structure, Manchester, June 2011

**Strukturen:**

Die Koordinaten und Strukturaktoren von CYP105A1 wurden bei der PDB eingereicht

**Janocha S**, Carius Y, Bernhardt R, Lancaster CRD

CYP105A1 in complex with abietic acid

(4BYK)

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Professor Rita Bernhardt danken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, einen Einblick in ein spannendes Forschungsgebiet zu gewinnen. Die sehr guten Arbeitsbedingungen an ihrem Lehrstuhl, ihre tatkräftige Unterstützung und das Interesse am Fortgang der Experimente sowie auch der Freiraum, den sie mir bei der Gestaltung der Thematik ließ, haben diese Dissertation überhaupt erst ermöglicht.

Herrn Professor Roy Lancaster danke ich für die besondere Gelegenheit, innerhalb und außerhalb seines Lehrstuhls einen Eindruck von der Strukturbiologie zu erhalten und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ganz besonders möchte ich Frau Doktor Yvonne Carius danken, die mir nicht nur eine umfassende Einführung in die Arbeitsmethoden der Strukturbiologie gegeben hat, sondern auch stets geduldig mit Rat und Tat zu Seite stand, wenn ich Fragen hatte oder mit Problemen zu kämpfen hatte. Auch den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Roy Lancaster in Homburg sei herzlich gedankt.

Herrn Privatdozenten Michael Hutter (Zentrum für Bioinformatik), Herrn Doktor Josef Zapp (Institut für pharmazeutische Biologie) und Herrn Doktor Klaus Hollemeyer (Institut für technische Biochemie) danke ich für die ausgezeichnete Kooperation und ihre Beiträge zu dieser Arbeit.

Vielen Dank auch an Herrn Doktor Frank Hannemann, dessen Bürotür stets für Diskussionen und Anregungen offenstand.

Unseren technischen Assistenten Herrn Wolfgang Reinle, Frau Katharina Bompais und Frau Birgit Heider-Lips danke ich für die vielen Hilfestellungen bei der Bewältigung des Laboralltags. Ein großes Dankeschön auch an Frau Gabi Schon, die bei allen organisatorischen Angelegenheiten stets eine große Hilfe war.

Innerhalb der Arbeitsgruppe möchte ich vor allem Daniela Schmitz, aber auch Antje Eiden-Plach, Tanja Sagadin, Benjamin Stenger, Simone Anderko, Lina Schiffer, Sascha Schiffrin, Elisa Brill, Sandra Giovanna Salamanca-Pinzón, Jens Neunzig, Adrian Gerber, Michael Ringle, Flora Kiss, Fredy Kern, Martin Litzenburger und Julia Nikolaus für das tolle Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit danken.

Auch den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sei gedankt: Allen voran Kerstin Ewen, die mir eine besondere Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit war.

Sandra Koser danke ich für ihr Verständnis und dafür, dass sie mir immer geduldig zugehört hat.

Der größte Dank gilt meiner Familie und besonders meinen Eltern, deren bedingungslose und vollständige Unterstützung in allen Lebenslagen mir alles überhaupt erst ermöglicht hat.