

Oxidation pflanzlicher Triterpenoide mittels Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sarah Katharina Kranz-Finger

aus Velbert

Düsseldorf, Januar 2019

aus dem Institut für Biochemie, Lehrstuhl II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Vlada B. Urlacher
2. Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2019

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt. Ich habe bisher keine erfolglosen und erfolgreichen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, _____

(Sarah Katharina Kranz-Finger)

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Vlada B. Urlacher für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas, die sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut sowie für viele hilfreiche Diskussionen und Ratschläge. Des Weiteren möchte ich mich für die Erstbegutachtung der Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie die Betreuung der Arbeit als Mentor im Rahmen des CEPLAS-Projektes.

CEPLAS möchte ich für die Finanzierung des Projektes danken.

Ich möchte mich des Weiteren bei den CEPLAS-Projektpartnern Dr. Thomas Drepper, Dr. Anita Loeschcke und Jennifer Hage-Hülsmann sowie Prof. Dr. Ilka Axmann und Dr. Dennis Dienst für eine tolle Zusammenarbeit bedanken.

Bei Dr. Marco Girhard, Dr. Osama Mahmoud und Thomas Hilberath möchte ich mich für das Korrekturlesen bedanken.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Kollegen am IBCII für viele hilfreiche Diskussionen, für zahlreiche Tipps und für die Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt Dr. Esther Ricklefs, Dr. Priska Le-Huu, Dr. Franca Wahrendorff, Dr. Clemens von Bühler, Dr. Florian Tieves, Anne Worsch und Stefan Biemann.

Des Weiteren danke ich meinen Studenten Florestan Bilsing, Patrick M. Ndjimi und Veselin Gyurov für die Unterstützung bei experimentellen Arbeiten.

Bei meinem Mann, meinem Sohn, meinen Eltern und meinem Bruder für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Publikationen und Konferenzbeiträge

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in Form eines Originalartikels veröffentlicht.

Originalartikel

Kranz-Finger S, Mahmoud O, Ricklefs E, Ditz N, Bakkes PJ, Urlacher VB. Insights into the functional properties of the marneral oxidase CYP71A16 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta*. 2018 Jan;1866(1):2-10. doi: 10.1016/j.bbapap.2017.07.008.

Der Originalartikel ist unter www.sciencedirect.com online verfügbar.

Teile aus diesem Artikel wurden in den Kapiteln 3.1 und 4.1. in der vorliegenden Dissertation verwendet. Copyright 2017 Elsevier. Der eigene Beitrag zum Originalartikel beinhaltet die experimentellen Arbeiten der Expression und Reinigung der CYP71A16, der in vitro Reaktionen, der Aufnahme der Kinetik und der Dissoziationskonstante, die Klonierung der C-ATR2, Expression der C- und L-ATR2 und Reinigung der C-ATR2, der Marnerol Synthese und Reinigung, der Auswertung der Daten sowie das Schreiben des Entwurfs des Manuskriptes. Daten, die durch andere Coautoren der Publikation generiert wurden, sind gekennzeichnet.

Weiterer Artikel, der nicht in dieser Arbeit enthalten ist:

Loeschcke A, Dienst D, Wewer V, Hage-Hülsmann J, Dietsch M, Kranz-Finger S, Hüren V, Metzger S, Urlacher VB, Gigolashvili T, Kopriva S, Axmann IM, Drepper T, Jaeger KE. The photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 as new hosts for cyclic plant triterpene biosynthesis. *PLoS One*. 2017 Dec 27;12(12):e0189816. doi: 10.1371/journal.pone.0189816.

Posterbeiträge

Kranz, S. & Urlacher, V. B. Functional expression and characterization of CYPs that oxidize plant terpenoids, Ceplas Symposium, 23.-24. Mai 2016, Düsseldorf, Deutschland.

Kranz, S., Gyurov, V., Mahmoud, O., Urlacher, V. B. Characterization of CYPs involved in triterpenoid biosynthesis in *A. thaliana*, Ceplas Symposium 18. – 19. Mai 2015, Köln, Deutschland.

Kranz, S., Gyurov, V., Mahmoud, O., Urlacher, V. B. Characterization of plant cytochrome P450 monooxygenases involved in triterpenoid biosynthesis, 19th International Conference on Cytochrome P450, 12.-15. Juli 2015, Tokio, Japan.

Kranz, S. & Urlacher, V. B. Heterologous expression of CYP71A16 in *Escherichia coli*, Ceplas Symposium, 02.- 03. Mai 2014, Köln, Deutschland.

Vorträge

Kranz, S. & Urlacher, V. B. Cytochrome-P450 catalyzed oxidation of triterpenoids Ceplas Young Researchers Retreat, 29.- 30. September 2014, Bad Honnef, Deutschland.

Kranz, S. & Urlacher, V. B. Functional expression and biochemical characterization of plant P450 monooxygenases, Ceplas Young Researchers Retreat, 13. - 14. November 2013, Bielefeld, Deutschland.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Å	Ångström
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
CYP71A16	CYP aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP705A12	CYP aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
CYP102A1	CYP aus <i>Bacillus megaterium</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzym-Klassifikationsnummer (engl. <i>Enzyme Commission</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fpr	Flavodoxin-Reduktase aus <i>Escherichia coli</i>
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
GC/MS	Gaschromatograph mit gekoppelter Massenspektrometrie
GDH	GDH aus <i>Bacillus megaterium</i>
h	Stunde/n
IPP	Isopentenylpyrophosphat
kDa	Kilodalton
mA	Milliamper
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung
Km	Kanamycin
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
μ	Mikro
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	β-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
nmol	Nanomol
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
P450	Cytochrom-P450-Monooxygenase
P450-BM3	CYP102A1 aus <i>Bacillus megaterium</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIM	Ausgewähltes Ionen Monitoring (engl. <i>selected ion monitoring</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tfb	Transformationspuffer (engl. <i>transformation buffer</i>)

T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit/s
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i>)
YkuN	Flavodoxin aus <i>Bacillus subtilis</i>

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	II
Danksagung	III
Publikationen und Konferenzbeiträge	IV
Abkürzungen	VI
Inhaltsverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung.....	XIV
Abstract	XVI
1 Einleitung	1
1.1 Triterpene und Triterpenoide	1
1.1.1 Biosynthese	1
1.1.2 Funktionen und biologische Aktivitäten	3
1.1.3 Oxyfunktionalisierung von Triterpenoiden durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen	5
1.2 Cytochrom-P450-Monooxygenasen	6
1.2.1 Klassifizierung von Cytochrom-P450-Monooxygenasen	7
1.2.2 Katalysemechanismus.....	7
1.2.3 Redoxpartnersysteme der Cytochrom-P450-Monooxygenasen.....	10
1.2.4 Pflanzliche Cytochrom-P450-Monooxygenasen.....	11
1.2.4.1 Heterologe Herstellung pflanzlicher P450-Enzyme in <i>Escherichia coli</i>	12
1.2.5 CYP102A1 (P450-BM3) aus <i>Bacillus megaterium</i>	14
1.2.5.1 Proteinengineering von P450-BM3	14
1.3 Zielsetzung.....	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Chemikalien und Reagenzien	19
2.2 Oligonukleotide, Plasmide, Bakterienstämme sowie Hefestamm.....	19
2.3 Puffer, Medien und Lösungen.....	24
2.3.1 Puffer	24
2.3.2 Medien	25

2.3.3	Lösungen	26
2.4	Molekularbiologische Methoden	27
2.4.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.4.1.1	Amplifikation von <i>CYP71A16</i> und <i>CYP705A12</i>	27
2.4.1.2	Amplifikation von <i>ATR2</i>	27
2.4.2	Ortsgerichtete Mutagenese	28
2.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA.....	29
2.4.4	Restriktionsspaltung von DNA	29
2.4.5	Trennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	29
2.4.6	Isolierung von DNA aus Agarosegelen und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	30
2.4.7	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mittels alkalischer Phosphatase	30
2.4.8	Ligation von DNA-Fragmenten	30
2.4.9	DNA-Sequenzierung.....	30
2.5	Mikrobiologische Methoden	31
2.5.1	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mittels RbCl_2	31
2.5.2	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	31
2.5.3	Anzucht- und Lagerungsbedingung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	31
2.5.4	Anzucht- und Lagerungsbedingung von <i>S. cerevisiae</i> -Stämmen.....	31
2.5.5	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	32
2.5.5.1	<i>CYP71A16</i> und <i>CYP705A12</i>	32
2.5.5.2	<i>ATR2</i>	32
2.5.5.3	<i>YkuN</i> und <i>Fpr</i>	32
2.5.5.4	<i>YkuN-Fpr</i> Fusion <i>YR-P5</i>	33
2.5.5.5	<i>GDH</i>	33
2.5.5.6	<i>P450-BM3</i>	33
2.5.5.6.1	Expression in Mikrotiterplatten	33
2.5.5.6.2	Expression im Erlenmeyerkolben.....	33
2.5.6	Heterologe Genexpression und Herstellung von Marnerol in <i>S. cerevisiae</i> nach (Kushiro <i>et al.</i> 1998)	34

2.5.7	Zellaufschluss von <i>E. coli</i>	34
2.5.7.1	Trennung von Zellfraktionen mittels differentieller Zentrifugation	34
2.5.7.2	Zellaufschluss mittels Ultraschall	35
2.5.7.2.1	CYP71A16/CYP705A12	35
2.5.7.2.2	ATR2	35
2.5.7.2.3	GDH.....	35
2.5.7.2.4	YkuN und Fpr	36
2.5.7.2.5	YkuN-Fpr Fusion YR-P5.....	36
2.5.7.2.6	P450-BM3.....	36
2.5.7.3	Aufschluss nach Expression in Mikrotiterplatten mittels Lysozym	36
2.6	Proteinbiochemische und analytische Methoden.....	36
2.6.1	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	36
2.6.2	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	37
2.6.3	Reinigung von Proteinen	37
2.6.3.1	Reinigung von CYP71A16 und CYP705A12 mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)	37
2.6.3.2	Reinigung von C-ATR2 mittels IMAC und Größenausschlusschromatographie.	38
2.6.3.3	Reinigung von YkuN und Fpr	39
2.6.3.4	Reinigung der GDH.....	39
2.6.4	Bestimmung der P450-Konzentration.....	39
2.6.5	Aktivitätsbestimmung von Cytochrom-P450-Reduktasen mittels Cytochrom <i>c</i> Assay	39
2.6.6	Aktivitätsbestimmung der Glucose-Dehydrogenase	40
2.6.7	Ermittlung der Extinktionskoeffizienten der C-ATR2 aus <i>A. thaliana</i>	41
2.6.8	Konzentrationsbestimmung von Redoxpartnerproteinen.....	41
2.6.9	Bestimmung der Kopplungseffizienz und NADPH-Oxidationsraten	41
2.6.10	Substratbindespektren.....	42
2.6.11	Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (GC/MS)	43

2.6.12	Isolierung von Marnerol mittels semi-präparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	43
2.6.13	Isolierung des Oxidationsproduktes von Lupeol mittels semi-präparativer HPLC	44
2.6.14	Feinmassebestimmung (HR-MS)	45
2.6.15	NMR-Spektroskopie.....	45
2.7	<i>In-vitro</i> -Umsetzungen von Triterpenoiden.....	45
2.7.1	Oxidation von Marnerol durch CYP71A16.....	45
2.7.2	Reaktionen mit CYP705A12	47
2.7.3	Oxidation von Lupeol, α -Amyrin, β -Amyrin und Cycloartenol durch P450-BM3.....	47
2.7.3.1	Durchmusterung einer P450-BM3-Bibliothek.....	47
2.7.3.2	Eingrenzung durch Durchmusterung ausgewählter P450-BM3-Varianten ...	48
2.7.3.3	<i>In-vitro</i> -Umsetzungen nach Reaktionsoptimierung	48
2.7.3.4	<i>In-vitro</i> -Reaktionen im präparativen Maßstab	48
3	Ergebnisse	50
3.1	Oxidation von Marnerol mittels pflanzlicher Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus <i>A. thaliana</i>	50
3.1.1	Heterologe Herstellung von CYP71A16	51
3.1.2	Heterologe Herstellung von CYP705A12	56
3.1.3	Heterologe Herstellung von ATR2	58
3.1.4	Herstellung von Marnerol.....	62
3.1.5	Vergleich von Redoxpartnersystemen für CYP71A16.....	63
3.1.6	Identifikation des Produktes 23-Hydroxymarnerol	64
3.1.7	Einfluss von verschiedenen Lösungsvermittlern auf die CYP71A16-katalysierte Reaktion.....	65
3.1.8	Optimierung der Reaktionsbedingungen der CYP71A16-katalysierten Oxidation von Marnerol.....	66
3.1.9	Zeitverlauf der CYP71A16-katalysierten Marnerol-Oxidation	67
3.1.10	Kinetische Konstanten von CYP71A16	68

3.1.11	Bestimmung der Funktionalität von CYP705A12.....	69
3.1.12	Substratbindestudien mit CYP71A16 und CYP705A12.....	69
3.2	Oxidation von Triterpenoiden mittels CYP102A1 (P450-BM3) Mutanten	72
3.2.1	Auswahl der P450-BM3 Varianten für die Oxidation von Triterpenoiden	72
3.2.1.1	Screening einer P450-BM3-Bibliothek zur Triterpenoid-Oxidation.....	72
3.2.1.2	Rationales Proteindesign basierend auf den Screening-Ergebnissen zur Oxidation von Lupeol	73
3.2.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen	75
3.2.3	Produktverteilung nach der Umsetzung von Lupeol	77
3.2.4	Zeitverlauf der Oxidation von Lupeol katalysiert durch die P450-BM3-Mutante V78G F87A I263G	79
3.2.5	Identifizierung des Hauptproduktes der Lupeol-Oxidation katalysiert durch die P450-BM3-Mutante V78G F87A I263G	80
3.2.6	Oxidation von α -Amyrin, β -Amyrin und Cycloartenol katalysiert durch die P450 BM3-Mutante V78G F87A I263G.....	82
4	Diskussion.....	84
4.1	Marnierol-Oxidation mittels pflanzlicher Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus <i>A. thaliana</i>	84
4.1.1	Heterologe Herstellung der P450-Enzyme	84
4.1.2	Heterologe Herstellung und Vergleich von ATR2 aus <i>A. thaliana</i> Ler-0 und Col-0	86
4.1.3	Charakterisierung von CYP71A16.....	88
4.1.3.1	Vergleich von Redoxpartnersystemen für CYP71A16	88
4.1.3.2	Einfluss des nichtionischen Detergenz Triton X-100 auf die Reaktion und Identifikation von 23-Hydroxymarnierol.....	89
4.1.3.3	<i>In-vitro</i> -Reaktionsoptimierung, -verlauf und Bestimmung kinetischer Konstanten	90
4.1.3.4	Substratbindestudien	92
4.1.4	Evaluierung von CYP705A12	93
4.1.4.1	<i>In-vitro</i> -Reaktionen.....	93
4.1.4.2	Substratbindestudien	93

4.1.5	Schlussfolgerung	94
4.2	Triterpenoid-Oxidation mittels Varianten der bakteriellen Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP102A1 (P450-BM3)	95
4.2.1	Reaktionsoptimierung zur Oxidation von Lupeol	97
4.2.2	Produktverteilung und Produktidentifizierung	99
4.2.3	Oxidation von α - und β -Amyrin und Cycloartenol	100
4.2.4	Schlussfolgerung	102
4.3	Ausblick.....	102
5	Literatur	103
6	Anhang.....	120
6.1	GC/MS Spektren.....	120
6.2	NMR-Analyse.....	126

Zusammenfassung

Triterpenoide sind in einer hohen Diversität in der Natur zu finden und weisen eine Reihe interessanter biologischer Eigenschaften auf. Die biotechnologische Herstellung von Triterpenoiden ist von Interesse, da diese aus Pflanzen in oft nur geringen Mengen isoliert werden können. Natürlicherweise werden die ersten oxidativen Funktionalisierungsschritte der Triterpenoid-Grundgerüste durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen (P450 oder CYPs) selektiv katalysiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Triterpenoid-spezifische pflanzliche P450-Monooxygenasen charakterisiert werden. Des Weiteren sollte das Potential bakterieller durch Proteinengineering optimierter P450-Monooxygenasen in der Oxidation pflanzlicher Triterpenoide evaluiert werden.

In dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die noch nicht biochemisch charakterisierten P450-Enzyme CYP71A16 und CYP705A12 aus *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli* hergestellt und anschließend charakterisiert. Beide *cyp*-Gene liegen in einem Operon-artigen Gencluster mit dem Gen der Marneral-Synthase auf dem *A. thaliana* Genom vor. Von CYP71A16 ist bekannt, dass sie die Triterpenoide Marneral und Marnerol an Position 23 *in planta* und auch in einem rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm hydroxyliert. In dieser Arbeit konnten N-terminal veränderte Varianten beider P450-Enzyme in hohen Mengen von bis 52 mg/L bzw. 33 mg/L (CYP71A16 bzw. CYP705A12) hergestellt und im Anschluss gereinigt werden. Ein bakterielles Redoxpartnersystem bestehend aus dem Flavodoxin YkuN aus *Bacillus subtilis* und der Flavodoxin-Reduktase Fpr aus *E. coli* stellte sich dabei für die *in-vitro*-Versuche mit CYP71A16 als geeigneter heraus als die Cytochrom-P450-Reduktase ATR2 aus *A. thaliana*. Für die Oxidation von Marnerol zu 23-Hydroxymarnerol durch CYP71A16 konnte ein K_M -Wert von 142 μM und ein K_{cat} -Wert von 3,9 min^{-1} bestimmt werden. Darüber hinaus konnten Substratbindespektren aufgenommen und eine Dissoziationskonstante für CYP71A16 von 225 μM ermittelt werden. Mittels GC/MS-Analysen konnte ein bislang noch nicht detektiertes Überoxidationsprodukt von 23-Hydroxymarnerol detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für CYP705A12 keine katalytische Aktivität nachgewiesen werden. In Substratbindestudien konnte allerdings ermittelt werden, dass das Diterpenoid Agatholal, das strukturelle Ähnlichkeiten zu Marnerol aufweist, an CYP705A12 bindet.

In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Oxidation der ausgewählten Triterpenoid-Grundgerüste α -Amyrin, β -Amyrin, Lupeol und Cycloartenol durch mutierte Varianten der bakteriellen CYP102A1 (P450-BM3) aus *Bacillus megaterium* behandelt. Dazu wurden nach Durchmusterung der institutseigenen P450-BM3-Mutantenbibliothek die identifizierten relevanten Aminosäurereste sowie weitere Aminosäurepositionen systematisch mutiert. Die

Mutante, die den höchsten Lupeol-Umsatz aufwies, wurde für Reaktionsoptimierungsversuche verwendet. Dabei konnte der Umsatz, vor allem durch Verwendung des Lösungsvermittlers (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin, auf ~98% gesteigert werden. Der Reaktionsmaßstab konnte darauffolgend vergrößert werden, sodass das Hauptprodukt isoliert und die Oxidationsposition durch NMR-Analysen aufgeklärt werden konnte. Dabei stellte sich heraus, dass durch die P450-BM3 V78G F87A I263G Dreifachmutante eine dreistufige Oxidation von Lupeol zu dem (nach bestem Wissen) noch nicht bekannten Lupeol-Derivat 3 β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure erfolgte. P450-BM3 V78G F87A I263G konnte auch zur Oxidation der weiteren Substrate α -Amyrin, β -Amyrin und Cycloartenol eingesetzt werden.

Abstract

Triterpenoids constitute a diverse group of natural products and show a multitude of interesting biological activities. The biotechnological production of triterpenoids is of interest, because these compounds are often isolated from plants in low amounts. In nature, cytochrome P450 monooxygenases (P450s or CYPs) catalyze the first oxidative functionalization steps of triterpenoid scaffolds in a selective manner. In this study, triterpenoid-specific plant P450 monooxygenases were characterized. Furthermore, the potential of engineered bacterial P450 monooxygenases for the oxidation of plant triterpenoids was evaluated.

In the first part of this study, CYP71A16 and CYP705A12 from *Arabidopsis thaliana* that have not been previously biochemically characterized, were produced recombinantly in *Escherichia coli* and were subsequently characterized. Both *cyp* genes are located in an operon-like gene cluster together with the gene encoding the marnerol synthase on *Arabidopsis thaliana* genome. CYP71A16 was known to hydroxylate the triterpenoids marnerol and marnerol at position 23 *in planta* and in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. In this study, N-terminal altered versions of both P450 enzymes could be produced with high titers of 52 mg/L and 33 mg/L (CYP71A16 and CYP705A12) and were subsequently purified. A bacterial redox partner system consisting of YkuN from *Bacillus subtilis* and Fpr from *E. coli* were proved as more appropriate in *in vitro* experiments with CYP71A16 than the cytochrome P450 reductase ATR2 from *A. thaliana*. For the CYP71A16 catalyzed oxidation of marnerol to 23-hydroxymarnerol a K_M value of 142 μM and a K_{cat} value of 3.9 min^{-1} could be determined. Furthermore substrate binding studies were recorded and a dissociation constant for CYP71A16 of 225 μM was established. Using GC/MS analysis an up to now not detected overoxidation product of 23-hydroxymarnerol was detected. No catalytic activity of CYP705A12 could be determined within the framework of this study. However, substrate binding studies revealed that the diterpenoid agatholal, that shows structural similarities to marnerol, was binding to CYP705A12.

In the second part of this study, oxidation of the selected triterpenoid scaffolds α -amyrin, β -amyrin, and cycloartenol catalyzed by CYP102A1 (P450-BM3) variants from *Bacillus megaterium* was examined. For this purpose, the relevant amino acids that were identified in a screening of the P450-BM3 mutant library available at the institute, as well as further positions were systematically mutated. The P450-BM3 variant that led to the highest lupeol conversion was used for reaction optimization. Lupeol conversion could be increased to ~98%, especially due to better substrate solubilization using (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin. The reaction volume was increased and the position of oxidation of the main

product was solved by NMR. It was proved that the P450-BM3 triple mutant V78G F87A I263G catalyzed the three-step oxidation of lupeol to the (to the best of one's knowledge) not yet known lupeol derivative 3 β -hydroxylup-20(29)-en-24-oic acid. P450-BM3 V78G F87A I263G could be also applied for the oxidation of the further substrates α -amyrin, β -amyrin and cycloartenol.

1 Einleitung

1.1 Triterpene und Triterpenoide

Terpene bilden eine große Gruppe von Naturprodukten und lassen sich je nach Kohlenstoffanzahl in Hemi- (C₅), Mono- (C₁₀), Sesqui- (C₁₅), Di- (C₂₀), Sester- (C₂₅), Tri- (C₃₀), Tetra- (C₄₀), und Polyterpene (5ⁿC) einteilen. Terpene bestehen aus Isopreneinheiten und werden aus der aktivierten Isoprenform Isopentenylpyrophosphat gebildet. Funktionalisierte Terpene werden als Terpenoide bezeichnet. Triterpene und Triterpenoide weisen zahlreiche biologische Eigenschaften, wie anti-karzinogene (Kassi *et al.* 2007; Li *et al.* 2005), entzündungshemmende (Banno *et al.* 2005; Banno *et al.* 2006), antimikrobielle (Mallavadhani *et al.* 2004; Mencherini *et al.* 2007) und antivirale (Baltina *et al.* 2003; Niedermeyer *et al.* 2005) Wirkungen auf. Sie können aber meist bedingt durch ihr häufig geringes Vorkommen in Pflanzen, lediglich in geringen Mengen durch Extraktion aus Pflanzen gewonnen werden (Moses *et al.* 2013). Durch die Komplexität der Triterpenoide ist eine chemische Synthese oft nicht möglich bzw. aufwändig und vielschrittig. Das Triterpenoid Marnerol konnte beispielsweise in einer 16-schrittigen chemischen Synthese dargestellt werden (Corbu *et al.* 2009). Eine Möglichkeit, höhere Mengen an Triterpenoiden herzustellen, ist die Nutzung von mikrobiellen Wirten zur Rekonstitution der entsprechenden Biosynthesewege. Im Vergleich zu Mono- und Diterpenoid-Biosynthesewegen wurden Triterpenoidbiosynthese bisher selten rekonstituiert. Für die Rekonstitution von Triterpenoid-Biosynthesewegen wird häufig die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* verwendet (Thimmappa *et al.* 2014). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Rekonstitution von Triterpenoid-Biosynthesewegen auch in *E. coli*, *Rhodobacter capsulatus* und *Synechocystis* sp. PCC 6803 möglich ist (Li *et al.* 2016; Loeschcke *et al.* 2017). Aufgrund ihres noch nicht ausgeschöpften Potenzials und vielen interessanten Eigenschaften sind Triterpenoide Thema der hier vorliegenden Arbeit.

1.1.1 Biosynthese

Triterpenoide werden, wie alle Terpene und Terpenoide, durch die repetitive Fusion von Isopreneinheiten gebildet. Die Bildung der Triterpenoide ist in Abbildung 1 gezeigt. Die Isopreneinheiten werden in Pflanzen über den Mevalonat-Weg gebildet. Aus zwei Molekülen Isopentenylpyrophosphat und einem Molekül Dimethylallyldiphosphat wird, katalysiert durch die Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPS), das C₁₅-Molekül Farnesylpyrophosphat gebildet. Zwei Moleküle von Farnesylpyrophosphat werden in einer Reaktion durch die Squalen-Synthase (SQS) zum C₃₀-Molekül Squalen kondensiert. Die typische Vorstufe für

Triterpenoide in Pflanzen, Pilzen und Tieren ist 2,3-Oxidosqualen, in Bakterien ist es hingegen das nicht oxyfunktionalisierte Squalen. Die genannten Vorstufen werden durch Zyklisierung, katalysiert durch spezialisierte Triterpen-Synthasen (auch Oxidosqualen-Cyclasen; OSCs), zu den verschiedenen Triterpenen bzw. Triterpenoiden umgesetzt.

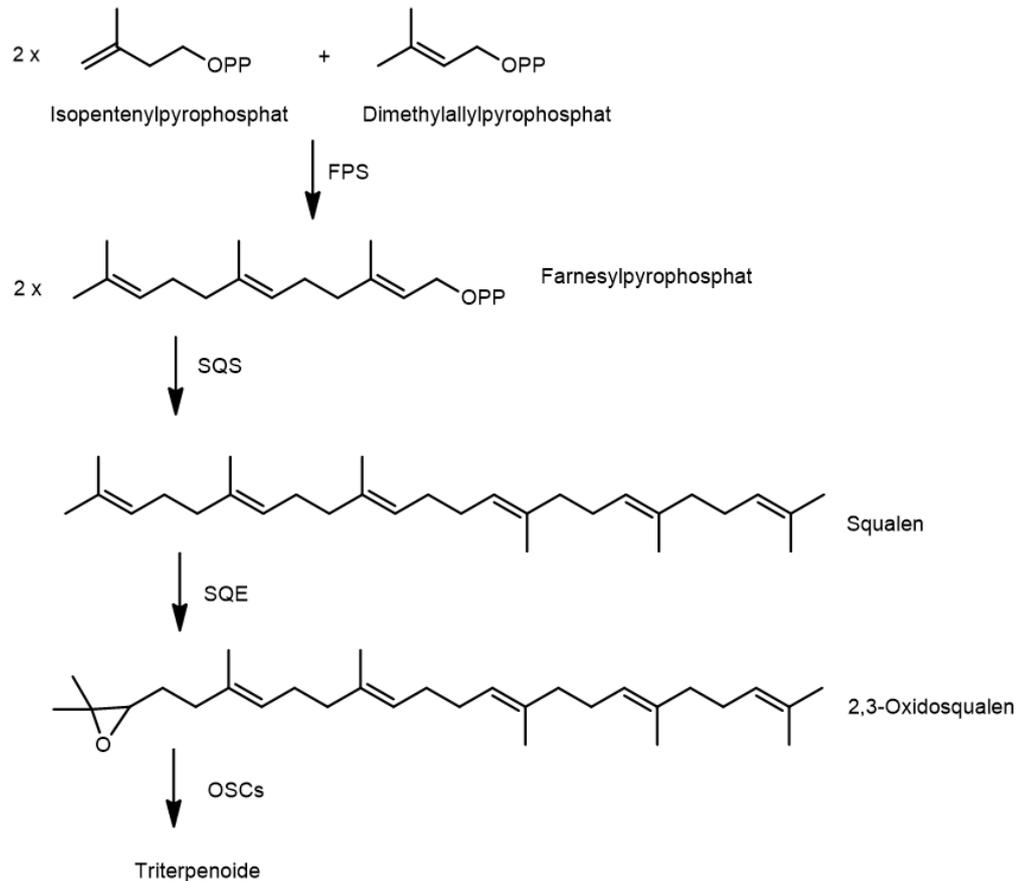


Abbildung 1. Bildung der Vorstufen der Triterpenoide. Das C₁₅-Molekül Farnesylpyrophosphat wird aus Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat durch die Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPS) gebildet. 2 Moleküle Farnesylpyrophosphat werden durch die Squalen-Synthase (SQS) kondensiert und Squalen gebildet. Dieses wird durch die Squalen-Epoxidase (SQE) zu 2,3-Oxidosqualen oxidiert. 2,3-Oxidosqualen dient als Substrat für spezifische Oxidosqualen-Cyclasen (OSCs), die die verschiedenen Triterpenoide synthetisieren.

In der komplexen Zyklisierungsreaktion wird 2,3-Oxidosqualen durch die OSC zunächst gebunden, vorgefaltet, protoniert und schließlich zyklisiert (Thimmappa *et al.* 2014). Dabei gibt es Triterpenoide, die über die Protosteryl-Kation-Zwischenstufe (via Sessel-Boot-Sessel-Konformation) gebildet werden. Dazu gehört in Pflanzen das steroidale Triterpenoid Cycloartenol, aus welchem sich die Steroide ableiten. Andere Triterpenoide, die keine Steroid-Vorläufer sind, wie beispielsweise die pentazyklischen Triterpenoide Lupeol sowie α - und β -Amyrin hingegen, werden in der Regel über die Dammarenyl-Kation-Zwischenstufe gebildet (über die Sessel-Sessel-Sessel-Konformation) (Thimmappa *et al.* 2014). Triterpenoide zeigen eine bemerkenswerte strukturelle Diversität, die von azyklischen, über mono-, bi-, tri-, tetra-, und pentazyklischen Molekülen bis hin zu hexazyklischen Strukturen

reicht (Xu *et al.* 2004). Die am häufigsten vorkommenden Triterpenoide umfassen pentazyklische Triterpenoide, die aus fünf Sechsringen bzw. vier Sechsringen und einem Fünfring bestehen, sowie tetrazyklische Triterpenoide, die ein steroidales Gerüst mit drei Sechsringen und einem Fünfring aufweisen (Xu *et al.* 2004).

Die Iridale sind eine weitere, in dieser Arbeit thematisierte, Gruppe von Triterpenoiden. Die typische Struktur der Iridale umfasst mono- oder bityklische Moleküle. Benachbart an einem zentralen B-Ring befindet sich eine Formylgruppe, eine C₃-Seitenkette und quartäre C-Atome (Corbu *et al.* 2008). Die Iridale wurden in Schwertliliengewächsen (Iridaceae) gefunden (Marner und Longerich 1992; Marner 1997). Eine Ausnahme stellt das durch die *A. thaliana* Marneral-Synthase synthetisierte iridale Triterpenoid Marneral dar (Xiong *et al.* 2006). Marneral wird unüblicherweise über die Sessel-Boot-Konformation aus 2,3-Oxidosqualen gebildet (Xiong *et al.* 2006). Marneral und der Alkohol Marnerol wurden im Jahr 2006 nach Dr. Franz-Josef Marner benannt, der jahrelang die Iridale erforschte (Marner *et al.* 1988; Marner und Longerich 1992; Marner 1997; Xiong *et al.* 2006).

1.1.2 Funktionen und biologische Aktivitäten

Triterpenoide sind in Pflanzen in Prozesse des Pflanzenwachstums und die Entwicklung involviert, wie beispielsweise anhand der Bildung und Modifikation des Triterpenoids Marneral in *A. thaliana* gezeigt wurde (Go *et al.* 2012). Hierbei wurden *A. thaliana* knock-out-Mutanten des Marneral-Synthase Gens hergestellt; dies führte zu einer Wachstumsverzögerung und der Ausbildung von abnormen Blattformen der Pflanze (Go *et al.* 2012). Auch nach der Überexpression dieses Gens und des Gens, das für die Marneral-oxidierende CYP71A16 codiert, wurden veränderte Phänotypen beobachtet (Field *et al.* 2011). In Wurzeln des Hafers konnte in Anwesenheit erhöhter Mengen an β -Amyrin demonstriert werden, dass das Triterpenoid ebenfalls eine Auswirkung auf das Wachstum und die Entwicklung aufwies, was anhand der Änderung der epidermalen Zellstruktur beobachtet wurde (Kemen *et al.* 2014). Triterpenoide können auch antimikrobielle Eigenschaften zeigen. Saponine zum Beispiel weisen antimykotische Eigenschaften auf, wie anhand einer Studie mit Saponin-defizienten Mutanten des Hafers *A. strigosa* gezeigt werden konnte. Die Mutanten waren empfindlicher gegenüber Pilzinfektionen als der Wildtyp (Papadopoulou *et al.* 1999). Das steroidale Triterpenoid Cycloartenol kann hingegen als Vorstufe für Membrankonstituenten und Steroidhormone dienen (Phillips *et al.* 2006).

In Pflanzen wurden in den letzten Jahren einige Operon-ähnliche Gencluster entdeckt, die für Proteine codieren, die in Triterpenoid-Biosynthesewege involviert sind. In diesem Zusammenhang sind die Marneral- und Thalianol-Gencluster in *A. thaliana* (Field und Osbourn 2008; Field *et al.* 2011), das Avenacin Cluster aus *Avena spp.* (Papadopoulou *et al.*

1999; Qi *et al.* 2004) und ein Gencluster aus *Lotus japonicus* anzuführen, in welchem Gene lokalisiert sind, die für Lupeol-modifizierende Proteine codieren (Krokida *et al.* 2013). Das Vorkommen von Genclustern könnte ein Hinweis für die Wichtigkeit und Bedeutung dieser Sekundärmetabolite in Pflanzen sein.

Zu den biologischen Aktivitäten von Triterpenoiden, die sich in der pharmazeutischen Industrie zu Nutze gemacht werden können, sind zahlreiche Beispiele zu nennen. Das pentazyklische Triterpenoid Lupeol zeigt unter anderem entzündungshemmende, antitumorale und chemo-präventive Eigenschaften (Gallo und Sarachine 2009). Auch die pentazyklischen Triterpenoide Betulinsäure, Oleansäure und Ursolsäure weisen eine Reihe an biologischen Aktivitäten auf (Liu 2005; Pisha *et al.* 1995; Yogeewari und Sriram 2005). Iridale besitzen biologische Eigenschaften wie neuroprotektive Charakteristika (Zhang *et al.* 2014), zytotoxische Effekte gegen humane Krebszelllinien (Fang *et al.* 2008), aber auch antimikrobielle Aktivitäten gegen Trypanosomen (Pathirana *et al.* 2016) und Wirksamkeit gegen Malaria (Benoit-Vical *et al.* 2003). Triterpenoide mit pentazyklischem Gerüst sowie iridal-Typ Triterpenoide mit ausgewählten biologischen Aktivitäten sind in Abbildung 2 dargestellt.

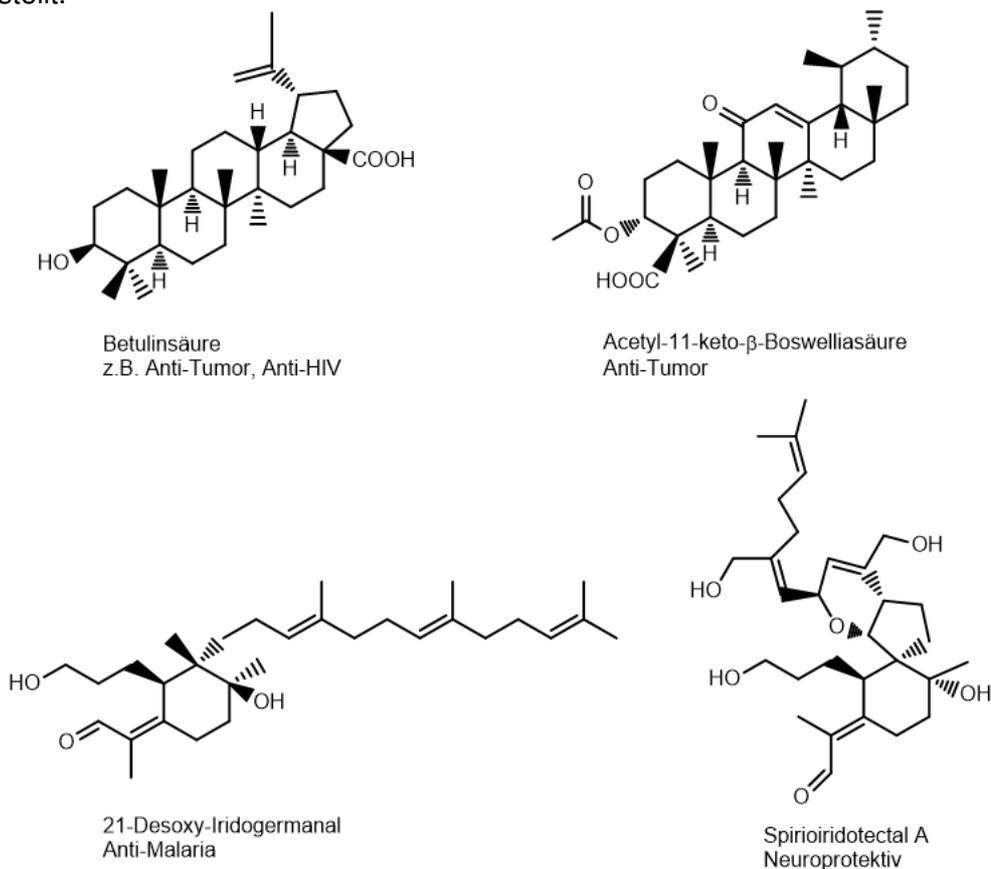


Abbildung 2. Die pentazyklischen Triterpenoide Betulinsäure und Acetyl-11-keto-β-Boswelliasäure sowie die Iridal-Triterpenoide 21-Desoxy-Iridogermanal und Spiroiridotectal A mit ausgewählten biologischen Eigenschaften (Benoit-Vical *et al.* 2003; Park *et al.* 2002; Salvador *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2014).

1.1.3 Oxyfunktionalisierung von Triterpenoiden durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Die Oxyfunktionalisierung der gebildeten Triterpenoid-Grundgerüste (s. Kapitel 1.1.1) wird in den ersten Schritten natürlicherweise durch P450-Enzyme katalysiert. Weitere Modifikationen der durch P450-Enzyme oxyfunktionalisierten Triterpenoide werden durch Glykosyltransferasen realisiert, die Zuckerreste anfügen und die sogenannten Saponine bilden (Augustin *et al.* 2011), die häufig in Pflanzen zu finden sind. Aglykone, also Triterpenoide ohne Glykosylgruppen, bzw. der nicht verzuckerte Teil der Saponine, werden im Gegensatz dazu als Sapogenine bezeichnet.

Die durch pflanzliche Cytochrom-P450-Monooxygenasen typischerweise katalysierten Umsetzungen von Triterpenoid-Substraten umfassen Hydroxylierungen, die Oxidation von Alkoholen zu Ketonen oder Aldehyden und die Weiteroxidation zu Carbonsäuren (Castillo *et al.* 2013; Field *et al.* 2011; Geisler *et al.* 2013; Seki *et al.* 2011; Seki *et al.* 2008; Shibuya *et al.* 2006). Oftmals sind verschiedene P450-Enzyme in die Modifikation eines Triterpenoid-Grundgerüsts involviert. Es wurde allerdings beschrieben, dass mehrschrittige Oxidationen an einem Kohlenstoffatom auch durch eine Cytochrom-P450-Monooxygenase katalysiert werden können, was bei einer dreischrittigen Oxidation zur Bildung von Carbonsäuren führen kann (s. Abbildung 3). Dies ist zum Beispiel bei der Oxidation von 11-oxo- β -Amyrin zur Glycyrrhetinsäure durch CYP72A154 (Seki *et al.* 2011) oder am Beispiel der Oxidation von β -Amyrin zur Oleansäure durch CYP716A12 gezeigt worden (Fukushima *et al.* 2011; Seki *et al.* 2011). Es konnte zudem in rekombinanter Hefe demonstriert werden, dass CYP716A12 auch die dem β -Amyrin strukturell sehr ähnlichen pentazyklischen Triterpenoide α -Amyrin und Lupeol an C-28 zu den entsprechenden Säuren Ursolsäure und Betulinsäure oxidiert (Fukushima *et al.* 2011).

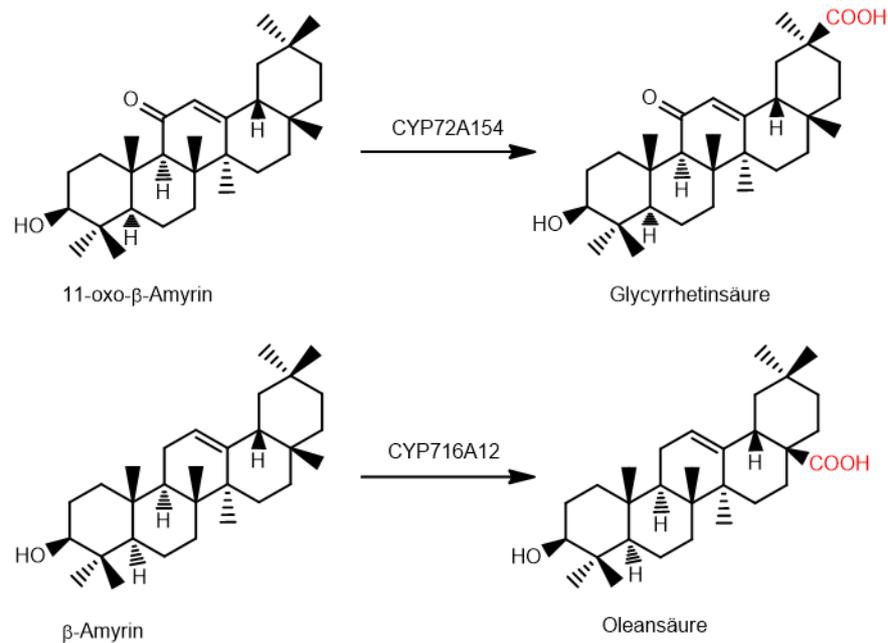
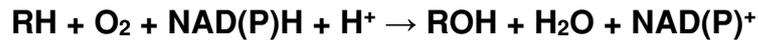


Abbildung 3. Oxidation der Triterpenoide 11-oxo-β-Amyrin durch CYP72A154 zu Glycyrrhetinsäure (Seki *et al.* 2011) und β-Amyrin durch CYP716A12 zu Oleansäure (Fukushima *et al.* 2011).

1.2 Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Cytochrom-P450-Monooxygenasen (P450 oder CYP), die im aktiven Zentrum als prosthetische Gruppe ein Häm *b* enthalten, gehören zu der Enzymklasse der Oxidoreduktasen (E.C. 1.14.X.X) und katalysieren Oxidationsreaktionen, in denen ein Atom von molekularem Sauerstoff (O₂) auf das Substrat (RH) übertragen wird, wobei das andere Atom zu Wasser (H₂O) reduziert wird (s. Schema 1). Die zwei für die Reaktion benötigten Reduktionsäquivalente werden von Nikotinamidkofaktoren, typischerweise über Redoxpartnerproteine, auf die Cytochrom-P450-Monooxygenase übertragen. Die verschiedenen P450-Systeme werden in Kapitel 1.2.3 näher beschrieben. Cytochrom-P450-Monooxygenasen kommen in allen Lebensdomänen und Viren vor. Eine Besonderheit der P450-Enzyme ist, dass das Häm *b* axial über ein konserviertes Cystein an das Protein gebunden ist und nicht, wie sonst bei Häm-Proteinen üblich, über ein Histidin. Die Koordination des Cysteins an das Häm führt bei Cytochrom-P450-Monooxygenasen dazu, dass sie im reduzierten Zustand bei Bindung von Kohlenstoffmonoxid ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 450 nm ausbilden (Omura und Sato 1964a, 1964b). Diese besondere Eigenschaft war namensgebend für die Cytochrom-P450-Monooxygenasen. P450-Enzyme katalysieren eine Reihe an Reaktionen, beispielsweise Hydroxylierungen, Epoxidierungen und Dealkylierungen (Urlacher und Girhard 2012).



Schema 1. Allgemeine Hydroxylierungsreaktion, die durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysiert wird.

1.2.1 Klassifizierung von Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Das erste System zur Einteilung und Ordnung von P450-Enzymen wurde bereits 1987 vorgeschlagen (Nebert *et al.* 1987). Zu dieser Zeit waren 65 P450-codierende Gene bekannt. Diese Klassifizierung wurde aufgrund neuer Entdeckungen von P450-Enzymen darauffolgend aktualisiert (Nebert *et al.* 1989; Nebert *et al.* 1991) und schließlich 1993 erneut überarbeitet (Nelson *et al.* 1993). Die allgemeine Nomenklatur von P450-Enzymen ist so aufgebaut, dass CYP für Cytochrom-P450-Monooxygenase steht und die darauffolgende Zahl (z.B. CYP71) die Familie bezeichnet (s. Abbildung 4). Zu einer P450-Familie gehören diejenigen P450-Enzyme, die mindestens 40 % Sequenzidentität aufweisen. Des Weiteren werden diese Familien in Subfamilien eingeteilt. Proteine mit einer Sequenzidentität von mindestens 55% gehören demnach zu einer Subfamilie, was an einem gemeinsamen Buchstaben zu erkennen ist. Die auf den Buchstaben folgende Zahl kennzeichnet die individuelle Cytochrom-P450-Monooxygenase, also die Isoform. Die Reihenfolge dieser Zahlen wird nach der Reihenfolge der Entdeckung des jeweiligen P450-Enzyms vergeben (Nelson *et al.* 1993).

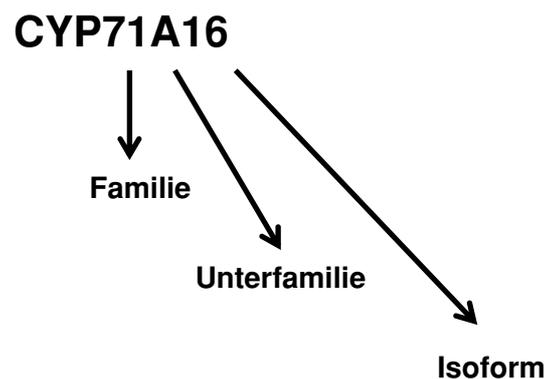


Abbildung 4. Nomenklatur der Cytochrom-P450-Monooxygenasen. Unterteilung in Familien, Unterfamilien und Isoformen.

1.2.2 Katalysemechanismus

Der allgemeine Katalysemechanismus von Cytochrom-P450-Monooxygenasen zur Substrathydroxylierung und vorkommende Nebenreaktionen sind in Abbildung 5 dargestellt. Im Grundzustand liegt das Hämeisen als Fe^{III} vor (1). Das axial an das Häm gebundene

H₂O-Molekül wird durch die Substratbindung verdrängt (2) und das Redoxpotential auf circa 300 mV erhöht (Ortiz de Montellano 2010). Diese Erhöhung kommt dadurch zustande, dass das Fe^{III} vom *low-spin* in den *high-spin* Zustand übergeht (Sligar 1976). In Folge dessen kann ein Elektron durch das Redoxpartnersystem, ausgehend von dem Nikotinamidkofaktor, auf die P450 übertragen werden, wobei das Fe^{III} zu Fe^{II} reduziert wird (3) (Sligar 1976). Die reduzierte Cytochrom-P450-Monooxygenase ist nun in der Lage molekularen Sauerstoff (O₂) zu binden, wodurch der sogenannte Eisen^{III}-Superoxid-Komplex entsteht (4). Durch die Übertragung eines zweiten Elektrons wird der Eisen^{III}-Peroxidation-Komplex gebildet (5). Anschließend entsteht durch die sequentielle Übertragung von zwei Protonen zunächst der Eisen^{III}-Hydroperoxo-Komplex (auch *compound 0*, 6). Hiernach wird schließlich H₂O abgespalten (7). Der nun vorliegende radikalische Zustand wird auch als *compound I* bezeichnet. Ein Proton wird vom Substrat abstrahiert, woraus eine radikalische Zwischenstufe des Substrates resultiert. Dieser Komplex wird auch als *compound II* bezeichnet (8). Durch eine Umlagerung (*rebound mechanism*) wird schließlich das Substrat hydroxyliert (9) und dissoziiert vom Enzym. Infolge dessen lagert sich wieder H₂O an und der Ausgangszustand wird wiederum eingenommen (1).

Die oben beschriebene Änderung des *spin*-Zustandes vom *low-spin* in den *high-spin* Zustand des Häm-Eisens (2) resultiert in einer Verschiebung des Absorptionsspektrums von 415-417 nm auf 390-394 nm (Luthra *et al.* 2011). Substratbindung durch P450-Enzyme kann folglich durch die Änderung der optischen Eigenschaften verfolgt werden. Im Folgenden sind die drei Arten von Bindespektren beschrieben (Jefcoate 1978; Schenkman *et al.* 1967). Bei der Bindung eines P450-Substrates kommt es üblicherweise zu einer Ausbildung eines Typ I-Spektrums. Das Typ I-Bindespektrum weist ein Absorptionsmaximum bei ~385 nm und ein Absorptionsminimum bei ~420 nm auf. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums des P450-Enzyms kommt durch die Verdrängung des axialen Wasserliganden des Hämeisens durch das Substrat zustande. Bei einem Typ II-Spektrum bildet sich ein Absorptionsminimum bei 390 und 410 nm und ein Maximum bei 425-435 nm aus. Bei diesem Typ bindet ein Ligand direkt an das Hämeisen. Die Ausbildung eines solchen Komplexes steht für die Bindung eines Inhibitors (Isin und Guengerich 2008). Als dritte Art von Bindespektrum ist das reverse Typ I-Spektrum zu nennen. Es zeichnet sich durch ein Absorptionsmaximum bei ~420 nm und ein Minimum bei ~385 nm aus. Ein möglicher Grund für die Ausbildung eines solchen Spektrums ist, dass die zu messende P450-Lösung Spezies im *high spin*-Zustand, beispielsweise durch die Bindung eines Substratanalogons, enthält, die bei Bindung des zu testenden Substrates in den *low spin*-Zustand übergeht (Luthra *et al.* 2011).

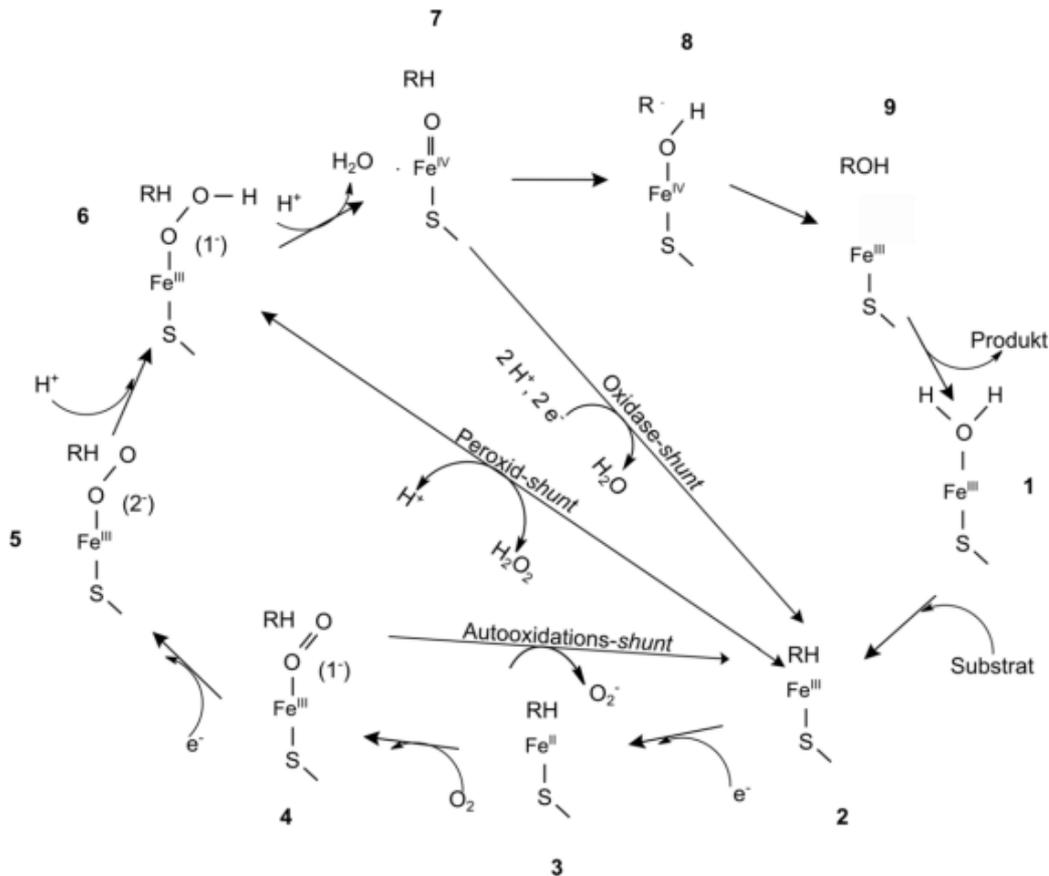


Abbildung 5. Katalysemechanismus von Cytochrom-P450-Monooxygenasen zur Hydroxylierung eines Substrates. Verändert nach Krest *et al.* 2013.

Der vorher beschriebene Katalysemechanismus läuft nicht immer auf dem direkten Wege ab. Sogenannte *shunt*-Reaktionen (Entkopplungsreaktionen) führen dazu, dass nicht alle Reduktionsäquivalente zur Substratoxidation verwendet werden, sondern in Nebenreaktionen verbraucht werden (s. Abbildung 5). Dabei dissoziiert der gebundene Sauerstoff vom Enzym und Komplex 2 wird wiederum gebildet. Bei dem Autooxidations-*shunt* dissoziiert ein Superoxidanion von Komplex 4. Beim Peroxid-*shunt* wird Wasserstoffperoxid gebildet und bei der dritten möglichen Konkurrenzreaktion, dem Oxidase-*shunt*, wird der Sauerstoff zu Wasser reduziert. Häufig wird in P450-katalysierten Reaktionen das Enzym Katalase eingesetzt, um das im Peroxid-*shunt* gebildete H_2O_2 zu den unschädlichen Spezies Wasser und Sauerstoff umzusetzen. Die Aktivität eines P450-Enzyms lässt sich also nicht direkt über den Verbrauch des Kofaktors bestimmen, da dieser häufig nicht direkt mit der Oxidation des Substrates korreliert. Oft wird für Cytochrom-P450-Monooxygenasen die sogenannte Kopplungseffizienz bestimmt; sie ist das Verhältnis zwischen der molaren Konzentration des verbrauchten Kofaktors und der molaren Konzentration der Produkte.

1.2.3 Redoxpartnersysteme der Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Cytochrom-P450-Monooxygenasen wurden in verschiedene Klassen, basierend auf deren Redoxpartnern, eingeteilt. Insgesamt konnten mit der wachsenden Zahl an bekannten P450-Enzymen schon zehn verschiedene Klassen beschrieben werden (Hannemann *et al.* 2007). Im Folgenden werden die drei Haupttypen von P450-Systemen erläutert (Urlacher und Girhard 2012). Zunächst ist das Drei-Komponenten-System zu nennen, das neben dem P450-Enzym aus einer FAD-haltigen Reduktase und aus einem Ferredoxin (2Fe-2S Eisen-Schwefel-Protein) oder auch einem FMN-haltigen Flavodoxin besteht (s. Abbildung 6A). In Bakterien sind die Proteine des Systems löslich im Cytosol lokalisiert, während in eukaryotischen Mitochondrien nur das Ferredoxin löslich vorliegt und die anderen beiden Komponenten des Systems, die Reduktase und die Cytochrom-P450-Monooxygenase, an die innere Mitochondrienmembran gebunden sind (Hannemann *et al.* 2007). Neben dem Drei-Komponenten-System gibt es ein Zwei-Komponenten-System, das sich aus einer diflavinhaltigen CPR (Cytochrom-P450-Reduktase) und der Cytochrom-P450-Monooxygenase zusammensetzt (s. Abbildung 6B). Dieses System, das typischerweise in Eukaryoten zu finden ist, liegt üblicherweise in membrangebundener Form im endoplasmatischen Retikulum vor. In mikrosomalen P450-Systemen wurden oftmals eine Vielzahl an P450-Genen und vergleichsweise wenig Redoxpartnergene in Form von CPR-Genen gefunden. Es ist daher anzunehmen, dass die Reduktasen mit einer Vielzahl von Cytochrom-P450-Monooxygenasen interagieren und in der Lage sind, Elektronen an verschiedene P450-Enzyme zu übertragen. So wurden in dem pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* 245 P450-Gene gefunden (Nelson und Werck-Reichhart 2011), wohingegen es nur zwei funktionelle CPRs, ATR1 und ATR2 und eine putative CPR gibt (Urban *et al.* 1997; Varadarajan *et al.* 2010). Das dritte hier beschriebene System, ist das Ein-Komponenten-System (s. Abbildung 6C), bei dem die CPR-ähnliche Domäne und die P450-Domäne über eine kurze Linkerregion fusioniert sind. Das Fusionsprotein kann sowohl löslich als auch membrangebunden vorliegen. Das am besten untersuchte Protein dieser Klasse ist die lösliche CYP102A1 (P450-BM3) aus *Bacillus megaterium* (Miura und Fulco 1974; Narhi und Fulco 1986, 1987). P450-BM3 ist natürlicherweise eine Fettsäure-Hydroxylase; bis heute wurden durch Proteinengineering jedoch zahlreiche Mutanten dieses P450-Enzyms hergestellt und das Substratspektrum somit beträchtlich erweitert (s. Kapitel 1.2.5.1).

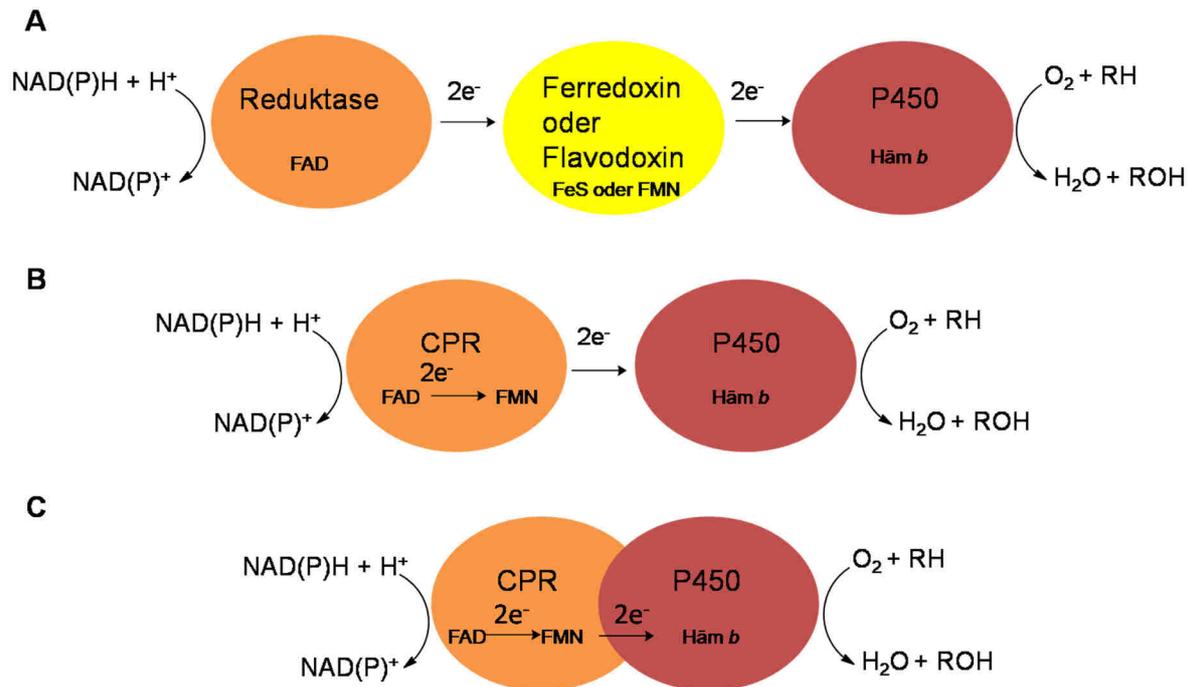


Abbildung 6. Schematische Darstellung von Cytochrom-P450-Monooxygenase Elektronentransfersystemen. A) Elektronentransfersystem bestehend aus drei Komponenten; einer FAD-haltigen Reduktase, einem Eisen-Schwefel-haltigem Ferredoxin oder einem FMN-haltigen Flavodoxin und der Cytochrom-P450-Monooxygenase. B) Zwei-Komponenten-System, bei dem die Komponenten meist membrangebunden sind, bestehend aus einer FAD/FMN-haltigen CPR und der Cytochrom-P450-Monooxygenase. C) Ein-Komponenten-System bestehend aus einer CPR-Domäne, die FAD/FMN-haltig ist und der P450-Domäne. CPR: Cytochrom-P450-Reduktase, P450: Cytochrom-P450-Monooxygenase, FAD: Flavinadenindinukleotid, FMN: Flavinadeninmononukleotid, FeS: Eisen-Schwefel-Cluster, RH: Substrat, ROH: Hydroxyliertes Produkt. Verändert nach Urlacher und Girhard 2012.

1.2.4 Pflanzliche Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Pflanzliche Cytochrom-P450-Monooxygenasen sind in großer Vielzahl zu finden und lassen sich mit ihren natürlichen Redoxpartnern normalerweise in die Zwei-Komponenten-Systeme einordnen (s. Kapitel 1.2.3). Dabei sind sie typischerweise über N-terminale Sequenzen in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert. Die erste pflanzliche P450-Sequenz wurde 1990 veröffentlicht, sie wurde in der Avocadopflanze gefunden und als CYP71A1 bezeichnet (Bozak *et al.* 1990). Die Nummerierung der pflanzlichen Cytochrom-P450-Monooxygenasen beginnt demnach bei CYP71A1 und endet zunächst bei CYP99XY, um ab CYP701A1 fortgeführt zu werden (Werck-Reichhart *et al.* 2002). Die Klassifizierung pflanzlicher P450-Enzyme kann hauptsächlich in zwei Typen erfolgen: in die A-Typ Cytochrom-P450-Monooxygenasen und die nicht-A-Typ Cytochrom-P450-Monooxygenasen (Durst und Nelson 1995). Bei den A-Typ P450-Enzymen handelt es sich dabei vorrangig um die P450, die in die Biosynthese von Sekundärmetaboliten involviert sind. Diesem Typ sind die meisten pflanzlichen P450-Enzyme zugeordnet (Bak *et al.* 2011; Durst und Nelson 1995).

Bei den nicht-A-Typ Cytochrom-P450-Monooxygenasen hingegen handelt es sich um eine Gruppe, die viele unterschiedliche Familien von P450-Enzymen beinhaltet (Durst und Nelson 1995). Die Funktionen der nicht-A-Typ P450 scheinen generell eher dem Primärmetabolismus und konservierten Funktionen der Signalgebung und Entwicklung zugeordnet zu sein (Werck-Reichhart *et al.* 2002). Pflanzliche P450-Enzyme werden unter anderem außerdem in sogenannte *Clans* eingeteilt. Dies geschah, um die Klassifizierung, aufgrund der vielen unterschiedlichen P450-Familien, übersichtlich zu halten. *Clans* sind auf phylogenetischen Bäumen geclustert (Nelson 2006), wobei jeder *Clan* einen gemeinsamen Gen-Vorfahren hat (Nelson und Werck-Reichhart 2011). Der CYP71 *Clan*, der alle A-Typ Cytochrom-P450-Monooxygenasen umfasst, ist in vaskulären Landpflanzen zu finden, zu denen auch der Modellorganismus *A. thaliana* zählt. Dieser *Clan* stellt den größten P450-*Clan* dar und umfasst verschiedene P450-Familien (Nelson *et al.* 2004).

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, sind pflanzliche Cytochrom-P450-Monooxygenasen oft in die Oxidation von Sekundärmetaboliten involviert. P450_{TYR} (CYP79) aus *Sorghum bicolor* ist beispielsweise in die Oxidation von cyanogenischen Glykosiden, nämlich in den Biosyntheseweg von Dhurrin involviert und katalysiert die N-Hydroxylierung von Tyrosin zu *p*-Hydroxyphenylacetaldoxim (Halkier *et al.* 1995). CYP72A1 aus *Catharanthus roseus* und *Lonicera japonica* ist hingegen an der Indolalkaloid-Biosynthese beteiligt und katalysiert die oxidative Spaltung von Loganin zu Secologanin (Irmeler *et al.* 2000; Yamamoto *et al.* 2000). Wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, sind P450-Enzyme zudem unter anderem an der Oxyfunktionalisierung von Triterpenoiden beteiligt.

Pflanzen besitzen komplexe chemische Profile mit zahlreichen Naturstoffen, die beispielsweise zur Anlockung von Bestäubern, für die Kommunikation oder zur Abwehr von Feinden dienen (Morant *et al.* 2003). Pflanzliche Cytochrom-P450-Monooxygenasen stellen demnach ein interessantes Themengebiet dar. Das Ziel dabei ist, die P450-Enzyme zu identifizieren, zu charakterisieren und für den Pflanzenschutz aber auch für pharmakologische Zwecke oder zur Phytosanierung zu nutzen (Morant *et al.* 2003).

1.2.4.1 Heterologe Herstellung pflanzlicher P450-Enzyme in *Escherichia coli*

Da pflanzliche Cytochrom-P450-Monooxygenasen typischerweise N-terminal im endoplasmatischen Retikulum membrangebunden sind, ist die Expression der P450-Gene in bakteriellen Wirten, wie beispielsweise *Escherichia coli*, unter anderem wegen der fehlenden Kompartimentierung, mit Schwierigkeiten verbunden. Oft werden eukaryotische Systeme, wie beispielsweise die Hefe *S. cerevisiae*, zur heterologen Expression und anschließender Aufklärung der Funktion eukaryotischer P450-Enzyme verwendet. Eine biochemische

Charakterisierung mit gereinigtem Protein ist aber häufig aufgrund geringer Proteintiter schwierig. *E. coli* bietet mit seinen schnellen Wachstumsraten, schneller und einfacher Transformation und der Möglichkeit der kostengünstigen Kultivierung bis zu hohen Zellkonzentrationen viele Vorteile (Rosano und Ceccarelli 2014) und ist daher ein attraktiver Organismus, auch für die Herstellung von eukaryotischen P450-Enzymen. Die Produktion von membrangebundenen Proteinen kann jedoch durch das Fehlen eines ausgeprägten Membransystems in *E. coli* zur Bildung von *inclusion bodies* oder zur fehlenden Aktivität führen. Die heterologe Expression der Cytochrom-P450-Monooxygenase-Gene kann durch gezielte N-terminale Modifikation der Membrandomäne verbessert oder sogar erst ermöglicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch der ersten Aminosäure nach dem Start-Methionin durch ein Alanin (Codon GCT) die Genexpression positiv beeinflussen kann. Dies wurde zuerst bei der Expression des *lacZ*-Gens in *E. coli* beobachtet (Looman *et al.* 1987) und konnte später zur eukaryotischen P450-Genexpression in *E. coli* angewendet werden (Barnes *et al.* 1991; Haudenschild *et al.* 2000). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, Membrandomänen von eukaryotischen Cytochrom-P450-Monooxygenasen, die schon erfolgreich in *E. coli* hergestellt werden konnten, anstelle der kompletten oder einem Teil der Membrandomäne des zu exprimierenden Gens, anzufügen. Dabei kann beispielsweise die modifizierte Membrandomäne der bovinen CYP17A1 (Barnes *et al.* 1991) oder eine modifizierte Sequenz von CYP2C3 aus dem Hasen (Wachenfeldt *et al.* 1997) verwendet werden. Die genannten, modifizierten Sequenzen aus dem Rind und dem Hasen sind in Tabelle 1 dargestellt. Bei der ersten der beiden genannten Sequenzen handelt es sich um eine unpolare Sequenz, bei deren Anfügen anzunehmen ist, dass das Zielprotein membranständig in *E. coli* hergestellt wird. Die zweite genannte Sequenz enthält polare Aminosäuren, weshalb angenommen werden kann, dass das Zielprotein in löslicher oder lediglich membranassoziierter Form vorliegt.

Tabelle 1. Modifizierte N-terminale Sequenzen der CYP17A aus dem Rind (Barnes *et al.* 1991) und CYP2C3 aus dem Hasen (Wachenfeldt *et al.* 1997), die in dieser oder abgeänderter Form zur verbesserten heterologen Expression von eukaryotischen Cytochrom-P450-Monooxygenasen in *E. coli* eingesetzt werden können. Zusammengefasst in (Zelasko *et al.* 2013).

Aminosäuresequenz	Beschreibung
ALLLAVF	Modifizierter N-Terminus der CYP17A, unpolarer Charakter
AKKTSSKGK	Modifizierter N-Terminus der CYP2C3, polarer Charakter

Da die Arbeit mit pflanzlichen Cytochrom-P450-Monooxygenasen, wie oben beschrieben, aufwändig ist und nicht in allen Fällen mit einer erfolgreichen heterologen Herstellung von funktionellem Protein abgeschlossen werden kann, ist die Verwendung bakterieller

Cytochrom-P450-Monooxygenasen eine Alternative. Bakterielle Cytochrom-P450-Monooxygenasen konnten bereits in einigen Fällen zur Triterpenoid-Oxidation eingesetzt werden. Dazu ist die CYP106A2 aus *B. megaterium* zu nennen, die unter anderem in der Lage ist, das pentazyklische Triterpenoid 11-keto- β -Boswelliasäure an der Position C-15 (Bleif *et al.* 2012) und das tetrazyklische Dipterocarpol an den Positionen C-7 und C-11, zu hydroxylieren (Schmitz *et al.* 2012). P450_{moxA} aus dem Actinomyceten *Nonomuraea recticatena*, kann mit einem rekonstituierten Redoxpartnersystem aus *Pseudomonas putida* zur Oxidation von Oleansäure an Position C-30 verwendet werden (Fujii *et al.* 2006).

1.2.5 CYP102A1 (P450-BM3) aus *Bacillus megaterium*

CYP102A1 (P450-BM3) aus dem gram-positiven Bakterium *Bacillus megaterium* zählt zu einer der am besten untersuchten Cytochrom-P450-Monooxygenasen. P450-BM3 wurde erstmals 1974 als Fettsäurehydroxylase beschrieben. Die natürlichen Fettsäure-Substrate werden subterminal durch P450-BM3 hydroxyliert. Das 119 kDa große Protein (Narhi und Fulco 1986) bietet vor allem den Vorteil, dass es ein natürliches Fusionsprotein, bestehend aus einer Diflavin-Reduktase-Domäne und einer P450-Domäne ist, wodurch es unabhängig von weiteren Redoxpartnern katalytisch eigenständig ist. Bei diesem P450-System handelt es sich um ein Ein-Komponenten-System (s. Kapitel 1.2.3). Dies macht die heterologe Expression sowie weitere Prozess- und Anwendungsschritte einfacher als bei Multi-Komponenten-Systemen. Des Weiteren weist P450-BM3 eine sehr hohe Aktivität auf, was mit dem Substrat Arachidonsäure und dem Wildtyp-Enzym gezeigt wurde. Hierbei konnte eine katalytische Konstante (k_{cat}) von knapp 17000 min^{-1} bestimmt werden (Noble *et al.* 1999). Die Kristallstruktur der Monooxygenase-Domäne wurde erstmals im Jahr 1993 gelöst (Ravichandran *et al.* 1993). Einige Jahre später konnte eine Kristallstruktur mit dem gebundenen Substrat Palmitoleinsäure publiziert werden (Li und Poulos 1997). Durch die strukturellen Informationen wurde es ermöglicht, durch rationales Proteinengineering, Varianten von P450-BM3 herzustellen, um nicht-physiologische Substrate umzusetzen. Das Proteinengineering von P450-BM3 wird im folgenden Kapitel 1.2.5.1 näher erläutert.

1.2.5.1 Proteinengineering von P450-BM3

Unter dem Begriff des Proteinengineerings versteht man die Entwicklung von Proteinen, meist Enzymen, mit veränderten, optimierten Eigenschaften. Im Falle von Enzymen ist es dabei das Ziel, die Aktivität, die Stabilität, die Regioselektivität, die Stereoselektivität oder die Chemoselektivität oder Kombinationen aus den genannten Faktoren zu ändern oder zu optimieren. Zum einen kann dabei die Strategie des rationalen Proteindesigns angewandt werden. Dazu werden anhand von Kenntnissen über die 3D-Struktur des Proteins, mittels

computerbasierten Modellierungsprogrammen, Vorhersagen über relevante Aminosäurepositionen getroffen und dementsprechend ortsgerichtet Mutationen eingeführt. Genaue Kenntnisse über das Enzym und die katalysierte Reaktion sind Voraussetzung für die Anwendung dieser Art des Proteinengineerings (Bornscheuer und Pohl 2001; Korendovych 2018). Ein Vorteil des rationalen Proteindesigns ist, dass eine übersichtliche Anzahl an Mutanten getestet werden soll. Zum anderen gibt es die Strategie der gerichteten Evolution, die eine natürliche Evolution im Labor nachbildet. Hierbei werden Mutantenbibliotheken vom Zielenzym mittels Zufallsmutagenese oder DNA-Rekombination hergestellt. Mit dem Ziel optimierte Mutanten zu generieren, werden die Mutanten mittels spezieller Hochdurchsatzmethoden durchmustert (Arnold 2015; Kuchner und Arnold 1997). Bei dieser Art des Proteinengineerings ist ein geeigneter Assay für ein Hochdurchsatzscreening für die jeweilige Reaktion erforderlich. Eine Kombination aus beiden oben genannten Methoden des Proteinengineering ist das semirationale Proteindesign, hierbei werden sich Informationen über das Protein zunutze gemacht und darauf basierend Mutantenbibliotheken, mit einer beschränkten Anzahl an Mutanten, generiert und durchmustert (Lutz 2010). Wie schon erwähnt, sind von der bakteriellen P450-BM3 Kristallstrukturen bekannt, die Informationen hinsichtlich der Optimierung des Enzyms in Bezug auf unterschiedliche Substrate liefern. Zu den mittels verschiedener generierter P450-Varianten akzeptierten Substraten gehören unter anderem Alkane (Peters *et al.* 2003; Weber *et al.* 2011), polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Carmichael und Wong 2001; Li *et al.* 2001), Steroide (Kille *et al.* 2011; Lewis *et al.* 2010; Lussenburg *et al.* 2005; Vottero *et al.* 2011) sowie Terpene (Le-Huu *et al.* 2015; Seifert *et al.* 2009; Sowden *et al.* 2005; Urlacher *et al.* 2006; Watanabe *et al.* 2007).

In zahlreichen Arbeiten wurden P450-BM3-Mutanten hergestellt, die in der Lage sind auch große, sperrige Substrate zu akzeptieren. Eine Auswahl von Terpenoid-Strukturen, die durch P450-BM3-Mutanten umgesetzt werden können, ist in Abbildung 7 dargestellt. So gelang es, Mutanten zur Oxidation des Sesquiterpenlactons Parthenolid an den Positionen C9 und C14 zu ermitteln (Kolev *et al.* 2014). Für das Sesquiterpenlacton Artemisinin, das zur Malaria-Behandlung eingesetzt werden kann, konnten durch eine systematische rationale Mutagenisierungsstrategie, P450-BM3-Mutanten identifiziert werden, die das Molekül an den Positionen C6a und C7 oxidieren (Zhang *et al.* 2012). Darüber hinaus gelang es P450-BM3-Mutanten für die regio- und stereoselektive Oxidation des makrozyklischen Diterpenoids β -Cembrenliol (Le-Huu *et al.* 2015) oder des Steroids Testosteron (Acevedo-Rocha *et al.* 2018; Kille *et al.* 2011) zu identifizieren.

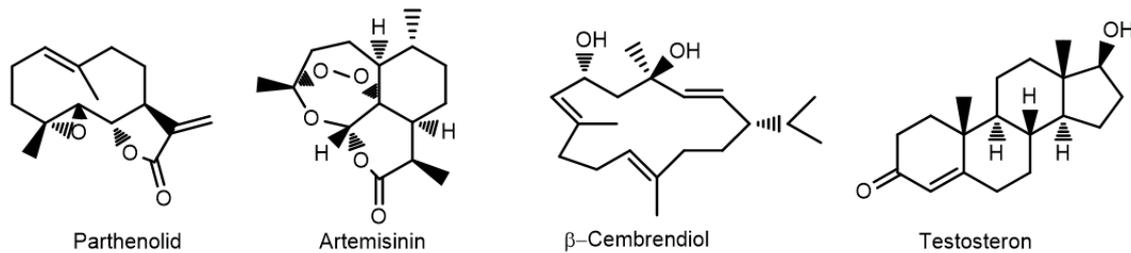


Abbildung 7. Strukturen der von P450-BM3-Varianten akzeptierten Terpenoid-Substraten Parthenolid, Artemisinin, β -Cambrenediol und Testosteron.

Einen Überblick über relevante Aminosäurereste von P450-BM3, die für das Proteinengineering verwendet wurden, ist in der Übersicht von Whitehouse *et al.* zusammengefasst (Whitehouse *et al.* 2012). Eine Schlüsselposition stellt Phenylalanin 87 dar, das in das Lumen des Substrateingangskanals ragt und in der Nähe des Häm-Eisens lokalisiert ist (Whitehouse *et al.* 2012). Diese Aminosäure wurde am häufigsten mutiert (Whitehouse *et al.* 2012) und es konnte anhand von zahlreichen Studien gezeigt werden, dass der Austausch dieses Phenylalanins gegen kleinere Aminosäuren dazu führt, dass auch größere, sperrigere Substrate akzeptiert werden können. Oftmals werden in Mutagenese-Durchmusterungen F87 Varianten als Ausgangsvarianten für weitere einzufügende Aminosäuresubstitutionen an anderen Positionen verwendet (Kille *et al.* 2011; Le-Huu *et al.* 2015). Weitere bedeutende Aminosäurereste liegen ebenfalls in der Nähe des Häm-Eisens und werden auch als Aminosäurereste der ersten Sphäre bezeichnet (Kolev *et al.* 2014).

1.3 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten pflanzliche Triterpenoide mittels Cytochrom-P450-Monooxygenasen oxidiert werden. Triterpenoide sind pflanzliche Naturstoffe, die aufgrund ihrer Vielfalt und Komplexität sowie zahlreicher biologischer Eigenschaften (s. Kapitel 1.1.2) von Interesse sind. Die Arbeit sollte dabei zwei Teile beinhalten: zum einen die Charakterisierung pflanzlicher Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus einem *A. thaliana* Triterpenoid-Biosyntheseweg und zum anderen die Oxidation von Triterpenoiden mittels Mutanten der bakteriellen P450-BM3 aus *B. megaterium*. Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Exzellenzclusters CEPLAS (*Cluster of Excellence on Plant Sciences*, Projektreferenznummer EXC 1028) gefördert. In Kooperation mit dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie (Forschungszentrum Jülich, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und dem Institut für Synthetische Mikrobiologie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) sollten biosynthetische Wege in Mikroorganismen rekonstituiert werden, wobei der Teil der Charakterisierung und Identifikation von P450-Enzymen Aufgabe dieser Arbeit war. Der Marneral/Marnerol-Metabolismus war von besonderem Interesse für die Projektpartner des Botanischen Institutes der Universität zu Köln und wurde von diesen vorgeschlagen.

l) Charakterisierung und Nutzung von pflanzlichen Cytochrom-P450-Monooxygenasen zur Marnerol-Oxidation

In dem ersten Teil der Arbeit sollten zwei Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus *A. thaliana*, CYP71A16 und CYP705A12, thematisiert werden. Von der ersten genannten Cytochrom-P450-Monooxygenase ist bekannt, dass sie in den Marnerol-Metabolismus involviert ist (s. Abbildung 8). Von dem zweiten P450-Enzym, CYP705A12, wird eine Beteiligung am Marnerol-Metabolismus vermutet, da das Gen in diesem Gencluster lokalisiert ist (Field *et al.* 2011). Beide P450-Enzyme sollten charakterisiert werden. Dafür sollte zum einen CYP71A16, die bekanntermaßen Marneral und Marnerol zu den 23-Hydroxy-Derivaten oxidiert (Castillo *et al.* 2013; Field *et al.* 2011) *in vitro* charakterisiert und kinetische Parameter bestimmt werden. Zum anderen sollte CYP705A12 in *in-vitro*-Reaktionen auf Aktivität gegenüber dem aus der CYP71A16-katalysierten Reaktion hervorgegangenen Produkt 23-Hydroxymarnerol getestet werden. Außerdem sollten Substratbindespektren mit verschiedenen Substraten aufgenommen werden. Ziel dessen war es, mehr Hinweise auf die mögliche Funktion der CYP705A12 und das Substratspektrum von CYP71A16 zu erlangen. Um *in-vitro*-Tests mit beiden Cytochrom-P450-Monooxygenasen durchführen zu können, sollten die Enzyme zunächst in dem bakteriellen Organismus *E. coli* rekombinant hergestellt und anschließend gereinigt werden.

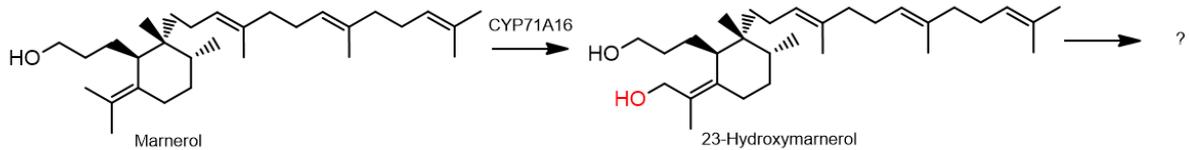


Abbildung 8. Marnerol und das durch CYP71A16 hydroxylierte 23-Hydroxymarnerol. Es ist bislang unbekannt ob und in welches Produkt 23-Hydroxymarnerol weiter umgesetzt wird.

II) Triterpenoid-Oxidation mittels Varianten der bakteriellen P450-BM3

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte eine vorher generierte P450-BM3-basierte Mutantenbibliothek für die Oxidation von pharmakologisch interessanten Triterpenoid-Substraten eingesetzt werden. Die adressierten Zielsubstrate umfassten die pentazyklischen Triterpenoide Lupeol, α - und β - Amyrin sowie das steroidale, tetrazyklische Cycloartenol (s. Abbildung 9). Nach Auswahl einer geeigneten Enzym-Variante, die möglichst selektiv das pentazyklische Triterpenoid Lupeol oxidiert und ein potentiell noch nicht beschriebenes Produkt synthetisiert, sollten zur Umsatzsteigerung Schritte der Reaktionsoptimierung für die *in-vitro*-Reaktion evaluiert werden. Außerdem sollten, durch eine Vergrößerung des Reaktionsmaßstabes, ausreichende Mengen des Zielprodukts hergestellt werden, um dieses mittels semi-präparativer HPLC zu isolieren und die Position und Art der Oxidation in nachfolgenden NMR-Analysen aufzuklären. Die neben Lupeol zu testenden Triterpenoid-Substrate sollten unter den mit dem Substrat Lupeol identifizierten optimierten Reaktionsbedingungen und den P450-BM3-Varianten mit dem höchsten detektierten Substratumsatz getestet werden. Dabei waren vor allem die Produktverteilungen und die Evaluierung, welcher Typ von Reaktion katalysiert wurde, von Interesse.

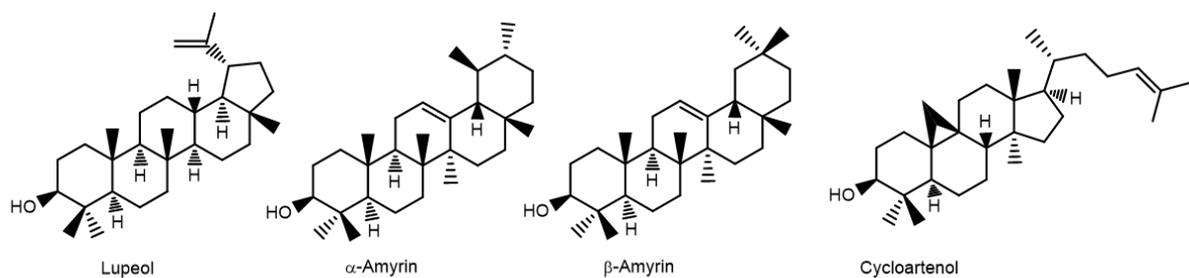


Abbildung 9. Strukturen der pentazyklischen Triterpenoide Lupeol, α -Amyrin und β -Amyrin sowie des tetrazyklischen Triterpenoids Cycloartenol.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien, Puffer und Enzyme wurden, wenn nicht anders angegeben, von Carl Roth, New England Biolabs, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific, VWR und Extrasynthese bezogen. Die zur Analyse eingesetzten Chemikalien wurden in hoher Reinheit verwendet (>99%), mit den Ausnahmen von β -Amyrin, das mit einer Reinheit von 98,9% und Cycloartenol, das mit einer Reinheit von $\geq 90\%$ eingesetzt wurde. Das in dieser Arbeit gereinigte und in Analysen verwendete Marnerol wies eine Reinheit von >98% auf.

2.2 Oligonukleotide, Plasmide, Bakterienstämme sowie Hefestamm

Tabelle 2. Verwendete Oligonukleotide (Primer) zur Amplifikation von DNA. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Nr.	Name	DNA Sequenz 5'→3'
1	CYP71A16_fw	GGAATT <u>CC</u> CATATGGAAATGATGATCCTGATCAGCCTG
2	CYP71A16_rv	CCCAAGCTTTTACGCGCTGCTCGGGAACACCA
3	CYP71A16_fw_ d8_bov	GGAATT <u>CC</u> CATATGGCTCTGTTATTAGCAGTTTTTCTGTGCCTGACCA CCTTCCTGAC
4	CYP71A16_fw_ d24_2C3	GGAATT <u>CC</u> CATATGGCTAAGAAAACGAGCTCTAAAGGGAAGCTGAAAC GCCCGAACAGCAACCTG
5	CYP71A16_rv_ XhoI_His	CCGCTCGAGCGCGCTGCTCGGGAACACCACC
6	CYP705A12lang	GGAATT <u>CC</u> CATATGGCCGAACCTGATCATCGTTGAC
7	CYP705A12_fw_ _d30_2C3	GGAATT <u>CC</u> CATATGGCTAAGAAAACGAGCTCTAAAGGGAAGAAAAAAC CGAAAGGCTTTGATCTGCC
8	CYP705A12_fw_ _d17bov	GGAATT <u>CC</u> CATATGGCTCTGTTATTAGCAGTTTTTCTGTGCCTGTTTAG CTTTCTGTGCTATGC
9	CYP705A12_rv	CCGCTCGAGTTAAAAGCTGAACGGATCAAAGCGCAC
10	705A12_C- his_XhoI	CCGCTCGAGTTAGTGATGATGATGATGATGAAAGCTGAACGGATCAA AGCGCAC
11	ATR2_Col0_Fw _NdeI_His	GGAATT <u>CC</u> CATATGCATCATCATCATCACTCAGGATCAGGTAACA GCAAAGAG
12	ATR2_Col0_Rv _HindIII	CCCAAGCTTTTACCACACATCTCTAAGGTAACG

Tabelle 3. Verwendete Oligonukleotide zur Mutagenese mittels QuikChange® PCR.

Nr.	Name	DNA Sequenz (5'→3')	Aminosäureaustausch
13	I263G_FW	GCTATCAAATTATTACATTCTTAGGTGCGGGACACGA AACAAAC	I263G
14	I263G_RV	GTTGTTTCGTGTCCCGCACCTAAGAATGTAATAATTT GATAGC	
15	I263A_FW	GCTATCAAATTATTACATTCTTAGCCGCGGGACACGA AACAAAC	I263A
16	I263A_RV	GTTGTTTCGTGTCCCGCGGCTAAGAATGTAATAATTT GATAGC	
17	L75G_FW	CTTAAGTCAAGCGGGTAAATTTGGACGTG	L75G
18	L75G_RV	CACGTCCAAATTTACCCGCTTGACTTAAG	
19	L75A_FW	CTTAAGTCAAGCGGCTAAATTTGGACGTG	L75A
20	L75A_RV	CACGTCCAAATTTAGCCGCTTGACTTAAG	
21	T260G_FW	GAACATTCGCTATCAAATTATTGGATTCTTAGGTGCG GGACACG	T260G
22	T260G_RV	CGTGTCCCGCACCTAAGAATCCAATAATTTGATAGCG AATGTTC	
23	T260A_FW	GAACATTCGCTATCAAATTATTGCATTCTTAGGTGCG GGACACG	T260A
24	T260_RV	CGTGTCCCGCACCTAAGAATGCAATAATTTGATAGCG AATGTTC	
25	A264G_FW	CATTCTTAGGTGGCGGACACGAAACAAC	A264G
26	A264G_RV	GTTGTTTCGTGTCCGCCACCTAAGAATG	
27	L437G_FW	GCTGGATATTAAGAAACTGGAACGTTAAACCTGAA GGC	L437G
28	L437G_RV	GCCTTCAGGTTTTAACGTTCCAGTTTCTTTAATATCCA GC	
29	L437A_FW	GCTGGATATTAAGAAACTGCAACGTTAAACCTGAA GGC	L437A
30	L437A_RV	GCCTTCAGGTTTTAACGTTGCAGTTTCTTTAATATCCA GC	

Tabelle 4. Verwendete Oligonukleotide zur Sequenzierung.

Name	DNA Sequenz (5' → 3')	Verwendung
pCW_f	CACACAGGAAACAGGATCAG	Sequenzierung MCS pCWori
pCW_r	GTATCACGAGGCCCTTTC	Sequenzierung MCS pCWori
ATR2_sr	CTCGAGATGCTGTAGAAG	Sequenzierung L-ATR2
ATR2o_S1	GAATATCGCGTCAGCATC	Sequenzierung L-ATR2
ATR2_col_sf1	CTGCTGTCCTGGAGTATA	Sequenzierung C-ATR2
R1_5	CCCAGCTTATGATGAAAAC	Sequenzierung P450-BM3
R2	GGAAAAGATCCAGAAACGGG	Sequenzierung P450-BM3
R3_5	CTTGGCGGTATTCCTTCAC	Sequenzierung P450-BM3
R5	TTCAATTTGTCGACAGCGCC	Sequenzierung P450-BM3
R7	CTGCCAAAAGACCCTGAAAAC	Sequenzierung P450-BM3

Tabelle 5. Verwendete Vektoren und Plasmide.

Plasmid	Genetische Eigenschaften	Referenz
pET-22b(+)	T7 Promotor, Amp ^R , T7 Terminator, pBR322 Replikationsursprung, PT7 <i>lac</i> , rbs, <i>lacI</i>	Novagen
pUC57 CYP71A16	pUC57 mit <i>CYP71A16</i>	MWG Eurofins Genomics. Freundlicherweise bereitgestellt durch Prof. K.-E. Jaeger (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Forschungszentrum Jülich, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf)
pET-22b(+) CYP71A16	pET-22b(+) mit <i>CYP71A16</i>	Diese Arbeit
pET-22b(+) CYP71A16Δ17_C17a	pET-22b(+) mit <i>CYP71A16</i> bov	Diese Arbeit
pET-22b(+) CYP71A16Δ24_C2C3	pET-22b(+) mit <i>CYP71A16</i> rab	Diese Arbeit
pET-22b(+) CYP71A16Δ24_C2C3_His	pET-22b(+) mit <i>CYP71A16</i> rab (mit N-terminalen His ₆ -Tag)	Diese Arbeit
pEX-K4 CYP705A12	pEX-K4 mit <i>CYP705A12</i>	MWG Eurofins Genomics
pET-22b(+) CYP705A12	pET-22b(+) mit <i>CYP705A12</i>	Diese Arbeit
pET-22b(+) CYP705A12Δ17_C17a	pET-22b(+) mit <i>CYP705A12</i> bov	Diese Arbeit
pET-22b(+) CYP705A12Δ30_C2C3	pET-22b(+) mit <i>CYP705A12</i> rab	Diese Arbeit

pET-22b(+) CYP705A12Δ30_C2C3_His	pET-22b(+)	mit <i>CYP705A12</i> rab (N-terminaler His ₆ -Tag)	Diese Arbeit				
pET-22b(+)	L-ATR2	pET-22b(+)	mit <i>L-ATR2</i> (N-terminal trunziert, N-terminaler His ₆ -Tag) (Ndjimi 2014)				
pEX-K4	C-ATR2	pEX-K4	mit <i>C-ATR2</i> MWG Eurofins Genomics				
pET-22b(+)	C-ATR2	pET-22b(+)	mit <i>C-ATR2</i> (N-terminal trunziert, N-terminaler His ₆ -Tag) Diese Arbeit				
pET-28a(+)		T7 Promotor, Kan ^R , T7 Terminator, N- und C terminale His ₆ -Tag Sequenzen, T7-Tag Sequenz, pBR322 Replikationsursprung	Novagen				
pET-28a(+)	BM3	pET-28a(+)	mit <i>cyp102a1</i> (Wildtyp, N-terminaler His ₆ -Tag) Am Institut vorhanden				
pET-28a(+)	BM3	F87A	pET-28a(+)	mit <i>cyp102a1</i> (Mutation F87A, N-terminaler His ₆ -Tag) (Le-Huu <i>et al.</i> 2015)			
pET-28a(+)	BM3	F87G	pET-28a(+)	mit <i>cyp102a1</i> (Mutation F87G, N-terminaler His ₆ -Tag) (Le-Huu <i>et al.</i> 2015)			
pET-28a(+)	BM3	V78G	F87A	pET-28a(+)	mit <i>cyp102a1</i> (Mutationen V78G F87A, N-terminaler His ₆ -Tag) (Le-Huu <i>et al.</i> 2015)		
pET-28a(+)	BM3	V78A	F87A	pET-28a(+)	mit <i>cyp102a1</i> (Mutationen V78A F87A, N-terminaler His ₆ -Tag) (Le-Huu <i>et al.</i> 2015)		
pET-28a(+)	BM3	F87A	I263G	pET-28a(+)	mit <i>cyp102a1</i> (Mutationen F87A I263G, N-terminaler His ₆ -Tag) Diese Arbeit		
pET-28a(+)	BM3	F87A	I263A	pET-28a(+)	mit <i>cyp102a1</i> (Mutationen F87A I263A, N-terminaler His ₆ -Tag) (Le-Huu <i>et al.</i> 2015)		
pET-28a(+)	BM3	V78G	F87A	I263G	pET-28a(+)	mit <i>cyp102a1</i> (Mutationen V78G F87A I263G, N-terminaler His ₆ -Tag) Diese Arbeit	
pET-28a(+)	BM3	V78G	L75A	F87A	I263G	pET-28a(+)	mit <i>cyp102a1</i> (Mutationen V78G L75A F87A I263G, N-terminaler His ₆ -Tag) Diese Arbeit
pET-28a(+)	BM3	V78G	L75G	F87A	I263G	pET-28a(+)	mit <i>cyp102a1</i> (Mutationen V78G L75G F87A I263G, N-terminaler His ₆ -Tag) Diese Arbeit
pET-28a(+)	BM3	V78G	F87A	T260A	I263G	pET-28a(+)	mit <i>cyp102a1</i> (Mutationen V78G F87A T260A I263G, N-terminaler His ₆ -Tag) Diese Arbeit

pET-28a(+) F87A T260G I263G	BM3 V78G	pET-28a(+) mit <i>cyp102a1</i> (Mutationen V78G F87A T260G I263G, N-terminaler His ₆ -Tag)	Diese Arbeit
pET-28a(+) F87A I263G A264G	BM3 V78G	pET-28a(+) mit <i>cyp102a1</i> (Mutationen V78G F87A I263G A264G, N-terminaler His ₆ -Tag)	Diese Arbeit
pET-28a(+) F87A I263G L437A	BM3 V78G	pET-28a(+) mit <i>cyp102a1</i> (Mutationen V78G F87A I263G L437A, N-terminaler His ₆ -Tag)	Diese Arbeit
pET-28a(+) F87A I263G L437G	BM3 V78G	pET-28a(+) mit <i>cyp102a1</i> (Mutationen V78G F87A I263G L437G, N-terminaler His ₆ -Tag)	Diese Arbeit
pET-28a(+) weitere bekannte und unbekannte Varianten zur Verwendung des initialen Screenings	BM3	pET-28a(+) mit <i>cyp102a1</i> Varianten	Am Institut vorhanden
pET-22b(+) GDH_IV		pET-22b(+) mit <i>gdh_IV</i>	(Le-Huu <i>et al.</i> 2015)
pET-16b Fpr		pET-16b mit <i>fpr</i>	(Girhard <i>et al.</i> 2010)
pET-16b YkuN		pET-16b mit <i>ykuN</i>	(Girhard <i>et al.</i> 2010)
pYES/DEST52		Gateway® pYES-DEST52	Invitrogen
pYES/DEST52 MRN1		Gateway® pYES-DEST52 mit <i>MRN1</i> Gen	Freundlicherweise bereitgestellt durch Prof. A. Osbourn (Department of Metabolic Biology, John Innes Centre, Norwich, UK) (Field <i>et al.</i> 2011).

Tabelle 6. In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i> ⁻	Invitrogen
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻, m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
OverExpress C41(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻, m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Lucigen
OverExpress C43(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻, m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Lucigen

Tabelle 7. In dieser Arbeit verwendeter *S. cerevisiae*-Stamm.

Stamm	Genotyp	Quelle
GIL77	<i>gal2 hem3-6 erg7 ura3-167</i>	(Kushiro <i>et al.</i> 1998)

2.3 Puffer, Medien und Lösungen

2.3.1 Puffer

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x)

242 g Tris
57 mL Essigsäure
100 mL 0,5 M EDTA, pH 8,0
ad 1000 mL mit ddH₂O

DNA-Probenpuffer

2 g Saccharose
10 mg Orange G
ad 5 mL mit ddH₂O

Puffer für die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Tfbl-Puffer

0,59 g Kaliumacetat
2,42 g RbCl
0,29 g CaCl₂
2 g MnCl₂ x 5 H₂O
30 mL Glycerin
ad 200 mL mit ddH₂O
pH 5,8 mit Essigsäure

TfblI-Puffer

0,21 g MOPS
1,10 g CaCl₂
0,12 g RbCl
15 mL Glycerin
ad 100 mL mit ddH₂O
pH 6,5 mit NaOH

Puffer und Gele für die SDS-PAGE

Färbelösung

300 mL Methanol
100 mL Essigsäure
2,5 g Coomassie Brilliant Blue
ad 1000 mL mit ddH₂O

Entfärbelösung

300 mL Methanol
100 mL Essigsäure
ad 1000 mL mit ddH₂O

Lower-Tris-Puffer

36,5 g Tris
0,8 g SDS
ad 200 mL mit ddH₂O, pH 8,5 mit HCl

Upper-Tris-Puffer

6,0 g Tris
0,4 g SDS
ad 100 mL mit ddH₂O, pH 6,8 mit HCl

Trenngel (12,5%)

2,00 mL Lower-Tris-Puffer
2,67 mL ddH₂O
3,33 mL Rotiphorese Gel 30
40 µL 10% APS in ddH₂O
4 µL TEMED

Sammelgel (4%)

1,00 mL Upper-Tris-Puffer
2,47 mL ddH₂O
0,52 mL Rotiphorese Gel 30
40 µL 10% APS in ddH₂O
4 µL TEMED

Laufpuffer (5x) für SDS-PAGE

30 g Tris
144 g Glycin
10 g SDS
ad 2000 mL mit ddH₂O

SDS-Probenpuffer (5x)

302,9 mg Tris
25% Glycerol
1 g SDS
237,5 mg MgCl₂
2,5 mg Bromphenolblau
750,0 mg DTT
Ad 10 mL mit ddH₂O, pH 6,8 mit HCl

2.3.2 Medien

Zur Kultivierung von *E. coli*:

LB (*Lysogeny Broth*)-Medium

3,5 g NaCl
7,0 g Pepton
3,5 g Hefeextrakt
ad 700 mL mit dH₂O

Zur Herstellung Agarplatten wurden 11,2 g Agar pro 700 mL vor dem Autoklavieren zugegeben

TB (Terrific Broth)-Medium

12,0 g Pepton
 24,0 g Hefeextrakt
 4,0 mL Glycerol (87%)
 ad 900 mL mit dH₂O

10 x Kaliumphosphatpuffer (10x) pH 7.0

0,17 M KH₂PO₄
 0,72 M K₂HPO₄

Nach dem Autoklavieren wurden 100 mL 10 x Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 (autoklaviert) hinzugegeben

Zur Kultivierung von *S. cerevisiae*:

Synthetic drop out Medium – Uracil (SC –U)

6,70 g Nitrogen Base w/o Aminosäuren
 1,92 g Yeast synthetic drop out medium w/o Uracil
 ad 900 mL ddH₂O

Zur Herstellung von Agarplatten wurden 20 g Agar zugegeben

Nach dem Autoklavieren wurden 100 mL sterilfiltrierte 20%ige (w/v) Glucoselösung oder für das Induktionsmedium 100 mL sterilfiltrierte 20%ige (w/v) Galaktoselösung zugegeben. Außerdem wurde das Medium mit 10 mL Ergosterol/Tween-Lösung und 2 mL Heminchlorid-Lösung supplementiert (s. Kapitel 2.3.3).

2.3.3 Lösungen

Zur Selektion auf Antibiotikaresistenz in den in Kapitel 2.3.2 genannten Flüssig- und Festmedien für die Kultivierung von *E. coli*, wurden Antibiotika (steril filtriert) in den in Tabelle 8 beschriebenen Konzentrationen verwendet.

Tabelle 8. Verwendete Antibiotika und deren Arbeitskonzentrationen in *E. coli* Flüssig- und Festmedien.

Antibiotikum	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 µg/mL
Kanamycin	30 µg/mL

Folgende Lösungen wurden für die Kultivierung von *S. cerevisiae* in SC-U-Medium (s. Kapitel 2.3.2) verwendet.

Ergosterol/Tween-Lösung

20 mg Ergosterol
 5 mL EtOH/5 mL Tween 80
 Lösen bei 70-90°C

Heminchlorid-Lösung

65 mg Heminchlorid
 10 mL 50% (v/v) EtOH
 Lösen mit NaOH, sterilfiltrieren

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von Genen wurde mit der Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Dazu setzten sich die 50 µL-Reaktionsansätze wie in Tabelle 9 aufgeführt zusammen.

Tabelle 9. Standard-Reaktionsansatz einer PCR-Reaktion.

Komponente	Endkonzentration
DNA-Matrize	5-10 ng
Phusion <i>HF</i> Puffer	1 x
Phusion DNA Polymerase	0,02 U/ µL
dNTPs	je 200 µM
3`-Primer	0,5 µM
5`-Primer	0,5 µM
ad 50 µL mit ddH ₂ O	

2.4.1.1 Amplifikation von *CYP71A16* und *CYP705A12*

Die Gene, die für *CYP71A16* und *CYP705A12* codieren, lagen in codon-optimierter Form für *E. coli* vor und wurden von MWG Eurofins Genomics synthetisiert. Die verschiedenen Versionen der P450-codierenden Gene wurden mittels der spezifischen Oligonukleotide 1-10 generiert (s. Tabelle 2). Als Matrize wurde dabei Plasmid-DNA mit den Zielgenen verwendet.

Die Gene wurden mittels des folgenden Temperaturprogramms amplifiziert:

Initiale Denaturierung	98°C	30 s	
Denaturierung	98°C	5 s	} 30 Zyklen
Primeranlagerung/Elongation	72°C	25 s	
Finale Elongation	72°C	5 min	

2.4.1.2 Amplifikation von *ATR2*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei *ATR2*-Versionen aus den *A. thaliana* Ökotypen Landsberg *erecta* (L-*ATR2*) und Columbia (C-*ATR2*) verglichen.

pET-22b(+) L-ATR2 wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von P. Ndjimi generiert und lag in codon-optimierter Form für *E. coli* vor. Die Variante lag N-terminal trunke mit C-terminalem His₆-Tag vor.

Das Gen, das für die ATR2 aus *A. thaliana* Columbia codiert, lag ebenfalls in codon-optimierter Form (für *S. cerevisiae* optimiert) vor und wurde durch MWG Eurofins Genomics synthetisiert. Die N-terminal trunke, C-terminale His₆-Variante des ATR2 Gens aus *A. thaliana* Col-0 (C-ATR2), wurde im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung von Plasmid-DNA mit dem Zielgen als Matrize (pEX-K4 C-ATR2) und mittels der spezifischen Oligonukleotide 11 und 12 (s. Tabelle 2) sowie des nachfolgenden Temperaturprogramms amplifiziert.

Initiale Denaturierung	98°C	30 s	
Denaturierung	98°C	5 s	} 30 Zyklen
Primeranlagerung/Elongation	72°C	45 s	
Finale Elongation	72°C	5 min	

2.4.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese wurde mittels QuikChange®-PCR-Reaktionen (Stratagene) durchgeführt. Dazu wurde ein, im Vergleich zu den Herstellerangaben, modifiziertes Protokoll verwendet. Zur Generierung von Mutanten wurden spezifische Primer (s. Tabelle 3) verwendet. Der Standardreaktionsansatz ist in Tabelle 10 gezeigt. Als Matrize wurde Plasmid-DNA mit dem jeweiligen Zielgen verwendet.

Tabelle 10. PCR-Ansatz zur ortsgerechten Mutagenese mittels QuikChange®-PCR.

Komponente	Endkonzentration
DNA-Matrize	5-20 ng
Phusion HF Puffer	1 x
Phusion DNA Polymerase	0,02 U/ µL
dNTPs	je 200 µM
Primer 5' bzw. 3'	0,5 µM
DMSO	3%
ad 25 µL mit ddH ₂ O	

Das Gesamtvolumen eines Reaktionsansatzes betrug zunächst 25 μL und enthielt jeweils nur einen spezifischen Primer. Nach 5 Zyklen des Temperaturprogrammes wurden die Ansätze mit dem 5'- und 3'-Primer vereinigt und anschließend bei dem gleichen Temperaturprogramm für weitere 18 weitere Zyklen inkubiert.

Initiale Denaturierung	98°C	30 s	
Denaturierung	98°C	5 s	} 5 Zyklen +
Primeranlagerung/Elongation	72°C	180 s/ 25s	
Finale Elongation	72°C	5 min	18 Zyklen

Nach erfolgter Amplifikation wurden die Ansätze mit 20 U *DpnI* für 1 h bei 37°C zum Abbau der Matrizen-DNA restringiert. Anschließend wurden chemisch-kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen mit den Ansätzen transformiert (s. Kapitel 2.5.2). Die eingefügten Mutationen wurden durch eine nachfolgende Sequenzierung bestätigt (s. Kapitel 2.4.9).

2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden zunächst die *E. coli*-Zellen, die das entsprechende Plasmid enthielten in 5 mL LB-Medium unter Selektionsbedingungen durch über-Nacht-Inkubation bei 37°C und 180 rpm angereichert. Die anschließende Präparation der Plasmide erfolgte mithilfe des ZR Plasmid MiniprepTM-Classic Kits der Firma ZymoResearch oder des Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) nach Herstellerangaben. Davon abweichend erfolgte die Elution mit ddH₂O.

2.4.4 Restriktionsspaltung von DNA

Die Restriktionsspaltung von DNA wurde mithilfe spezifischer Restriktionsendonukleasen der Firma Thermo Fisher Scientific in den empfohlenen Puffern durchgeführt. Die thermische Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen erfolgte anschließend ebenfalls nach Herstellerangaben.

2.4.5 Trennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarosegelelektrophorese wurde zur Analyse, Präparation und Konzentrationsbestimmung von DNA eingesetzt. Die DNA-Fragmente wurden in 0,8%igen TAE-Agarosegelen, versetzt mit Ethidiumbromid (3-4 μL einer 1%igen Ethidiumbromidlösung), elektrophoretisch aufgetrennt. Bevor die DNA auf das Gel

aufgetragen wurde, wurde die Probe mit 5x Orange G Probenpuffer (Endkonzentration 1x) versetzt. Als Größenstandard wurde der GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Elektrophorese wurde für 35 min bei 120 V in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Die anschließende Visualisierung erfolgte unter UV-Licht. Die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde anhand des Größenstandards mithilfe der Software GeneTools der Firma Syngene ermittelt.

2.4.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen und Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die nach erfolgter PCR (s. Kapitel 2.4.1) aus Agarosegelen ausgeschnitten wurden, wurden mithilfe des Gene Jet Gel Extraction Kits der Firma Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben (mittels des Zentrifugations-Protokolls) gereinigt. Auch DNA-Fragmente, die nicht aus dem Agarosegel ausgeschnitten wurden, konnten, beispielsweise nach erfolgter Restriktion (s. Kapitel 2.4.4), mittels des Kits gereinigt werden. Hierzu wurde das gleiche Volumen an Bindepuffer zur Probe gegeben und mit Schritt 5 des Zentrifugations-Protokolls fortgefahren. Optional wurde mit 30 µL statt 50 µL des Elutionspuffers eluiert.

2.4.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mittels alkalischer Phosphatase

Zur Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren, die anschließend zur Ligation (s. Kapitel 2.4.8) eingesetzt werden sollten, wurde die FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben nach Protokoll für die Entfernung von 5'-Phosphatenden.

2.4.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die DNA-Ligation wurde mittels der T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific) in dem mitgelieferten Puffer durchgeführt. Bei der Ligation von DNA-Fragmenten wurden der linearisierte, dephosphorylierte Vektor (s. Kapitel 2.4.4 und 2.4.7) und das restringierte DNA-Fragment (s. Kapitel 2.4.4) in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für mindestens 1 h. Anschließend erfolgte eine thermische Inaktivierung der Ligase nach Herstellerangaben, bevor die Transformation (s. Kapitel 2.5.2) von chemisch-kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen (s. Kapitel 2.5.1) durchgeführt wurde.

2.4.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung von Plasmiden wurde von der Firma GATC Biotech durchgeführt. Dabei wurden spezifische Primer (s. Tabelle 4) oder Sequenzierprimer der Firma GATC Biotech verwendet.

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen mittels RbCl_2

Zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine 50 mL LB-Hauptkultur mit 0,5 mL einer *E. coli*-Übernachtskultur inokuliert und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 3220 g und 4°C zentrifugiert, das Zellpellet in 20 mL TfbI-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (10 min, 3220 g, 4°C) und die anschließende Resuspension des Zellpellets in 2 mL TfbII-Lösung. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Zellen aliquotiert, und sofort bei – 80°C eingefroren.

2.5.2 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden 50 µL chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen (s. Kapitel 2.5.1) mit ca. 1 µg Plasmid-DNA vermischt. Bei Verwendung von Ligationsansätzen (s. Kapitel 2.4.8) wurden pro 50 µL Zellen 5 µL des Ligationsansatzes eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde für 15-30 min bei 4°C inkubiert. Nach einem 45-sekündigen Hitzeschock bei 42°C wurden dem Ansatz 900 µL LB-Medium zugegeben. Nach einer 30-60-minütigen Inkubationszeit bei 37°C unter Schütteln, wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand dekantiert, das Zellpellet in circa 100 µL Restmedium resuspendiert und anschließend auf einer selektiven LB-Agar-Platte ausgestrichen. Die LB-Agar-Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.5.3 Anzucht- und Lagerungsbedingung von *E. coli*-Stämmen

Die Anzucht von Kulturen auf festen Medien erfolgte aerob bei 37°C, bis Einzelkolonien erkennbar waren. Bewachsene Platten wurden bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert. Den Platten waren die entsprechenden Antibiotika zur Selektion zugesetzt (s. Tabelle 8).

Vorkulturen wurden in 5 mL LB-Medium bei 37°C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Die Hauptkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, in TB-Medium mit 1% (v/v) der Vorkultur oder auf eine OD_{600} von 0,05 mit der Vorkultur inokuliert. Den Kulturen waren zur Selektion die entsprechenden Antibiotika zur Selektion zugesetzt (s. Tabelle 8).

Für die langfristige Lagerung von Bakterienstämmen, wurden aus Übernachtskulturen 1 mL 20% (v/v)-Glycerinkulturen hergestellt und bei -80°C gelagert.

2.5.4 Anzucht- und Lagerungsbedingung von *S. cerevisiae*-Stämmen

Die Anzucht von Kulturen auf festen Medien (*Synthetic drop out medium* ohne Uracil; SC- U) erfolgte aerob bei 30°C für circa 40-44 h. Bewachsene Platten wurden bis zu acht Wochen

bei 4°C gelagert. Den Platten waren Hemin (Endkonzentration 13 µg/mL), Ergosterol (Endkonzentration 20 µg/mL) und Tween 80 (Endkonzentration 5 mg/mL) zugesetzt.

Vorkulturen wurden in 50 mL SC (–Uracil) Medium, supplementiert mit 13 µg/mL Hemin, 20 µg/mL Ergosterol und 5 mg/mL Tween 80, bei 30°C und 190-200 rpm über Nacht inkubiert.

Für die langfristige Lagerung von Hefestämmen wurden aus Vorkulturen 1 mL 20% (v/v)-Glycerinkulturen hergestellt und bei -80°C gelagert.

2.5.5 Heterologe Genexpression in *E. coli*

2.5.5.1 CYP71A16 und CYP705A12

Die Hauptkulturen wurden in TB-Medium bei 37°C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 inkubiert. Die Genexpression wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) induziert und die Kulturen mit 5'-Aminolävulinsäure (5'-ALA; Endkonzentration 0,5 mM) supplementiert. Die Expression wurde bei 20°C und 120 rpm Schüttelgeschwindigkeit für, falls nicht anders angegeben, 96 h durchgeführt. Es wurden 50 mL-Hauptkulturen verwendet, wenn die Zellen nach erfolgter Expression mittels differentieller Zentrifugation aufgetrennt werden sollten (s. Kapitel 2.5.7.1). Andernfalls wurden 100 mL-Hauptkulturen oder für die nachfolgende Proteinreinigung (s. Kapitel 2.6.3.1) 400 mL Hauptkulturen verwendet. Falls nicht anders angegeben wurde der *E. coli*-Stamm C43(DE3) verwendet, die Expression erfolgte, falls nicht anders angegeben, ausgehend von dem Expressionsplasmid pET-22b(+) (s. Tabelle 5).

2.5.5.2 ATR2

Zur Herstellung von ATR2 wurde der *E. coli* Stamm C43(DE3) verwendet, die Expression erfolgte ausgehend von dem Expressionsplasmid pET-22b(+) (s. Tabelle 5). Die Hauptkultur wurde in TB-Medium bei 37°C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und die Kultur mit Riboflavin in einer Endkonzentration von 5 µg/L supplementiert (Schückel *et al.* 2012). Die Expression erfolgte, falls nicht anders angegeben, bei 20°C und 120 rpm für 20 h.

2.5.5.3 YkuN und Fpr

Die Vektoren, die die Gene für die Redoxproteine YkuN und Fpr enthalten, wurden wie schon beschrieben (Bakkes *et al.* 2015; Girhard *et al.* 2010), verwendet. Zur heterologen Expression der Gene wurden BL21(DE3)-Zellen, die erfolgreich mit den

Expressionsplasmiden transformiert worden waren (s. Kapitel 2.5.2), eingesetzt. 400 mL TB-Hauptkulturen wurden bei 37°C und 180 rpm, bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-1,0, inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM). Zellen, die das *fpr*-Gen exprimieren, wurden anschließend bei 20°C und 140-180 rpm inkubiert, während *ykuN*-exprimierende Zellen bei 20°C bzw. 25°C und 140 rpm inkubiert wurden. Die Expressionszeit betrug 19-21 h.

2.5.5.4 YkuN-Fpr Fusion YR-P5

Die heterologe Herstellung des YkuN-Fpr Fusionsproteins YR-P5 wurde von Dr. Patrick Bakkes durchgeführt (Bakkes *et al.* 2017).

2.5.5.5 GDH

Das Gen, das für die Glucose-Dehydrogenase aus *B. megaterium* codiert (*gdhIV*, GenBank, D10626), war am Institut in den Expressionsvektor pET-22b(+) kloniert, vorhanden. Die Expression erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3), wie bereits beschrieben (Le-Huu *et al.* 2015).

2.5.5.6 P450-BM3

2.5.5.6.1 Expression in Mikrotiterplatten

Für initiale Durchmusterungsexperimente zur Suche nach BM3-Varianten mit Aktivität gegenüber Triterpenoiden, wurde eine Instituts-eigene P450-BM3-Bibliothek mit ~150 Mutanten verwendet. Es wurden *E. coli* BL21(DE3) Vorkulturen in einer Mikrotiterplatte mit 96 Wells (MegaBlock® 96 Well, 2,2ml, Sarstedt) verwendet. 600 µL TB-Medium wurden in die Kavitäten der Platte pipettiert und durch Überimpfen aus den *E. coli*-Gefrierkulturen inokuliert. Die Platten wurden im Anschluss daran mit sterilen, luftdurchlässigen Folien verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 550 rpm und 37°C für 18-22 h. Zur Inokulation der Hauptkulturen wurden ebenfalls je 600 µL TB-Medium in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben und mit je 1,6% der Vorkultur inokuliert. Die Inkubation erfolgte zunächst bei 37°C und 550 rpm für 6 h. Die Genexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) induziert. Zudem wurden FeSO₄ und 5'-ALA (Endkonzentrationen 0,1 mM und 0,5 mM) zugegeben. Die Expression erfolgte bei 30°C und 550 rpm für ~20 h in einem Mikrotiterplattenschüttler (TiMix Control mit TH15, Edmund Bühler).

2.5.5.6.2 Expression im Erlenmeyerkolben

Die Expression erfolgte wie in Kapitel 2.5.5.1 beschrieben, mit der Ausnahme, dass IPTG mit

einer Endkonzentration von 0,1 mM eingesetzt wurde. Außerdem wurde nach Induktion der Genexpression zusätzlich FeSO_4 in einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt. Die Expression erfolgte üblicherweise für 20 h bei 30°C und 140 rpm.

2.5.6 Heterologe Genexpression und Herstellung von Marnerol in *S. cerevisiae* nach (Kushiro *et al.* 1998)

Die *MRN1*-Genexpression und Herstellung von Marnerol erfolgte im *S. cerevisiae*-Stamm GIL-77 ausgehend von dem Plasmid pYES/DEST52 *MRN1*. Die Hauptkultur wurde in 400 mL SC (-Uracil) (*synthetic complete* ohne Uracil) Medium, mit 13 µg/mL Hemin, 20 µg/mL Ergosterol und 5 mg/mL Tween 80, mit ungefähr 6% (v/v) der Vorkultur (s. Kapitel 2.5.4) beimpft und für 48 h bei 30°C und 190-200 rpm inkubiert. Zur Induktion der Genexpression wurde anschließend das Medium gewechselt. Hierzu wurden die Zellen bei 1593 g für 15 min und 10°C zentrifugiert und anschließend in SC (-Uracil) Medium mit 2% (v/v) Galaktose anstatt Glucose aufgenommen und für 8 h inkubiert. Darauf folgend wurden die Zellen wiederum, wie oben beschrieben, zentrifugiert, um sie anschließend in je 400 mL 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 mit 3% (v/v) Glucose und 13 µg/mL Hemin aufzunehmen und für weitere 24 h bei 30°C, 200 rpm zu inkubieren. Die Zellen wurden im Anschluss daran durch Zentrifugation (1593 g, 15 min, 10°C) pelletiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung (s. Kapitel 2.6.12) gelagert.

2.5.7 Zellaufschluss von *E. coli*

E. coli-Zellen wurden nach der Expression (s. Kapitel 2.5.5) zunächst durch einen Zentrifugationsschritt (2831 g, 10°C, 20 min) pelletiert und dann, wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, aufgeschlossen.

2.5.7.1 Trennung von Zellfraktionen mittels differentieller Zentrifugation

Im ersten Expressionsexperiment der modifizierten CYP71A16-Varianten, wurden die *E. coli*-Zellen mittels differentieller Zentrifugation getrennt um die Fraktionen des Cytoplasmas, des Periplasmas und die Membranfraktion zu erhalten (Halkier *et al.* 1995). Dazu wurde das Zellpellet 1:7 (w/v) in 100 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 0,5 mM EDTA und 20% (v/v) Glycerin aufgenommen und mit 0,3 mg/g Zellfeuchtgewicht Lysozym versetzt. Anschließend wurde die gleiche Menge an kaltem Wasser wie zuvor an Puffer zu der Resuspension gegeben. Es erfolgte eine mindestens 30-minütige Inkubation auf Eis bevor 20 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert wurde, um die Sphäroblasten zu pelletieren und die Periplasmafraktion im Überstand zu erhalten. Nach Abnahme der Periplasmafraktion wurden Sphäroblasten 1:20 (w/v) in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 0,1 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerin und 0,1 mM DTT aufgenommen und bei -80°C für circa 1 h eingefroren. Während

des Auftauvorgangs wurde PMSF in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben. Anschließend erfolgte ein Aufschluss mittels Ultraschall für 3 x 45 s. Darauffolgend wurden die aufgeschlossenen Zellen bei 10 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen und *inclusion bodies* zu pelletieren. Nach Abtrennung des Überstandes wurde dieser für 50 min bei 152.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend 1:20 (w/v) in 50 mM Tris-HCl pH 7,4 mit 1 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerin und 0,2% (v/v) Triton X-100 aufgenommen und im Anschluss daran die P450-Konzentration bestimmt (s. Kapitel 2.6.4.).

2.5.7.2 Zellaufschluss mittels Ultraschall

2.5.7.2.1 CYP71A16/CYP705A12

Die Zellpellets wurden in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 20% (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA und 0,2% Triton X-100 (wenn die Proteine mittels IMAC gereinigt werden sollten, wurde in der Regel für CYP71A16 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 500 mM KCl und 20 mM Imidazol; und für CYP705A12 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 100 mM KCl, 0,2% (v/v) Triton X-100 und 10 mM Imidazol verwendet) im Verhältnis 1:10 (w/v), oder wenn nötig für die folgende Proteinreinigung konzentrierter resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit PMSF (Endkonzentration 0,1 mM) und 0,3 mg Lysozym/g Zellfeuchtgewicht versetzt. Die Zellen wurden dann auf Eis (mindestens 3 x 1 min mit jeweils 1 min Unterbrechung) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 27.216 g und 4°C für 20 min abzentrifugiert, um das im Überstand enthaltene Enzym als sogenanntes Zell-Lysat zu erhalten.

2.5.7.2.2 ATR2

Zellpellets wurden im Verhältnis 1:10 (w/v) in 100 mM Tris-HCl pH 8,2 mit 100 mM KCl, 2 mM EDTA (Schückel 2012) und 0,1 mM PMSF aufgenommen. Wenn die Proteine mittels IMAC gereinigt werden sollten, wurde der Puffer ohne EDTA verwendet und das Zellpellet konzentrierter in Puffer aufgenommen. Die Probe wurde auf Eis, in Intervallen von mindestens 3 x 1 min mit je einer min Unterbrechung, mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurden die Zelltrümmer bei 27.216 g und 4°C für 20 min abzentrifugiert und das Zell-Lysat im Überstand erhalten.

2.5.7.2.3 GDH

E. coli BL21(DE3)-Zellpellets wurden auf Eis in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 oder zur partiellen Salz- und Hitzefällung in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 2 M NaCl (Nagao *et al.* 1992) mittels Ultraschall (mindestens 3 x 1 min mit je einer Minute

Unterbrechung) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden von der löslichen Fraktion durch Zentrifugation bei 40.000 g bei 4°C für 20 min getrennt. Der erhaltene Überstand wurde optional für eine Hitzefällung verwendet (s. Kapitel 2.6.3.4).

2.5.7.2.4 YkuN und Fpr

E. coli-Zellpellets mit den rekombinant hergestellten YkuN und Fpr wurden nach Literaturangaben aufgeschlossen (Bakkes *et al.* 2015; Girhard *et al.* 2010). Die Durchführung erfolgte durch Herrn S. Biemann und Frau A. Worsch.

2.5.7.2.5 YkuN-Fpr Fusion YR-P5

Der Zellaufschluss erfolgte durch Dr. Patrick Bakkes (Bakkes *et al.* 2017).

2.5.7.2.6 P450-BM3

Zellpellets wurden 1:10 (w/v) in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 0,1 mM PMSF aufgenommen. Um konzentriertere Zell-Lysate zu erhalten, wurden die Zellen optional in weniger Puffer aufgenommen (pro 400 mL Kultur 5 mL Puffer). Der Zellaufschluss erfolgte für mindestens 3 x 1 min mittels Ultraschall. Anschließend wurden die aufgeschlossenen Zellen durch Zentrifugation bei 40.000 g für 25 min bei 4°C abzentrifugiert und das Zielprotein in der löslichen Fraktion im Überstand erhalten.

2.5.7.3 Aufschluss nach Expression in Mikrotiterplatten mittels Lysozym

In Mikrotiterplatten kultivierte *E. coli*-Zellen zur heterologen Herstellung von P450-BM3 (s. Kapitel 2.5.5.6.1) wurden durch Zentrifugation bei 3724 g und 8°C für 25 min pelletiert. Der Aufschluss erfolgte zunächst durch Einfrieren der Platte bei -80°C für mindestens 1 h. Nach dem Auftauen wurden pro Kavität 600 µL Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 10 mM MgCl₂, 1 mg/ml Lysozym und 0,05 U/ml DNaseI) (Budde 2007) zugegeben, bevor die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert wurden. Durch die anschließende Zentrifugation bei 3724 g und 8°C für 25 min wurde das lösliche Protein im Überstand erhalten.

2.6 Proteinbiochemische und analytische Methoden

2.6.1 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford (Bradford 1976), wurden 160 µL einer gegebenenfalls verdünnten Proteinlösung mit 40 µL 5x Roti-Quant (Carl Roth) in einer Mikrotiterplatte vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde anschließend bei 595 nm detektiert. Die Gesamtproteinkonzentration in der Lösung wurde mithilfe einer erstellten Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin (0-50 µg/mL) ermittelt.

2.6.2 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinproben wurden 12,5%ige Trenngele, die mit 4%igen Sammelgelen überschichtet waren, verwendet. Die jeweiligen Proteinproben wurden mit 5x SDS-Probenpuffer vermischt (Endkonzentration 1x) und auf eine Gesamtproteinkonzentration von 1 µg/µL eingestellt. Nach einer mindestens 5-minütigen Inkubation bei 95°C wurden 10 µg bzw. 15 µg auf ein Gel aufgetragen. Ganzzellproben (Zellpellets aus je 100 µL einer *E. coli*- Kultur) wurden mit 1 x SDS-Probenpuffer verdünnt (pro OD₆₀₀ Zugabe von 20 µL 1x SDS-Probenpuffer). Im Anschluss wurden die Proben für mindestens 5 min bei 95°C inkubiert und je 7,5 µL auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurden 5 µL des PageRuler™ Prestained Protein Ladder Markers (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Proben wurden bei 10 mA im Sammelgel fokussiert. Anschließend wurden die Proteine bei 25 mA für ungefähr 1 h im Trenngel aufgetrennt. Darauffolgend wurden die Gele mit dem SDS-Färbepuffer für mindestens 1 h gefärbt bevor die Entfärbung mittels des Entfärbepuffers erfolgte.

2.6.3 Reinigung von Proteinen

2.6.3.1 Reinigung von CYP71A16 und CYP705A12 mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die Proteinreinigung mittels Metall-Affinitätschromatographie wurde mit 3 mL Ni-NTA Agarose (Qiagen) Säulen durchgeführt. Die Säule wurde mit 10 Volumen Äquilibrierungspuffer (s. Tabelle 11, Tabelle 12) äquilibriert. und anschließend mit der Proteinprobe beladen und darauffolgend 5 Säulenvolumen desselben Puffers appliziert, um nicht-bindende Proteine zu entfernen. Anschließend wurden mit 5-10 Säulenvolumen Waschpuffer (s. Tabelle 11, Tabelle 12) unspezifisch gebundene Proteine von der Säule gewaschen. Das Zielprotein wurde mit 4-5 mL Elutionspuffer (s. Tabelle 11, Tabelle 12) eluiert. Vor der Entsalzung wurde die farbige Proteinlösung, mittels eines Vivaspin Turbo 15 Konzentrators (Sartorius) mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa, eingeeengt. Anschließend erfolgte die Entsalzung über eine Entsalzungssäule (PD MidiTrap G-25, nach Durchflussprotokoll, GE Healthcare oder Econo-Pac® 10DG Desalting, Bio-Rad) nach Herstellerangaben mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 20% (v/v) Glycerin.

Tabelle 11. Puffer für die Proteinreinigung von CYP71A16.

Äquilibrierungspuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
50 mM Tris-HCl pH 7,5	50 mM Tris-HCl pH 7,5	50 mM Tris-HCl pH 7,5
500 mM KCl	500 mM KCl	500 mM KCl
20 mM Imidazol	40 mM Imidazol	250 mM Imidazol

Tabelle 12. Puffer für die Proteinreinigung von CYP705A12.

Äquilibrierungspuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
50 mM Tris-HCl pH 7,5	50 mM Tris-HCl pH 7,5	50 mM Tris-HCl pH 7,5
100 mM KCl	100 mM KCl	100 mM KCl
0,2% (v/v) Triton X-100	0,2% (v/v) Triton X-100	0,2% (v/v) Triton X-100
10 mM Imidazol	40 mM Imidazol	250 mM Imidazol

2.6.3.2 Reinigung von C-ATR2 mittels IMAC und Größenausschlusschromatographie

Die Proteinreinigung der C-ATR2 wurde mit einem ÄKTA-Purifier System über eine HisTrapFF 5mL-Säule (GE-Healthcare) durchgeführt. Nach der Äquilibrierung der Säule mit 100 mM Tris-HCl pH 8,2 Puffer mit 100 mM KCl, wurde die Proteinprobe aufgetragen. Um nicht gebundene Proteine zu entfernen, wurde mit 6 Säulenvolumen Äquilibrierungspuffer gewaschen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 10 mM Imidazol in 5 Säulenvolumen von der Säule gewaschen. Anschließend wurde das Zielprotein mit einem linearen Gradienten von 10-500 mM Imidazol mit einer Länge von 15 Säulenvolumen eluiert. Die gesammelten Zielprotein enthaltenden Fraktionen, die über die Wellenlängen 280 nm, 383 nm und 458 nm detektiert wurden, wurden vereinigt und mittels eines Vivaspin Turbo 15 Konzentrators (Sartorius) mit einer Ausschlussgrenze von 50 kDa MWCO aufkonzentriert. Das Imidazol und KCl aus der Proteinlösung wurde mithilfe einer PD MidiTrap G25 Säule (GE Healthcare) entfernt und in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 (nach Durchflussprotokoll, GE Healthcare) umgepuffert. Um den spezifischen Extinktionskoeffizienten von C-ATR2 zu bestimmen, wurde das Protein durch eine Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt. Die Proteinlösung wurde dafür in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 100 mM KCl auf 5 mg/mL verdünnt und durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Anschließend wurde die Lösung auf eine Superdex 200 Increase 10/300 GL Größenausschluss-Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Die Elution wurde über die Wellenlängen 220 nm, 383 nm und 458 nm verfolgt. Die Fraktionen wurden wiederum vereinigt, konzentriert und mittels PD MidiTrap G25 Säule (nach Durchflussprotokoll, GE Healthcare) mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 entsalzt.

2.6.3.3 Reinigung von YkuN und Fpr

Die Reinigung der Proteine YkuN und Fpr erfolgte durch Herrn S. Biemann und Frau A. Worsch unter literaturbeschriebenen Konditionen (Bakkes *et al.* 2015; Girhard *et al.* 2010). Die Reinigung der YkuN-Fpr Fusion erfolgte durch Herrn Dr. Patrick Bakkes (Bakkes *et al.* 2017).

2.6.3.4 Reinigung der GDH

Der in Kapitel 2.5.7.2.3 erhaltene Überstand wurde für 20 min bei 60°C inkubiert (Nagao *et al.* 1992) und anschließend bei 40.000 g bei 4°C für 20 min zentrifugiert, um die durch die Hitze und das NaCl ausgefallenen Proteine zu entfernen.

2.6.4 Bestimmung der P450-Konzentration

Die P450-Konzentration wurde über die Aufnahme der sogenannten CO-Differenzspektren nach Omura und Sato bestimmt (Omura und Sato 1964b). Dazu wurde die zu messende Probe mit Puffer verdünnt und in zwei Küvetten pipettiert. Eine der Proben wurde für ~1 min mit Kohlenmonoxid begast. Anschließend wurde photometrisch eine Basislinie zwischen 400-500 nm aufgenommen. Darauffolgend wurde zu beiden Küvetten das Reduktionsmittel Natriumdithionit in einer Endkonzentration von 50 mM zugegeben und mindestens fünf Differenzspektren gemessen. Aktives Cytochrom-P450 zeichnet sich durch ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 450 nm aus. Die Konzentration an aktiver Cytochrom-P450-Monooxygenase wurde mittels des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ nach Formel 1 ermittelt (Omura und Sato 1964b).

$$C(\text{P450}) = \frac{\Delta A_{450-490} \cdot V}{\epsilon \cdot d} \quad (1)$$

C(P450)	Cytochrom-P450-Monooxygenase-Konzentration
$\Delta A_{450-490}$	Absorptionsdifferenz zwischen 450 und 490 nm
V	Verdünnungsfaktor
ϵ	Extinktionskoeffizient $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
d	Schichtdicke der Küvette

2.6.5 Aktivitätsbestimmung von Cytochrom-P450-Reduktasen mittels Cytochrom c Assay

Zur Bestimmung der Aktivität der Cytochrom-P450-Reduktase ATR2 wurde ein photometrischer Assay mit dem Elektronenakzeptor Cytochrom c (Calbiochem) durchgeführt. Dabei setzte sich ein 1 mL-Ansatz folgendermaßen zusammen:

50 μM Cytochrom *c*

100 μM NADPH

10 μL Enzym in einer geeigneten Verdünnung

Ad 1 mL mit 300 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,7

Die Absorptionsänderung wurde für 2 min bei 550 nm verfolgt (Vermilion und Coon 1974). Zur Bestimmung der volumetrischen Enzymaktivität (s. Formel 2) wurde der kombinierte Extinktionskoeffizient aus oxidiertem und reduziertem Cytochrom *c* von $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet (van Gelder und Slater 1962).

$$\text{volumetrische Aktivität [U/mL]} = \frac{\Delta A_{550} \cdot V}{\epsilon \cdot d} \quad (2)$$

ΔA_{550} Absorptionsänderung bei 550 nm

V Verdünnungsfaktor

ϵ Kombiniertes Extinktionskoeffizient bei 550 nm aus oxidiertem und reduziertem Cytochrom *c* $\epsilon_{550} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

d Schichtdicke der Küvette

2.6.6 Aktivitätsbestimmung der Glucose-Dehydrogenase

Zur Aktivitätsbestimmung der Glucose-Dehydrogenase (GDH) wurde ein photometrischer Assay verwendet. Dabei wurde die Reduktion des Kofaktors NADP^+ bei 340 nm für insgesamt 2 min verfolgt. Die 1 mL Gesamtansätze setzten sich wie folgt zusammen:

100 mM Glucose

100 μL GDH-enthaltendes Zell-Lysat (in einer geeigneten Verdünnung)

100 μM NADP^+

Ad 1 mL mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5

Die volumetrische Enzymaktivität wurde mithilfe des Extinktionskoeffizienten von NADPH $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ mittels Formel 3 berechnet.

$$\text{volumetrische Aktivität [U/mL]} = \frac{\Delta A_{340} \cdot V}{\epsilon \cdot d} \quad (3)$$

ΔA_{340}	Absorptionsänderung bei 340 nm
V	Verdünnungsfaktor
ϵ	Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
d	Schichtdicke der Küvette

2.6.7 Ermittlung der Extinktionskoeffizienten der C-ATR2 aus *A. thaliana*

Zur Ermittlung der spezifischen Extinktionskoeffizienten der Cytochrom-P450-Reduktase C-ATR2, wurde gereinigtes Protein nach der Größenausschlusschromatographie (s. Kapitel 2.6.3.2) verwendet um Absorptionsspektren zwischen 300-800 nm aufzunehmen. Die Extinktionskoeffizienten wurden mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes (s. Formel 4) bei den Wellenlängen 381 nm und 453 nm ermittelt. Die Proteinkonzentration c der Lösung wurde dabei mittels Bradford-Assay bestimmt (s. Kapitel 2.6.1).

$$A = \epsilon * c * d \quad (4)$$

A	Absorption
ϵ	Extinktionskoeffizient
c	Proteinkonzentration
d	Schichtdicke der Küvette

2.6.8 Konzentrationsbestimmung von Redoxpartnerproteinen

Die Konzentrationen der Redoxpartnerproteine wurden mithilfe der bekannten bzw. in dieser Arbeit ermittelten Extinktionskoeffizienten ermittelt. Dazu wurde die Absorption der gereinigten Proteinlösung bei der jeweiligen Wellenlänge ermittelt und die Konzentrationen unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes (s. Formel 4) berechnet. Die Konzentrationen von YkuN und Fpr wurden mithilfe der publizierten Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{461} = 10,01 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für YkuN (Lawson *et al.* 2004; Wang *et al.* 2007) und $\epsilon_{456} = 7,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für Fpr (McIver *et al.* 1998) bestimmt. Die Konzentration der C-ATR2 wurde mithilfe der in dieser Arbeit ermittelten Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{453} = 13,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\epsilon_{381} = 12,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt.

2.6.9 Bestimmung der Kopplungseffizienz und NADPH-Oxidationsraten

Die Bestimmung der Kopplungseffizienz der CYP71A16 und NADPH-Oxidationsraten wurde durch Herrn Nikolas Ditz durchgeführt (Kranz-Finger *et al.* 2018).

Zur Bestimmung der Kopplungseffizienz der P450-BM3 V78G F87A I263G, wurden 1 mL-Reaktionsansätze in Küvetten verwendet. Dazu wurden 1 μM gereinigtes P450-Enzym, 100 μM Lupeol, 2% (w/v) (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (HP- β -CD) in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 verwendet. Zum Starten der Reaktion wurden 100 μM NADPH zugegeben und die Absorption bei 340 nm bis zum vollständigen Verbrauch des Kofaktors verfolgt. Die Reaktion wurde mit 10 μL 5 N HCl gestoppt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase mit einer Spatelspitze Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter reduziertem Druck evaporiert und die Reste in 60 μL N,O-Bistrifluoracetamid (BSTFA) mit 1% Trimethylchlorsilan gelöst und für 60 min bei 60°C derivatisiert. Die Proben wurden anschließend mittels GC/MS analysiert (s. Kapitel 2.6.11).

2.6.10 Substratbindespektren

Substrat-induzierte Typ I-Bindespektren, wurden zur Durchmusterung von möglichen Substraten für die pflanzlichen CYP71A16 und CYP705A12 verwendet. Des Weiteren wurde für gebundene Substrate eine Substratdissoziationskonstante ermittelt. Die Messungen wurden mit einem Lambda 35 Dual-Beam Spektrophotometer (PerkinElmer) bei 22°C durchgeführt. Dazu wurden zwei Tandem Quartz-Küvetten (Hellma) verwendet. Eine Kammer jeder Küvette wurde mit 800 μL 1 μM P450-Lösung (gereinigtes Protein) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer gefüllt, während die jeweils andere Kammer lediglich den Puffer enthielt. Für das Testen verschiedener Substanzen wurden Konzentrationen von 100 μM und 200 μM des möglichen Substrates eingesetzt. Für die Ermittlung einer Dissoziationskonstante wurden sequentiell verschiedene Substratmengen zugegeben. Bei der Proben-Küvette wurde Substrat zur Kammer mit der Cytochrom-P450-Monooxygenase gegeben, während bei der Referenzküvette das Substrat in die Kammer mit dem Puffer gegeben wurde. Alle Substanzen wurden in 100% Ethanol gelöst, außer Agatholal und Valencen, die in 100% DMSO gelöst wurden. Spektren wurden zwischen 330-550 nm aufgenommen. Die Absorptionsdifferenz ($\Delta A_{390-420}$) wurde gegen die verwendeten Substratkonzentrationen aufgetragen und die Substratdissoziationskonstante mithilfe von Formel 4 mittels der OriginPro 9.0G Software (OriginLab Corporation) bestimmt.

$$\Delta A_{390-420} = \frac{\Delta A_{\max} \cdot [S]}{K_D + [S]} \quad (4)$$

ΔA	Absorptionsdifferenz zwischen 340 und 420 nm
ΔA_{\max}	Maximale Absorptionsdifferenz
[S]	Substratkonzentration
K_D	Substratdissoziationskonstante

2.6.11 Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (GC/MS)

Die Detektion der Triterpenoid-Substrate und deren Produkte erfolgte durch das GC/MS Gerät QP-2010 Plus (Shimadzu). Dazu wurde die Säule FS-Supreme 5ms (Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 μm , CS-Chromatographieservice) verwendet. Als Trägergas diente Helium. Die MS-Analytik erfolgte im Scan/SIM (single ion mode) Modus. Die Injektortemperatur betrug 300°C, die Interface-Temperatur 290°C und die Temperatur der Ionenquelle lag bei 200°C. Die im Folgenden angegebenen Ofentemperaturprogramme (Tabelle 13 und Tabelle 14) wurden zur Analyse verwendet.

Tabelle 13. Ofentemperaturprogramm zur Detektion von Marnerol und Marnerol-Derivaten mittels GC/MS.

Rate (°C/ min)	Temperatur (°C)	Zeit (min)
-	250	2
5	320	3

Tabelle 14. Ofentemperaturprogramm zur Detektion von Lupeol, α -Amyrin, β -Amyrin, und Cycloartenol sowie deren Oxidationsprodukten mittels GC/MS.

Rate (°C/ min)	Temperatur (°C)	Zeit (min)
-	250	2
10	300	20

2.6.12 Isolierung von Marnerol mittels semi-präparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Marnerol-produzierenden Hefezellen (s. Kapitel 2.5.6) wurden wie beschrieben (Kushiro *et al.* 1998) in einer KOH/Ethanol-Lösung bei 70°C aufgeschlossen und anschließend mit n-Hexan extrahiert. Marnerol wurde im Anschluß daran durch eine semipräparative HPLC (Prominence Instrument, Shimadzu), ausgestattet mit einer Eurospher II 100-10-C18 Säule (Länge 300 mm, Durchmesser 8,0 mm, Porengröße 100 Å, Partikelgröße 10,0 μm , Knauer), mit einem Methanol/H₂O-Gradienten isoliert. Dem Wasser waren 0,1% Ameisensäure

zugesetzt. Das Extrakt wurde in Methanol aufgenommen und schrittweise eingespritzt. Die Säulentemperatur betrug 30°C und die Flussrate lag bei 5 mL/min. Marnerol wurde bei den Wellenlängen 190 nm und 210 nm detektiert und der Marnerol-Peak fraktioniert. Das verwendete Programm ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15. Gradient der Umkehrphasen-HPLC zur Reinigung von Marnerol. Als Laufmittel dienen Methanol und H₂O mit 0,1% Ameisensäure, in der Tabelle sind die prozentualen Methanol-Konzentrationen angegeben.

Methanol (%)	Zeit (min)
85	0,00
100	19,00
100	20,00
85	20,01
85	24,00

2.6.13 Isolierung des Oxidationsproduktes von Lupeol mittels semi-präparativer HPLC

Das in Lupeol-Oxidationsreaktionen im präparativen Maßstab erhaltene Extrakt (s. Kapitel 2.7.3.4) wurde in n-Heptan vorzugsweise mit 5% Ethanol gelöst und durch eine semi-präparative HPLC (Prominence Instrument, Shimdazu), ausgestattet mit einer MultoHigh 100 Si-10 µ Säule (250 × 10 mm, Porengröße 100 Å, 10 µm Partikelgröße, CS-Chromatographie Service), mit einem n-Heptan/Ethanol-Gradienten isoliert. Die Probe wurde dazu schrittweise in das System eingespritzt. Die Säulentemperatur betrug 30°C und die Flussrate lag bei 5 mL/min. Die Metaboliten wurden bei einer Wellenlänge von 205 nm detektiert und der Produktpeak fraktioniert. Das verwendete Laufmittelprogramm ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16. Gradient der Normalphasen-HPLC zur Reinigung des Oxidationsproduktes 3 der Lupeol-Oxidation katalysiert durch P450-BM3 V78G F87A I263G. Als Laufmittel dienen n-Heptan und Ethanol, in der Tabelle sind die prozentualen Ethanol-Konzentrationen angegeben.

% Ethanol	Zeit (min)
5	0,00
15	17,00
90	17,01
90	18,00
5	18,01
5	25,00

2.6.14 Feinmassebestimmung (HR-MS)

Die Bestimmung der Feinmasse des aus der Lupeol-Oxidation katalysiert durch P450-BM3 V78G F87A I263 hervorgegangenen P3, wurden hochauflösende MS-Analysen durch Analytik-Zentrum der Heinrich-Heine-Universität (HHUCeMSA) auf einem UHR-QTOF maXis 4G (Bruker Daltonics) durchgeführt:

$C_{30}H_{48}O_3$ HRMS(ESI) ($M+H^+$) 457.3677 (berechnete Masse 457.3681).

2.6.15 NMR-Spektroskopie

Zur Strukturaufklärung des Hauptproduktes P3, das bei der Umsetzung von Lupeol durch P450-BM3 V78G F87A I263G (Produkt 3, P3) entstanden ist, wurden NMR-Analysen des isolierten Produktes (s. Kapitel 2.6.13, 6.2) durchgeführt. Das Produkt wurde in Methanol-d4 (CD_3OD) gelöst und im Analytik-Zentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHUCeMSA) gemessen. Dazu wurde das Spektrometer Avance III (Bruker) mit den Messfrequenzen von 151 MHz (^{13}C -NMR) oder 600 MHz (1H -NMR) verwendet. Zusätzlich wurden 1H - ^{13}C HSQC, 1H - ^{13}C HMBC, DEPT-135, 1H - 1H -COSY, 1H - 1H -NOESY Analysen durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen (δ) in ppm wurden in Relation zum Lösemittelsignal angegeben.

3 β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure:

1H NMR (600 MHz, Methanol-d4) δ 4.70 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.57 (dt, J = 2.5, 1.4 Hz, 1H), 3.11 (dd, J = 12.1, 4.6 Hz, 1H), 2.42 (td, J = 11.1, 5.8 Hz, 1H), 2.08 (tdd, J = 13.5, 12.1, 4.2 Hz, 1H), 1.99 – 1.89 (m, 2H), 1.83 – 1.76 (m, 2H), 1.75-1.71 (m, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.67 (tt, J = 4.4, 2.2 Hz, 1H), 1.52 – 1.38 (m, 8H), 1.37 (s, 3H), 1.35 – 1.28 (m, 3H), 1.27 – 1.18 (m, 2H), 1.15 – 1.10 (m, 1H), 1.09 (s, 3H), 1.08 – 1.01 (m, 2H), 0.99 (s, 3H), 0.89 (dd, J = 12.4, 2.5 Hz, 1H), 0.85 (s, 3H), 0.83 (s, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, Methanol-d4) δ 181.28, 152.01, 110.24, 79.25, 57.70, 51.36, 49.76, 49.57, 49.48, 44.21, 44.06, 41.96, 41.13, 40.54, 39.66, 38.77, 36.77, 35.63, 30.98, 29.36, 28.68, 26.65, 24.61, 22.52, 21.27, 19.66, 18.52, 16.55, 15.02, 14.89.

2.7 *In-vitro*-Umsetzungen von Triterpenoiden

2.7.1 Oxidation von Marnerol durch CYP71A16

Für die Oxidation von Marnerol wurden *in-vitro*-Umsetzungen im 250 μ L Maßstab mit gereinigtem Enzym in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Jede Reaktion enthielt, wenn nicht anders angegeben, 2 μ M P450 und entweder 8 μ M YkuN und 8 μ M Fpr, 8 μ M der YkuN-Fpr Fusion oder 8 μ M ATR2. Der Kofaktor NADPH wurde durch Zugabe von

12 U/mL GDH in der Gegenwart von 100 mM Glucose regeneriert. Zudem enthielten die Reaktionen 620 U/mL Katalase aus der Rinderleber (Sigma-Aldrich) und 100 μ M Marnerol (aus einer 10 mM Stammlösung in Ethanol). Die Reaktionen wurden in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 0,12% (v/v) Triton X-100 durchgeführt und durch Zugabe von 200 μ M NADPH gestartet. Die Proben wurden bei 25°C für 20 h in einem Überkopfschüttler (NeoLab, Programm C2, 10 rpm) oder in einem Thermoschüttler (ThermoMixer® C, Eppendorf) mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 450 rpm inkubiert. Das Substrat und die gebildeten Produkte wurden mit 2x 250 μ L Ethylacetat extrahiert. Anschließend wurde die organische Phase unter reduziertem Druck (240 mbar) evaporiert und der Rückstand in 200 μ L 25% (v/v) MeOH resuspendiert. Triton X-100 wurde aus den Ansätzen durch Stage Tip Extraktion (Rappsilber *et al.* 2003) entfernt. Dazu wurden Pipettenspitzen mit fünf Lagen eines C18 Materials (Empore™ C18 47 mm Extraction Disc, Modell 2215, 3M) befüllt. Nach einem Waschschrift der Membran mit 100 μ L 100% MeOH und anschließender Zentrifugation bei 4900 g, erfolgte die Äquilibration mit 100 μ L 25% (v/v) MeOH und ebenfalls einem Zentrifugationsschritt bei 4900 g. Anschließend wurde die Probe aufgetragen und die Membran mit 50% und 75% (v/v) MeOH gewaschen, bevor die Elution mit 100 μ L 100% MeOH erfolgte. Bei diesen Schritten wurde die Zentrifugation bei 1700 g durchgeführt. Das Eluat in 100% MeOH wurde unter reduziertem Druck (zunächst bei 337 mbar, dann bei 70 mbar, um verbleibendes Wasser zu entfernen) evaporiert und mit 30 μ L BSTFA mit 1% Trimethylchlorsilan für 30 min bei 80°C derivatisiert. Die Proben wurden anschließend mittels GC/MS analysiert (s. Kapitel 2.6.11).

Zur Bestimmung kinetischer Parameter der CYP71A16, wurden die Reaktionen unter Variation der Marnerol-Konzentration von 10-500 μ M, wie oben beschrieben, angesetzt. Die Konzentration des Kosolvens Ethanol wurde mit 1% des Gesamtvolumens (v/v) immer gleich gehalten. Die Reaktionen wurden in einem Thermoschüttler bei 25°C mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 450 rpm inkubiert. Nach 2,5 min wurden die Proben extrahiert und für die weitere Analyse, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, aufbereitet. Nach erfolgter GC/MS-Analyse (s. Kapitel 2.6.11) wurde die relative Konversion durch Gleichsetzen der Peakflächen von Edukt und Produkt als 100%, berechnet. V_{\max} - und K_M -Werte wurden durch den Auftrag Geschwindigkeit (nmol Produkt pro min) gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen mithilfe der Michaelis-Menten-Gleichung (s. Formel 5) unter Verwendung der OriginPro 9.0G Software (OriginLab Corporation), ermittelt. Die Experimente wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (5)$$

V_0	Anfangsgeschwindigkeit (nmol/min)
V_{\max}	Maximale Geschwindigkeit
[S]	Substratkonzentration
K_M	Michaelis-Konstante

2.7.2 Reaktionen mit CYP705A12

Zur Bestimmung der Funktionalität der CYP705A12, wurden Reaktionen mit 23-Hydroxymarnerol als Substrat durchgeführt.

Dazu wurde eine Reaktion durchgeführt, die sich wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben, zusammensetzte. Der einzige Unterschied lag darin, dass neben 2 μ M CYP71A16 auch 2 μ M CYP705A12 zugegeben wurde. Eine weitere Möglichkeit bestand darin, 2 μ M CYP705A12 erst nach 20 h der Reaktionszeit zuzugeben. In diesem Falle wurden neben der CYP705A12 erneut GDH, Katalase und Glucose sowie YkuN und Fpr in den in Kapitel 2.7.1 angegebenen Konzentrationen zugegeben. In einer dritten Reaktion zum Testen der CYP705A12-Funktionalität, wurde das getrocknete Ethylacetatextrakt nach Marnerol-Oxidation katalysiert durch CYP71A16 (s. Kapitel 2.7.1), in 5 μ L Ethanol gelöst und 2,5 μ L zur einer Reaktion, die sich wie in Kapitel 2.7.1 zusammensetzte, mit dem Unterschied dass statt CYP71A16 CYP705A12 verwendet wurde, gegeben. Diese Reaktion wurde zudem einmal mit ATR2 (8 μ M) statt dem YkuN/Fpr-Redoxpartnersystem durchgeführt.

2.7.3 Oxidation von Lupeol, α -Amyrin, β -Amyrin und Cycloartenol durch P450-BM3

2.7.3.1 Durchmusterung einer P450-BM3-Bibliothek

Für die Durchmusterung der institutseigenen P450-BM3-Bibliothek wurden Zell-Lysate, die aus den Expressionen in den Mikrotiterplatten gewonnen wurden (s. Kapitel 2.5.5.6.1 und 2.5.7.3), verwendet. Je 150 μ L dreier verschiedener Lysate wurden in einer Reaktion eingesetzt. Die Ansätze setzten sich des Weiteren folgendermaßen zusammen: 12 U/mL GDH, 100 μ M β -Amyrin (aus einer 10 mM Stammlösung in Ethanol), 20 mM Glucose, 620 U/mL Katalase aus der Rinderleber (Sigma-Aldrich), 200 μ M NADPH wurden auf ein Volumen von 1 mL mit 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 aufgefüllt. Die Reaktionen wurden in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 25°C im Überkopfschüttler (NeoLab, Programm C2, 20 rpm) für etwa 20 h durchgeführt. Anschließend erfolgte die Extraktion mit 2x 500 μ L Ethylacetat. Die abgenommene organische Phase wurde ferner mit einer Spatelspitze $MgSO_4$ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck evaporiert und die

Reste in 30 μL wasserfreiem Ethylacetat und 20 μL BSTFA mit 1% Trimethylchlorsilan gelöst und für 60 min bei 60°C derivatisiert. Die Proben wurden anschließend mittels GC/MS analysiert (s. Kapitel 2.6.11).

2.7.3.2 Eingrenzung durch Durchmusterung ausgewählter P450-BM3-Varianten

Weitere Durchmusterungsexperimente zur Eingrenzung der P450-Varianten zur Triterpenoid-Oxidation wurden mit dem Substrat Lupeol durchgeführt. Dazu wurden Zell-Lysate, welche nach Expressionen im Schüttelkolben gewonnen wurden (s. Kapitel 2.5.5.6.2 und 2.5.7.2.6), verwendet. Hierzu wurden 500 μL Ansätze in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 in 2 mL Reaktionsgefäßen für 20 h in einem Überkopfschüttler (NeoLab, Programm C2, 20 rpm) bei 25°C inkubiert. Die Reaktionen enthielten 100 μM des Substrates (aus einer 10 mM Stammlösung in Ethanol), 400 μM NADPH, 2 μM P450 und 620 U/mL Katalase aus der Rinderleber (Sigma-Aldrich). Anschließend wurden die Reaktionen mit 5 μL 6 N HCl gestoppt und mit 500 μL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit einer Spatelspitze MgSO_4 getrocknet und unter reduziertem Druck (240 mbar) evaporiert. Anschließend wurden die Proben in 30 μL BSTFA mit 1% Trimethylchlorsilan gelöst und für 30 min bei 80°C bzw. 60 min bei 60°C derivatisiert. Die Proben wurden anschließend mittels GC/MS analysiert (s. Kapitel 2.6.11).

2.7.3.3 *In-vitro*-Umsetzungen nach Reaktionsoptimierung

Reaktionen wurden in einem Volumen von 500 μL durchgeführt und enthielten 6 μM P450, 620 U/mL Katalase aus der Rinderleber (Sigma-Aldrich), 200-400 μM NADPH, 100 μM Substrat und 2-4% (w/v) HP- β -CD. Die Ansätze wurden in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 durchgeführt und in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 25°C im Überkopfschüttler (NeoLab, Programm C2, 20 rpm) für circa 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Extraktion und Analyse wie zuvor beschrieben.

Für Kofaktorregenerierungsexperimente wurden zusätzlich zu den oben beschriebenen Ansätzen, 4 mM Glucose-6-Phosphat, 1 mM MgCl_2 und 5 U/mL Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *S. cerevisiae* (Roche Diagnostics) oder 20 mM Glucose und 12 U/mL Glucose-Dehydrogenase eingesetzt.

2.7.3.4 *In-vitro*-Reaktionen im präparativen Maßstab

Zur Maßstabsvergrößerung der Umsetzungsreaktion von Lupeol durch P450-BM3 V78G F87A I263G, wurden mehrere Ansätze eines Volumens von 20 mL in 100 mL Erlenmeyerkolben für 20 h, bei 25°C und 70 rpm in einem Inkubationsschüttler (Schüttelinkubator Multitron Pro, Infors), durchgeführt. Die Reaktionen enthielten 150 μM

Substrat (aus einer 10 mM Stammlösung in Ethanol), 2% (w/v) HP- β -CD, *E. coli* Zell-Lysat mit 6 μ M P450-BM3 V78G F87A I263G, 620 U/mL Katalase aus der Rinderleber (Sigma-Aldrich) und 250 μ M NADPH. Die Reaktionen wurden in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 durchgeführt. Anschließend wurden die Ansätze mit mindestens 3 x 10 mL und 1 x 5 mL Ethylacetat extrahiert und die organische Phase unter reduziertem Druck (240 mbar) evaporiert. Darauffolgend wurde das Hauptprodukt mittels semi-präparativer HPLC gereinigt (s. Kapitel 2.6.13).

3 Ergebnisse

Die Oxidation von Triterpenen bzw. Triterpenoiden führt zu oxyfunktionalisierten Derivaten mit vielfältigen biologischen Eigenschaften. In dieser Arbeit sollten Cytochrom-P450-Monooxygenasen zur Oxidation ausgewählter Triterpenoide eingesetzt werden. Dazu wurde im ersten Teil der Ergebnisse (s. Kapitel 3.1) die Oxidation des Triterpenoids Marnerol durch zwei pflanzliche P450-Enzyme behandelt. Im zweiten Teil der Ergebnisse (s. Kapitel 3.2) wurde die bakterielle P450-BM3 zur Oxidation ausgewählter Triterpenoide eingesetzt.

3.1 Oxidation von Marnerol mittels pflanzlicher Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus *A. thaliana*

Der Marneral-Biosyntheseweg wurde in *A. thaliana* entdeckt, eine Marneral-/Marnerol-oxidierende CYP71A16 und eine potentiell in den Marneral-/Marnerol-Metabolismus involvierte CYP705A12 wurden im Rahmen der Arbeit adressiert. Die P450-Enzyme sollten in *E. coli* in ausreichenden Mengen produziert, gereinigt und anschließend *in vitro* analysiert werden. Das Ziel dessen war es, mehr Informationen über die Enzyme und deren Funktion zu erlangen.

Zunächst wurden die Aminosäuresequenzen der beiden P450-Enzyme mittels TMHMM v. 2.0 Software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) hinsichtlich ihrer Membrandomänen analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 zu sehen.

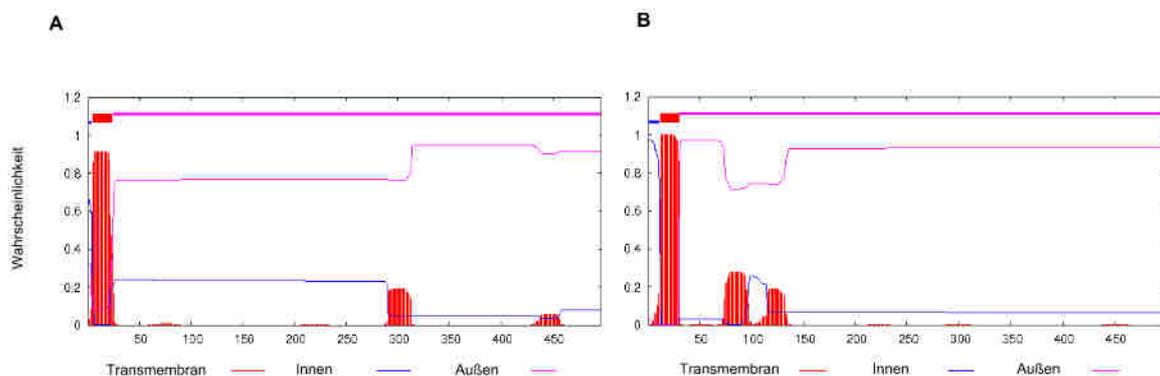


Abbildung 10. Hydrophobizitätsanalysen der Aminosäuresequenzen mittels TMHMM Software v. 2.0 von A) CYP71A16 und B) CYP705A12.

Laut dieser Hydrophobizitätsanalyse weisen die beiden untersuchten CYP71A16 und CYP705A12 jeweils eine N-terminale Transmembrandomäne auf (Aminosäuren 5-24 bzw. Aminosäuren 12-30). Zur Expression in *E. coli* wurden die N-terminalen Domänen, inklusive der Transmembrandomänen komplett bzw. teilweise deletiert und zur verbesserten Expression eine modifizierte Sequenz der bovinen CYP17A1 (Barnes *et al.* 1991) oder der

CYP2C3 aus dem Hasen (Scott *et al.* 2001; Wachenfeldt *et al.* 1997) angefügt (s. Tabelle 17). Diese zwei literaturbeschriebenen Domänen können zur Verbesserung des Titers an aktivem Zielprotein bei der heterologen Expression eukaryotischer P450-Gene in *E. coli* eingesetzt werden, wie in dem Übersichtsartikel von Zelasko und Kollegen (Zelasko *et al.* 2013) zusammengefasst wurde.

Tabelle 17. Veränderungen der N-terminalen Aminosäuresequenzen von CYP71A16 und CYP705A12 zur heterologen Genexpression in *E. coli*. Die vorgenommenen Veränderungen sind fett gedruckt. Die vorhergesagte Transmembrandomäne der nativen Sequenz ist unterstrichen.

CYP	Konstrukt	Bezeichnung	Aminosäuresequenz
71A16	nativ	CYP71A16lang	MEMMILISLCLTTFTLLFFKSLLKRPN
	Δ_{1-7} C17A1	CYP71A16bov	MALLLAVFLCLTTFTLLFFKSLLKRPN
	Δ_{1-23} C2C3	CYP71A16rab	MAKKTSSKGKLRPN MAELIIVDFQNI SIFILLCLFSFLCYALFFKKPKGFDLPPSP
705A12	nativ	CYP705A12lang	SL
	Δ_{1-16} C17A1	CYP705A12bov	MALLLAVFLCLFSFLCYALFFKKPKGFDLPPSPSL
	Δ_{1-29} C2C3	CYP705A12rab	MAKKTSSKGKPKGFDLPPSPSL

3.1.1 Heterologe Herstellung von CYP71A16

Die Genvarianten wurden mittels spezifischer Primer amplifiziert und in die *E. coli*-Expressionsvektoren pET-22b(+) und pCWori(+) kloniert. Während die pET-22b(+)-Konstrukte zunächst zur vergleichenden Expression in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3), C41(DE3) und C43(DE3) dienten, wurde die Expression in *E. coli* DH5 α mit den pCWori(+)-Konstrukten durchgeführt. Vor Induktion der Genexpression und 20 bzw. 40-44 h danach wurden Ganzzellproben entnommen und der Erfolg der Proteinsynthese der Cytochrom-P450-Monooxygenase mittels SDS-PAGE analysiert (s. Abbildung 11).

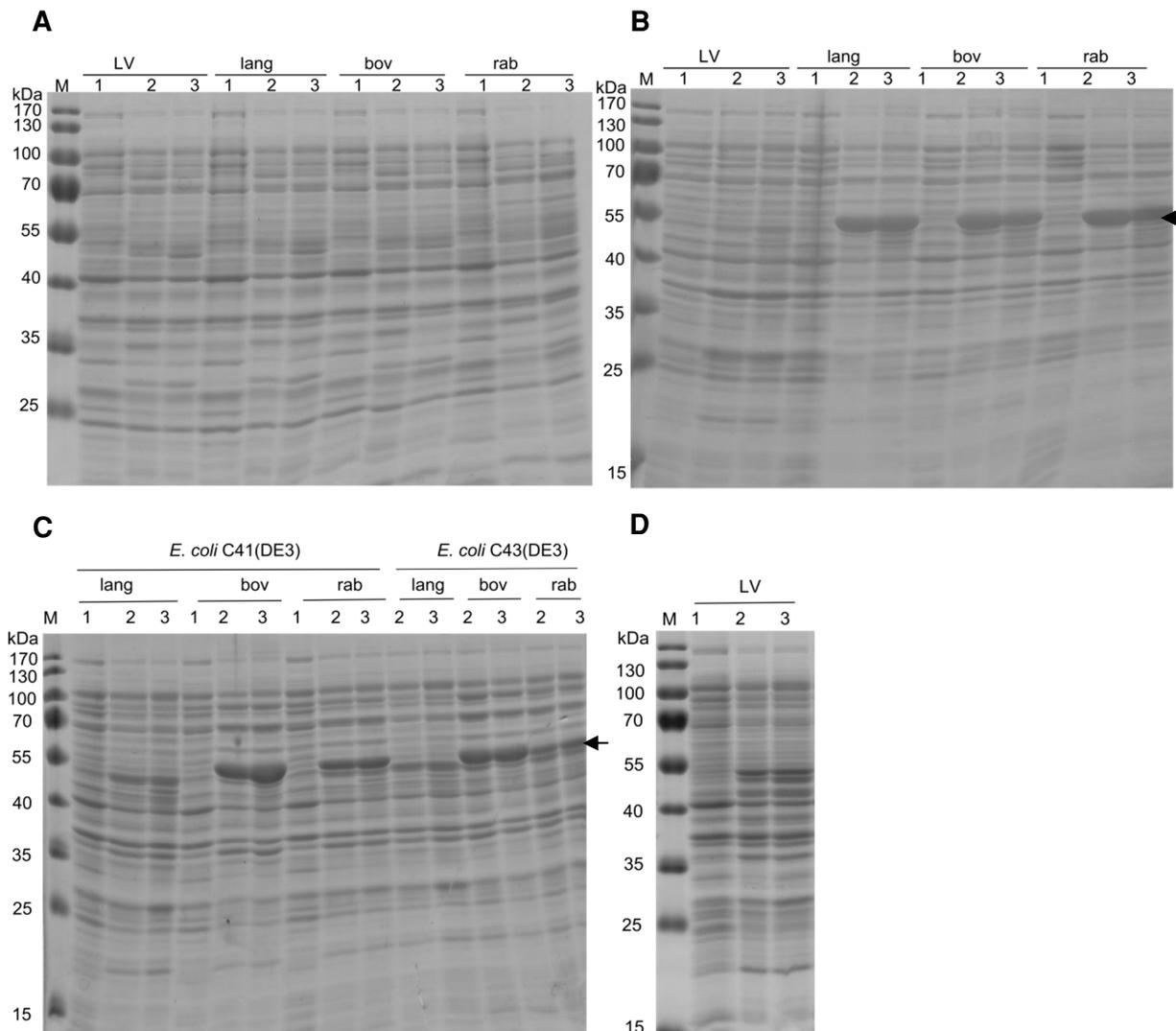


Abbildung 11. SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) zur Expressionsanalyse von verschiedenen CYP71A16-Varianten. Dabei wurden Ganzzellproben (1) vor Induktion, (2) 20 h und (3) 40 h-44 h nach Induktion sowie der Größenstandard (M) auftragen. A) *E. coli* DH5 α pCWori(+)-CYP71A16lang, CYP71A16bov, CYP71A16rab sowie die Leervektorkontrolle (LV) *E. coli* DH5 α pCWori(+). B) *E. coli* BL21(DE3) pET-22b(+)-CYP71A16lang, CYP71A16bov, CYP71A16rab sowie die Leervektorkontrolle *E. coli* BL21(DE3) pET-22b(+). C) *E. coli* C41(DE3) pET-22b(+)-CYP71A16lang, CYP71A16bov, CYP71A16rab und *E. coli* C43(DE3) pET-22b(+)-CYP71A16lang, CYP71A16bov, CYP71A16rab. D) Leervektorkontrolle *E. coli* C43(DE3) pET-22b(+). Die Pfeile kennzeichnen die Zielproteinbanden auf einer Höhe von ~55 kDa.

Im Falle der Expression in *E. coli* DH5 α (s. Abbildung 11A), konnte keine Akkumulation der CYP71A16-Varianten von ~55 kDa, welche der theoretischen Größe entspricht, detektiert werden. Es konnte kein deutlicher Unterschied zur Leervektorkontrolle festgestellt werden, weshalb die Expression in diesem *E. coli*-Stamm in Kombination mit dem verwendeten Vektor als nicht geeignet erschien. Nach der Expression in *E. coli* BL21(DE3) (s. Abbildung 11B) war jedoch eine Akkumulation der CYP71A16 bei allen Konstrukten bei einer Größe von 55 kDa sichtbar. Auch die Expression in *E. coli* C41(DE3) und C43(DE3) war erfolgreich, Zielbanden konnten vor allem bei den N-terminal modifizierten Proteinen detektiert werden (s. Abbildung 11C). Die Variante mit N-terminal angefügter CYP17A1-Sequenz

(CYP71A16bov) wies die stärkste P450-Akkumulation in diesen *E. coli*-Stämmen auf. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im nächsten Schritt die am besten geeigneten Expressionssysteme verwendet, um zu untersuchen, in welchen Stämmen die hergestellte CYP71A16 in der löslichen Fraktion bzw. Membranfraktion lokalisiert war. Dazu wurden die Zellen, die die deutlichste P450-Produktion auf dem SDS-Gel mit *E. coli*-Ganzzellextrakten aufwiesen, mittels differentieller Zentrifugation aufgetrennt, um die Membran- und Cytoplasmafraktionen zu erhalten. Dazu wurden alle P450-Varianten, die in BL21(DE3) produziert wurden, verwendet. Darüber hinaus wurden die beiden trunkierten P450-Versionen, die in C41(DE3) und C43(DE3) synthetisiert wurden, analysiert. Die Membran- bzw. Cytoplasmafraktionen wurden anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen (s. Abbildung 12).

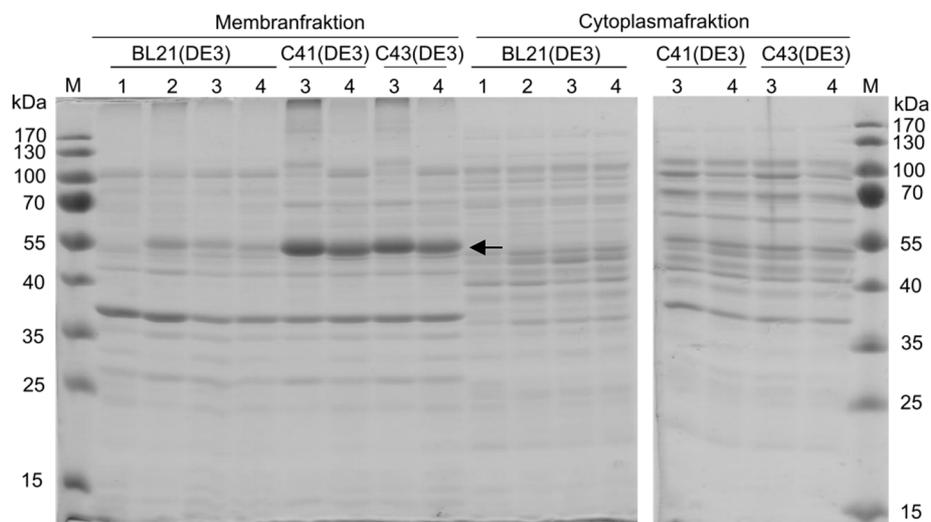


Abbildung 12. SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) der *E. coli* Membran- und Cytoplasmafraktionen zur Lokalisierung von CYP71A16. Die Zellen wurden durch differentielle Zentrifugation aufgetrennt und die Membran- sowie Cytoplasmafraktionen der Expressionen aus BL21(DE3), C41(DE3) und C43(DE3) ausgehend von pET-22b(+) aufgetragen. (1) Leervektorkontrolle, (2) CYP71A16lang, (3) CYP71A16bov, (4) CYP71A16rab. Der Pfeil kennzeichnet die Zielproteinbanden bei ~55 kDa.

Am stärksten ausgeprägt waren die Zielbanden in der Membranfraktion nach Expression in *E. coli* C41(DE3) bzw. C43(DE3) für die CYP71A16-Variante mit bovinem Membrananker (CYP71A16bov). Ebenfalls deutlich ausgeprägt war die Variante mit der N-terminal angefügten Sequenz von CYP2C3 (CYP71A16rab) in diesen Stämmen. Auch im Cytoplasma waren schwache Zielbanden in den Proben der Stämme C41(DE3) und C43(DE3) detektierbar. Vergleichsweise schwach waren die Banden der Expressionen in BL21(DE3) ausgeprägt. Im Vergleich zur Leervektorkontrolle waren zwar in der Membranfraktion Signale auf Höhe von 55 kDa erkennbar, jedoch nicht sehr intensiv. Zur Bestimmung der Funktionalität und der damit verbundenen korrekten Faltung von P450-Enzymen, wurden CO-Differenzspektren von einigen analysierten Fraktionen aufgenommen. Für die P450-Variante CYP71A16rab konnte eine deutliche charakteristische Absorption bei 450 nm nach

Expression in dem *E. coli*-Stamm C43(DE3) detektiert werden (s. Abbildung 13). Allerdings konnte auch eine Absorption bei 420 nm beobachtet werden. Ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 420 nm kann bei P450-Enzymen für nicht korrekt koordiniertes Häm und somit für ein katalytisch inaktives Protein sprechen. Neben potentiell funktionellem P450-Enzym schien in der Proteinlösung also auch katalytisch inaktive Spezies vorhanden zu sein.

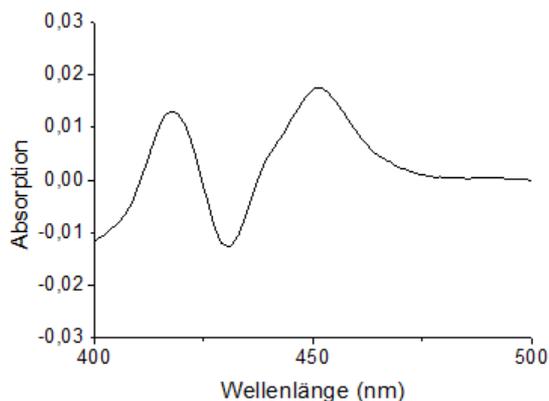


Abbildung 13. CO-Differenzspektrum der isolierten Membranfraktion von *E. coli* C43 (DE3) nach 40 h Expression von CYP71A16rab.

CO-Differenzspektren wurden außerdem verwendet, um die P450-Konzentrationen zu bestimmen. Die CYP71A16rab-Konzentrationen nach Expression in den verschiedenen *E. coli*-Stämmen wurden verglichen (s. Tabelle 18). Der geeignetste *E. coli* Stamm stellte sich als C43(DE3) mit >3 mg CYP71A16rab/L Kultur heraus. In *E. coli* BL21(DE3) wurde viel Protein produziert, wie mittels der Analyse der Gesamtproteine in Abbildung 11 gezeigt werden konnte. Allerdings konnten lediglich knapp 0,5 mg CYP71A16rab/L Kultur in der Membranfraktion detektiert werden. In dem Stamm C41(DE3) konnte eine Konzentration von über 2 mg CYP71A16rab/L Kultur gemessen werden, dieser Wert lag jedoch knapp 30% unter dem bestimmten Wert der nach Expression in *E. coli* C43(DE3) erreicht werden konnte. Der *E. coli* Stamm C43(DE3) mit pET-22b(+)CYP71A16rab wurde demzufolge in weiteren Experimenten verwendet.

Tabelle 18. P450-Konzentrationen in mg CYP71A16rab/L nach Expression in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3), C41(DE3) und C43(DE3). Die Expression fand bei 25°C für 20 h in 30 mL Kulturvolumen statt.

CYP71A16rab-Variante in der Membranfraktion der <i>E. coli</i>-Stämme	mg P450/L
BL21(DE3)	0,5
C41(DE3)	2
C43(DE3)	3,5

Nach der Identifikation und Auswahl einer geeigneten CYP71A16-Variante und eines *E. coli* Expressionsstammes, erfolgte der Aufschluss der Zellen nicht mehr mittels des aufwändigen Protokolls der differentiellen Zentrifugation. Die Zellen wurden stattdessen in Puffer mit Triton X-100 zur Solubilisierung des Membranproteins mittels Ultraschall aufgeschlossen und das von der Membran gelöste Protein, nach Pelletierung der nicht-löslichen Fraktion, im Überstand erhalten. Nach 40-45 h der Expression konnten P450-Konzentrationen von >5,5 mg/L erzielt werden. Zur weiteren Expressionsoptimierung wurde die Expressionsdauer auf bis zu 118 h erhöht. Eine Steigerung um das 9-fache (auf 52 mg/L Kultur), der durch CO-Differenzspektroskopie messbaren P450-Konzentration konnte bis zu einer Expressionsdauer von 96 h beobachtet werden (s. Abbildung 14A). Das aufgenommene CO-Differenzspektrum wies ein deutliches Absorptionsmaximum bei 450 nm auf (s. Abbildung 14B).

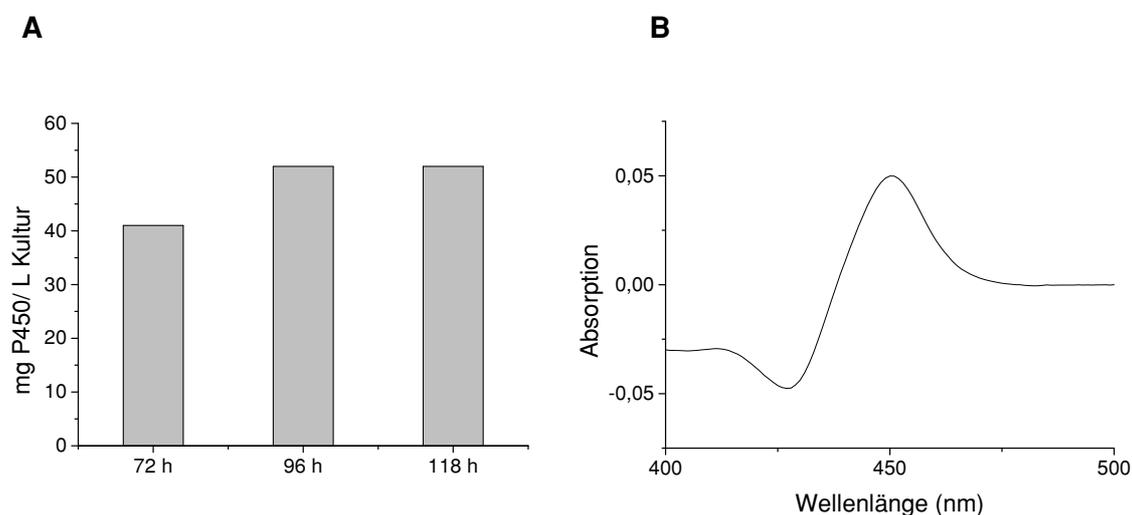


Abbildung 14. Herstellung von CYP71A16rab in *E. coli* C43(DE3). A) CYP71A16rab-Konzentrationen in mg P450/L Kultur nach Expressionszeiten von 72 h, 96 h und 118 h. B) CO-Differenzspektrum von CYP71A16rab nach 96 h Expressionszeit.

Anschließend wurde das Gen der CYP71A16rab-Variante mittels spezifischer Primer zur Proteinreinigung mittels immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag kloniert und das Gen unter den optimierten Bedingungen (mit der Änderung, dass das Kulturvolumen auf 400 mL erhöht wurde) exprimiert. Das hergestellte Protein wurde anschließend mittels IMAC gereinigt und der Erfolg der Reinigung mittels SDS-PAGE verfolgt (s. Abbildung 15). Das zu erwartende Molekulargewicht der Proteinvariante betrug ~55 kDa (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>). Eine Bande auf dieser Höhe konnte nach der Reinigung deutlich (mit einer Reinheit von ungefähr 90%) angereichert detektiert werden. Die Ausbeute nach erfolgter Reinigung lag nach Messung von CO-Differenzspektren bei ~80%.

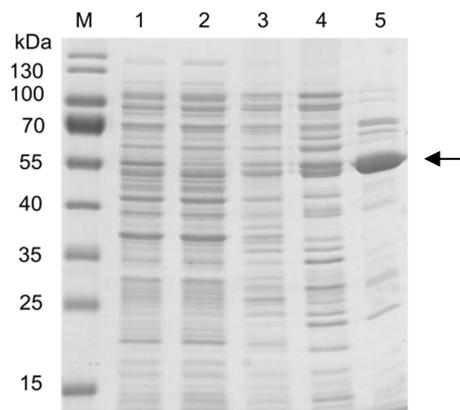


Abbildung 15. SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) mit dem Verlauf der Reinigung von CYP71A16rab. (M) Größenstandard, (1) Zell-Lysat, (2) Durchfluss, (3) Waschschrift I (20 mM Imidazol), (4) Waschschrift II (40 mM Imidazol), (5) Eluat nach Entsalzung. Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Protein pro Probe. Der Pfeil kennzeichnet die Zielproteinbande bei ~55 kDa.

Die für folgende *in-vitro*-Experimente verwendete CYP71A16rab mit C-terminalem His-Tag wurde in gereinigter Form verwendet und von nun an als CYP71A16 bezeichnet.

3.1.2 Heterologe Herstellung von CYP705A12

Zum Vergleich der Genexpression der verschiedenen erzeugten CYP705A12-Varianten (s. Tabelle 17), wurden die Gene hierfür für 96 h in *E. coli* C43(DE3) ausgehend von pET-22b(+) exprimiert, da dies das Expressionssystem war, in dem auch schon die Expression des CYP71A16-Gens am erfolgreichsten war (s. Kapitel 3.1.1). Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und das Protein mit dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 solubilisiert.

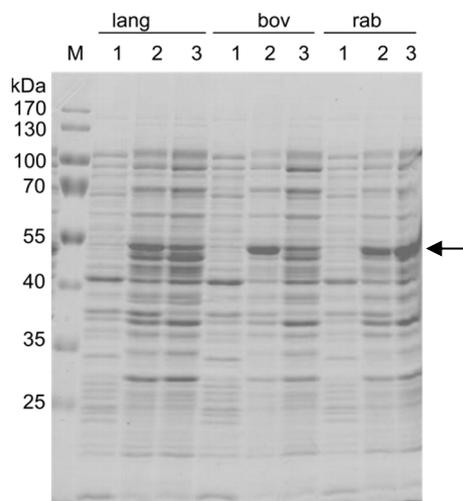


Abbildung 16. SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) zur Expressionsanalyse der verschiedenen erstellten CYP705A12-Varianten. Zu sehen sind CYP705A12lang, CYP705A12bov und CYP705A12rab. (1) Zellen vor Induktion, (2) Zellen 96 h nach Induktion, (3) Zell-Lysat nach 96 h der Expression (10 µg) sowie der Proteingrößenstandard (M). Der Pfeil kennzeichnet die Zielproteinbanden bei ~55 kDa.

Die Herstellung der Protein-Varianten in *E. coli* war, wie anhand der durchgeführten SDS-PAGE zu sehen (s. Abbildung 16), erfolgreich. In allen Fällen war das Zielprotein auf einer

Höhe von knapp unter 55 kDa in den Ganzzellproben 96 h nach Induktion der Expression zu sehen. Die deutlichste Bande im Zell-Lysat auf Zielproteinhöhe war in der CYP705A12rab-Probe detektierbar. Die P450-Konzentrationen der erhaltenen Zell-Lysate wurden anschließend über CO-Differenzspektren ermittelt und verglichen (s. Abbildung 17).

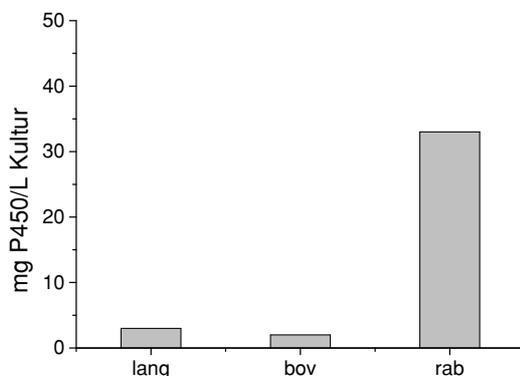


Abbildung 17. Vergleich der P450-Konzentrationen in *E. coli* Zell-Lysaten in mg P450/L Kultur. Getestet wurden die verschiedenen Varianten CYP705A12lang, CYP705A12bov und CYP705A12rab nach 96 h der Expression.

Es zeigte sich, dass die um 29 Aminosäuren trunkierte Variante ebenfalls mit angefügter, modifizierter Aminosäuresequenz der CYP2C3 (CYP705A12rab), die höchste P450-Konzentration von knapp 33 mg/L aufwies. Die nicht-trunkierte Variante und die um 16 Aminosäuren trunkierte Variante mit angefügter CYP17A1-Membrandomäne (CYP705A12bov) wiesen geringere P450-Konzentrationen von <5,5 mg/L auf. In den weiteren Experimenten wurde folglich mit der CYP705A12rab-Variante weitergearbeitet.

Verschiedene Expressionszeiten wurden im Folgenden getestet und verglichen (s. Abbildung 18A).

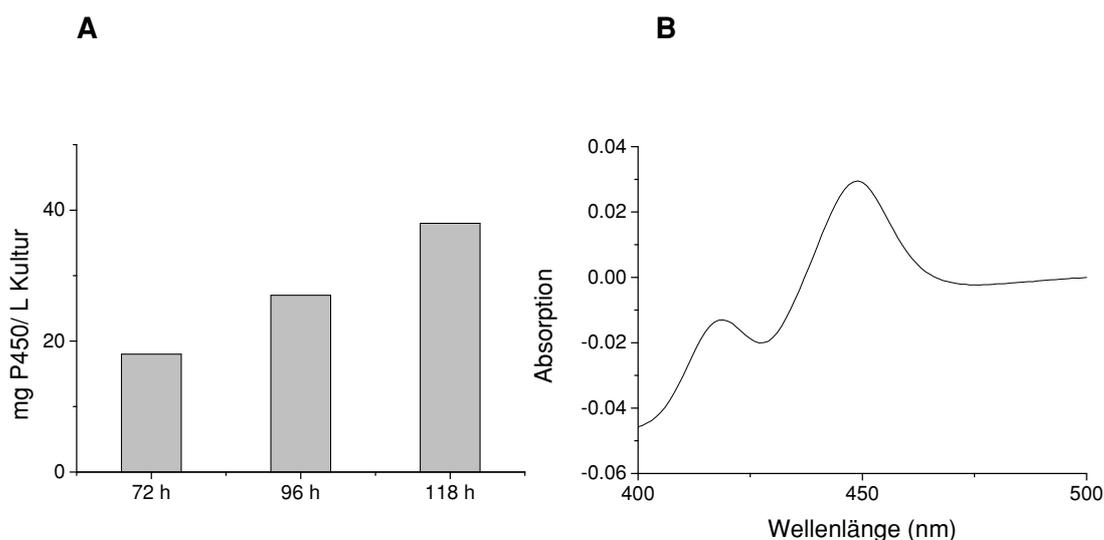


Abbildung 18. A) Über die CO-Differenzspektren ermittelte CYP705A12rab-Konzentrationen in mg P450/L Kultur *E. coli* Zell-Lysaten nach verschiedener Expressionszeiten von 72 h, 96 h und 118 h. B) CO-Differenzspektrum von CYP705A12rab nach 118 h Expressionszeit.

Dabei stellten sich längere Expressionszeiten wiederum als vorteilhaft heraus. Nach 96 h konnte eine Konzentration von bis zu knapp 27 mg CYP705A12rab/L und nach 118 Stunden Werte von über 38 mg CYP705A12rab/L detektiert werden. Das aufgenommene CO-Differenzspektrum zeigte ein deutliches Maximum bei 450 nm und eine kleine „Schulter“ bei 420 nm (s. Abbildung 18B). Das Gen wurde anschließend mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag zur weiteren Aufreinigung kloniert und anschließend exprimiert.

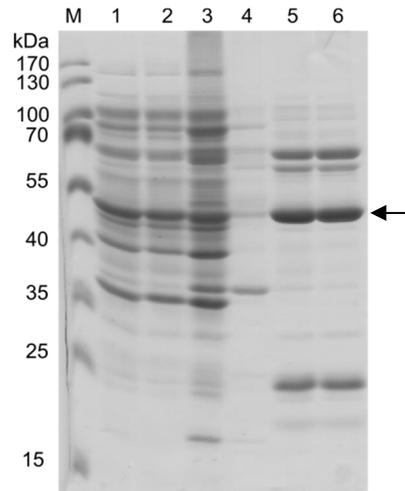


Abbildung 19. SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) des Verlaufs der Reinigung von CYP705A12rab. (M) Größenstandard, (1) Zell-Lysat, (2) Durchfluss, (3) Waschschrift I (10 mM Imidazol), (4) Waschschrift II (40 mM Imidazol), (5) Eluat, (6) Eluat nach Entsalzung. Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Protein pro Probe. Der Pfeil kennzeichnet die Zielproteinbande bei ~55 kDa.

Der Verlauf der Reinigung mittels IMAC wurde anhand einer SDS-PAGE-Analyse verfolgt (s. Abbildung 19). Die Anreicherung des Zielproteins konnte durch die Detektion der Bande auf dem SDS-Gel bei einer Höhe von knapp unter 55 kDa beobachtet werden. Allerdings zeigten sich einige Nebenbanden, die sowohl höher als auch tiefer als das Zielprotein im Gel sichtbar wurden.

Die für folgende *in-vitro*-Experimente verwendete CYP705A12rab mit C-terminalem His-Tag wurde in gereinigter Form verwendet und von nun an als CYP705A12 bezeichnet.

3.1.3 Heterologe Herstellung von ATR2

Als Redoxpartner für die pflanzlichen Cytochrom-P450-Monooxygenasen CYP71A16 und CYP705A12 wurde unter anderem die Cytochrom-P450-Reduktase (CPR) ATR2 aus *A. thaliana* ausgewählt. Dieses Enzym wurde schon rekombinant in *S. cerevisiae* als Redoxpartner für CYP71A16 für *in-vivo*-Reaktionen verwendet (Castillo *et al.* 2013). Da zwei Aminosäuresequenzen der ATR2 bekannt waren, zum einen aus dem Ökotypen Landsberg *erecta* (Ler-0; GenBank X66017.1) und zum anderen aus dem Ökotypen Columbia (Col-0; GenBank NM_119167.4), sollten beide Varianten verglichen werden. Der Unterschied auf

Aminosäureebene liegt bei 11 Aminosäuren (s. Abbildung 20). Das Gen für die Reduktase aus *A. thaliana* Ler-0 lag in einer codon-optimierten Form für *E. coli* am Institut vor und wurde um 74 Aminosäuren (ähnlich wie beschrieben (Schüchel 2012)), trunziert. Außerdem wurde vergleichend die ATR2-Variante aus *A. thaliana* Col-0 um 74 Aminosäuren trunziert. Diese Variante lag nicht in codon-optimierter Form für *E. coli*, sondern für *S. cerevisiae* vor. Die Aminosäuren an den Positionen 346, 347 und 348, die sich unter anderem zwischen den beiden Typen unterscheiden, liegen in der FAD-Bindedomäne (Niu *et al.* 2017).



Abbildung 20. Aminosäure-Sequenzalignment der *A. thaliana* ATR2 Versionen aus den Ökotypen Ler-0 und Col-0. Analysiert mit MultAlin-Software (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>, (Corpet 1988)).

Nach der Klonierung und der heterologen Expression der beiden Gene in *E. coli* C43(DE3), wurde die spezifische Aktivität beider ATR2-Proteine im Zell-Lysat mittels des Elektronenakzeptors Cytochrom *c*, photometrisch bestimmt (s. Abbildung 21A). Zur Vereinfachung werden die Proteine im Folgenden L-ATR2 (ATR2 aus *A. thaliana* Landsberg *erecta*) und C-ATR2 (ATR2 aus *A. thaliana* Columbia) genannt. Dabei konnte eine spezifische Aktivität der C-ATR2 von knapp 1 U/mg ermittelt werden, wohingegen die L-ATR2 eine ähnliche Aktivität gegenüber Cytochrom *c* aufwies wie die Negativkontrolle. Die Ergebnisse scheinen konsistent mit der SDS-PAGE-Analyse der Zell-Lysate. Während in der C-ATR2 Probe eine Bande auf der erwarteten Höhe von circa 72 kDa detektiert werden konnte, war auf dieser Höhe keine Bande in der L-ATR2 Probe und ebenfalls nicht in der Negativkontrolle zu sehen (s. Abbildung 21B). Die CPR C-ATR2 wurde für alle weiteren Experimente verwendet.

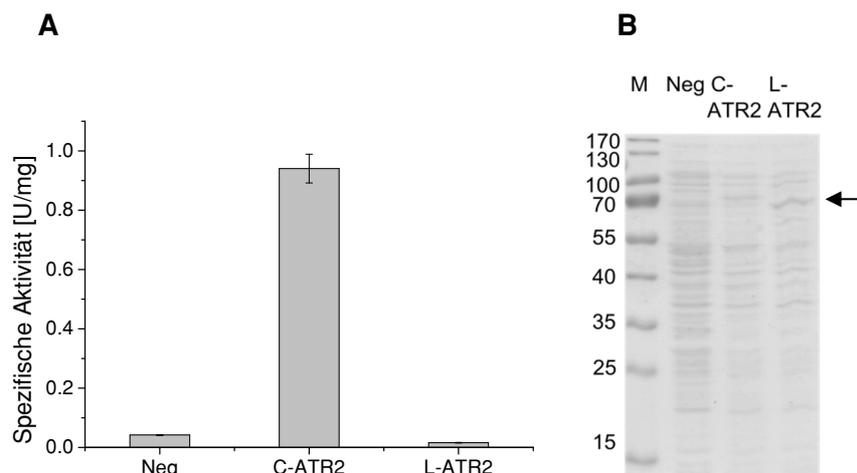


Abbildung 21. Vergleich der C-ATR2 und L-ATR2 Aktivitäten und der Expression. A) Aktivitäten gegenüber Cytochrom *c* in *E. coli* Zell-Lysaten nach Genexpression der ATR2 Varianten aus *A. thaliana* Col-0 (C-ATR2) und Ler-0 (L-ATR2) sowie einer Negativkontrolle (Neg). Die spezifischen Aktivitäten gegenüber Cytochrom *c* sind in U/mg angegeben. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte zweier Expressionen (die der Negativkontrolle wurde lediglich einmal durchgeführt), von denen die Aktivitäten der Zell-Lysate jeweils in Dreifachbestimmung detektiert wurden. Im Falle der Negativkontrolle und L-ATR2 lagen die Standardabweichungen $<0,01$ U/mg. B) SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) von Zell-Lysaten nach 20 h der Expression von C-ATR2, L-ATR2 und einer Leervektorkontrolle als Negativkontrolle (Neg). (M) Größenstandard. Aufgetragen wurden jeweils 10 μ g Protein pro Probe. Der Pfeil kennzeichnet die Zielproteinbande bei ~ 72 kDa.

Der Verlauf der Expression der C-ATR2 ist in Abbildung 22 gezeigt. Die Proteinbande auf einer Höhe von circa 72 kDa, die der C-ATR2 zuzuordnen ist, war nach 20 h der Expression detektierbar. Im Zell-Lysat waren diese Banden nach 20 und 44 h ebenfalls sichtbar. C-ATR2 akkumulierte in der löslichen Fraktion auch ohne das Detergenz Triton X-100. Die spezifischen Aktivitäten nach 20 und 44 h waren vergleichbar, weshalb eine kürzere Expressionszeit von 20 h für alle weiteren Versuche präferiert wurde.

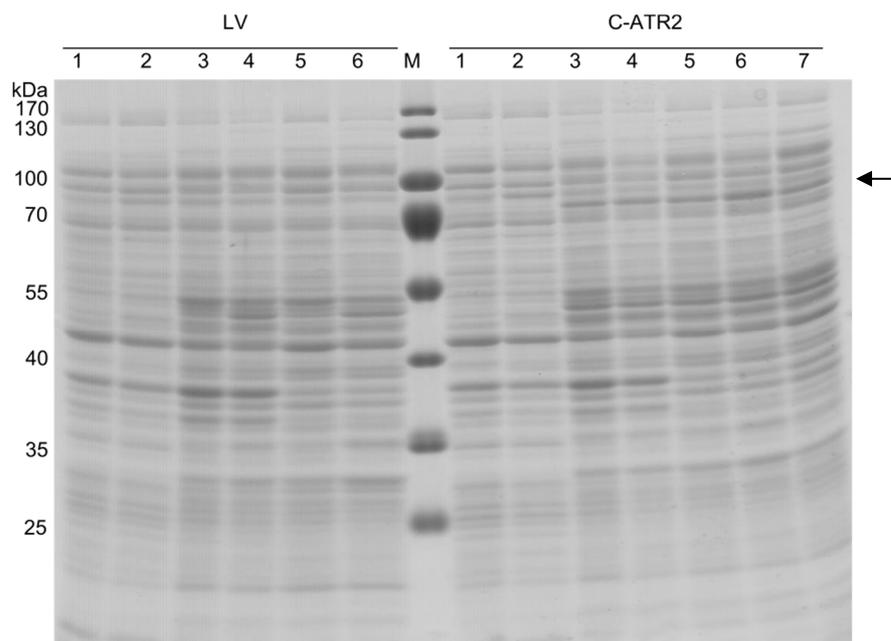


Abbildung 22. SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) des Expressionsverlaufs der C-ATR2. (M) Protein-Größenstandard, Leervektorkontrolle (LV). (1) Ganzzellprobe vor Induktion, (2) Ganzzellprobe 2 h nach Induktion, (3) Ganzzellprobe 20 h nach Induktion, (4) Ganzzellprobe 44 h nach Induktion, (5) Zell-Lysat nach 20 h der Expression, (6) Zell-Lysat nach 44 h der Expression, (7) Zell-Lysat 44 h nach der Expression mit Aufschlusspuffer ohne Triton X-100. Aufgetragen wurden jeweils 10 μ g Protein pro Zell-Lysatprobe. Der Pfeil kennzeichnet die Zielproteinbande bei \sim 70 kDa.

C-ATR2 wurde mittels eines N-terminalen Hexahistidin-Tags über eine IMAC gereinigt. Der Erfolg der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE detektiert (s. Abbildung 23A).

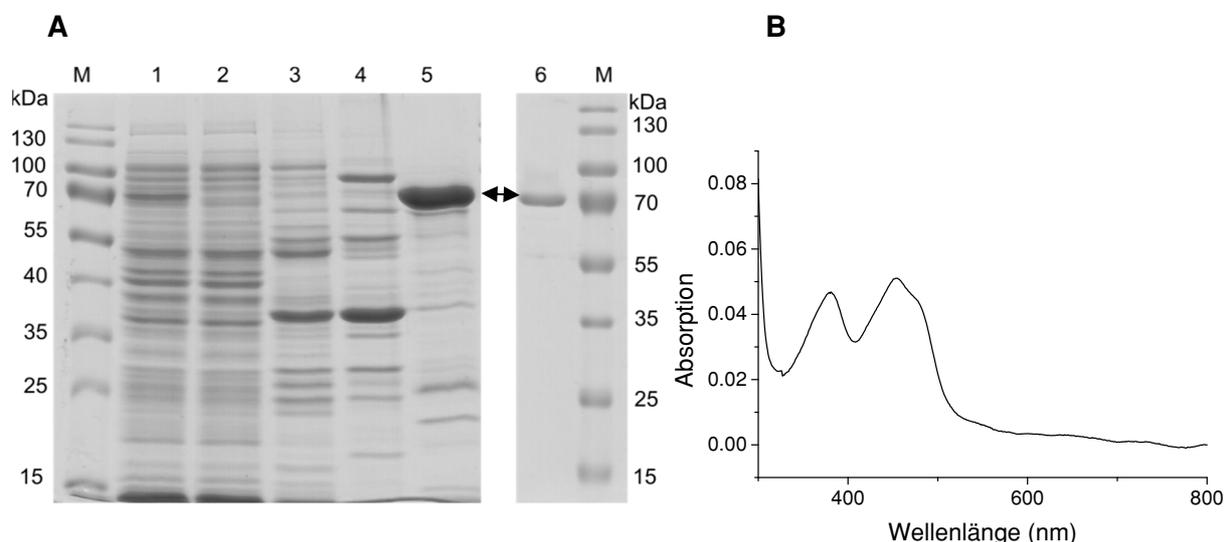


Abbildung 23. A) SDS-Polyacrylamidgelle (12,5%) des Verlaufs der Reinigung der C-ATR2. (M) Protein-Größenstandard, (1) Zell-Lysat, (2) Durchfluss, (3) Waschschrift I (ohne Imidazol), (4) Waschschrift II (10 mM Imidazol), (5) Eluat nach Entsalzung, (6) Eluat nach Größenausschlusschromatographie und Entsalzung (2 μ g Protein). B) UV/VIS Spektrum der gereinigten C-ATR2 nach Größenausschlusschromatographie. Absorptionsmaxima konnten bei den Wellenlängen von 453 nm und 381 nm detektiert werden. Die Pfeile kennzeichnen die Zielproteinbanden bei \sim 72 kDa. B) UV/VIS Spektrum der gereinigten L-ATR2 nach Größenausschlusschromatographie. Die charakteristischen Absorptionsmaxima von 453 nm und 381 nm sind deutlich erkennbar.

Das Zielprotein, das eine Bande auf Höhe von 72 kDa aufwies, konnte durch die Proteinreinigung deutlich angereichert werden. Da die spezifischen Extinktionskoeffizienten für die CPR C-ATR2 noch nicht bekannt waren, wurden diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt. Nach der Reinigung mittels IMAC waren noch Fremdproteine in der Lösung vorhanden. Aus diesem Grund wurde zur weiteren Reinigung eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Der Erfolg dieses Reinigungsschrittes konnte ebenfalls mittels SDS-PAGE verfolgt werden, die Reinheit des Proteins betrug knapp 96%. Im Anschluss daran wurde ein Spektrum von 300 bis 800 nm aufgenommen (s. Abbildung 23B). Es zeigten sich für Diflavinreduktasen typisch zwei Absorptionsmaxima; bei 453 nm und bei 381 nm. Die theoretische Größe der N-terminal trunkierten und His-getaggten C-ATR2-Variante beläuft sich auf 72 kDa. Die kalkulierten Extinktionskoeffizienten betragen $\epsilon_{453} = 13,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\epsilon_{381} = 12,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die für folgende *in-vitro*-Experimente verwendete trunkierte C-ATR2 wurde in gereinigter Form verwendet und in den weiteren Experimenten als ATR2 bezeichnet.

3.1.4 Herstellung von Marnerol

Das natürliche Substrat für CYP71A16, Marneral sowie der vorkommende Alkohol Marnerol, sind kommerziell nicht erhältlich und die chemische Synthese ist mit 16 Syntheseschritten sehr komplex (Corbu *et al.* 2009). Daher wurde Marnerol in einem rekombinanten *S. cerevisiae*-Stamm, der von A. Osbourn (Department of Metabolic Biology, John Innes Centre, Norwich, UK) (Field *et al.* 2011) erhalten wurde, produziert. Das resultierende Extrakt wurde anschließend mittels einer semi-präparativen HPLC über eine RP-C18 Säule aufgereinigt und Marnerol erhalten (s. Abbildung 24).

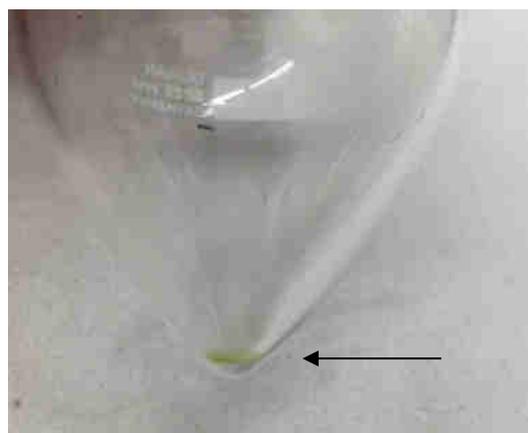


Abbildung 24. Nach semi-präparativer HPLC erhaltenes, gereinigtes Marnerol im 25 mL Spitzkolben. Der Pfeil zeigt auf die Substanz Marnerol.

Der Erfolg der Reinigung wurde mittels GC/MS- (s. Abbildung 25) und HPLC-Analysen überprüft. Aus ungefähr 3 L Kultur, konnten knapp 9,1 mg Marnerol (Reinheit >98%; GC/MS;

HPLC) erhalten werden. Marnnerol wurde im Folgenden für *in-vitro*-Reaktionen und die Messung von Bindespektren (s. Kapitel 3.1.12) verwendet.

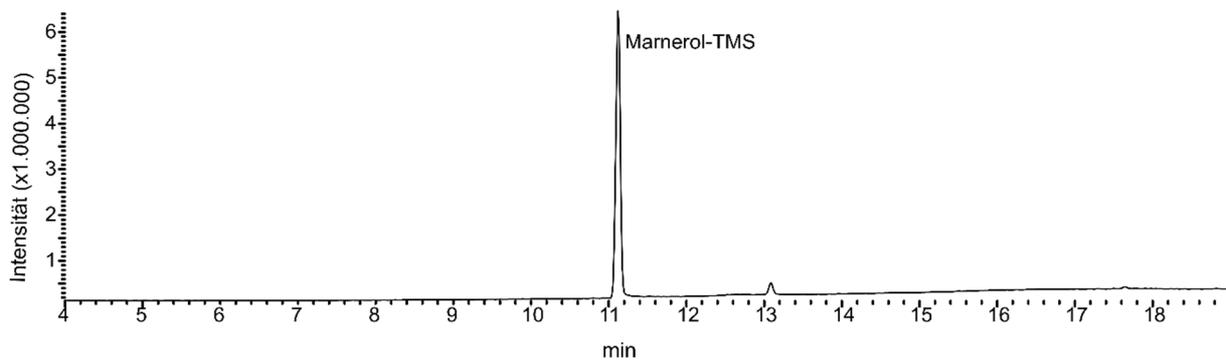


Abbildung 25. GC/MS Chromatogramm des mittels semi-präparativer HPLC gereinigten Marnnerols. Das Triterpenoid wurde vor Analyse silyliert, die Retentionszeit lag bei 11,2 min.

3.1.5 Vergleich von Redoxpartnersystemen für CYP71A16

Als native CPRs, die Elektronen zur P450 transferieren, kommen ATR1 und ATR2 aus *A. thaliana* in Frage. Aufgrund der Erfahrung, dass ATR2 besser heterolog in *E. coli* produzierbar ist als ATR1 (Schückel 2012) und dadurch, dass ATR2 bereits erfolgreich mit CYP71A16 in rekombinanten *S. cerevisiae*-Zellen benutzt wurde (Castillo *et al.* 2013), wurde in dieser Arbeit ATR2 verwendet. Wenn die ATR2 in einem Verhältnis von P450:ATR2 von 1:1 eingesetzt wurde, konnte ein Umsatz von lediglich 1,3% verzeichnet werden. Wie bereits in veröffentlichten Studien gezeigt wurde, kann die Erhöhung des Verhältnisses von Redoxpartner zu P450 zu höheren Umsätzen führen (Bakkes *et al.* 2015; Girhard *et al.* 2010; Grinkova *et al.* 2010; Hawkes *et al.* 2010). Ein möglicher Grund dafür ist, dass das Zusammentreffen von Redoxpartner und P450-Enzym bei Verwendung von einem Überschuss an Redoxpartnern in der Reaktionslösung wahrscheinlicher ist (Schulz *et al.* 2016). Bei dem Einsatz von mehr CPR im Vergleich zur P450 (Verhältnis CYP71A16:ATR2 1:4), konnte ein Umsatz von 7,8% detektiert werden. Insgesamt wurde also trotz der Erhöhung der Konzentration des Redoxpartners ATR2 in der Reaktion ein geringer Umsatz verzeichnet, weshalb andere Redoxpartnersysteme getestet wurden. ATR2 wurde in *in-vitro*-Reaktionen mit einem bakteriellen Redoxpartnersystem, bestehend aus dem Flavodoxin YkuN aus *Bacillus subtilis* und der Flavodoxin-Reduktase Fpr aus *E. coli*, in Form von freien Enzymen und als Fusionsprotein, verglichen (s. Abbildung 26). YkuN und Fpr wurden bereits erfolgreich als nicht-physiologisches Redoxpartnerpaar für Cytochrom-P450-Monooxygenasen verwendet (Girhard *et al.* 2010; von Bühler *et al.* 2013). In dem Fusionsprotein ist YkuN mit Fpr durch einen starren $([E/L]PPPP)_5$ Linker verbunden (Bakkes *et al.* 2017).

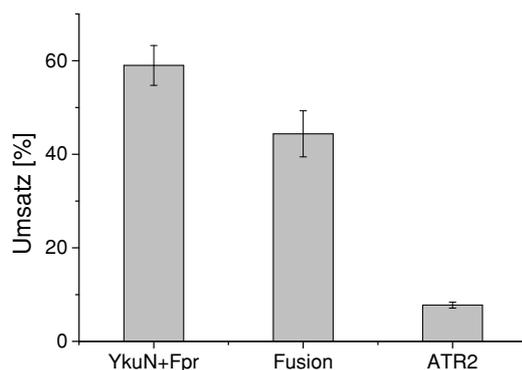


Abbildung 26. Vergleich des bakteriellen Redoxpartnersystems bestehend aus YkuN aus *B. subtilis* und Fpr aus *E. coli* mit der pflanzlichen Cytochrom-P450-Reduktase ATR2 in *in-vitro*-Reaktionen mit CYP71A16. Die Reaktionen wurden in einem Überkopfschüttler für 20 h und 25°C inkubiert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet.

Dabei stellten sich die beiden verwendeten bakteriellen Systeme als geeigneter als ATR2 für die CYP71A16-katalysierte Marnerol-Oxidation heraus. Mit dem bakteriellen Redoxpartnersystem bestehend aus den freien Enzymen YkuN und Fpr, konnte ein Umsatz von fast 60% erreicht werden. Mit der Fusion aus diesen Enzymen konnte ein Umsatz von knapp 45% detektiert werden. Mit der pflanzlichen CPR ATR2 (s. Kapitel 3.1.3) konnte ein Umsatz des Substrates von lediglich <10% detektiert werden. Die Kopplungseffizienz und die NADPH-Oxidationsraten wurden unter Verwendung der verschiedenen Redoxpartnersysteme bestimmt. Die Kopplungseffizienz war in allen Fällen gering, der höchste Wert von > 1% konnte beim Einsatz der Fusion aus YkuN und Fpr detektiert werden. Die höchste NADPH-Oxidationsrate konnte für das System bestehend aus CYP71A16 mit YkuN und Fpr mit 29 min^{-1} gemessen werden. Mit der ATR2 und der Fusion aus YkuN und Fpr konnten geringere Werte von $5,5 \text{ min}^{-1}$ und 11 min^{-1} ermittelt werden. Für weitere Experimente wurden die freien Enzyme YkuN und Fpr als Redoxpartner für CYP71A16 verwendet.

3.1.6 Identifikation des Produktes 23-Hydroxymarnerol

Das in der *in-vitro*-Reaktion mit CYP71A16 gebildete Oxidationsprodukt von Marnerol, wurde anhand der GC/MS-Spektren (s. Abbildung 27) mit Literaturdaten (Castillo *et al.* 2013) verglichen und konnte so als 23-Hydroxymarnerol identifiziert werden.

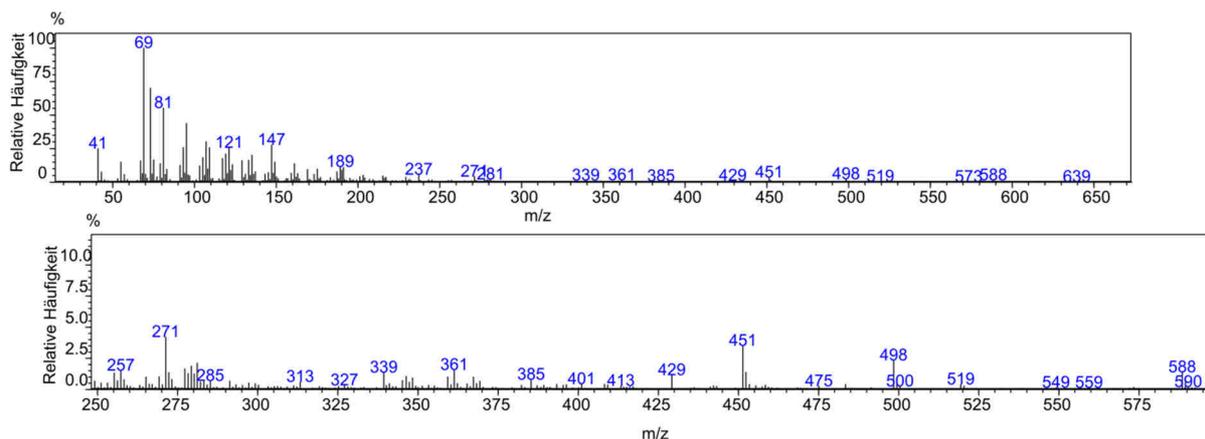


Abbildung 27. GC/MS Spektrum von dem in dieser Arbeit durch Marnerol-Oxidation hergestelltem 23-Hydroxymarnerol. Die untere Abbildung zeigt einen vergrößerten Ausschnitt im höheren m/z-Bereich des oberen Spektrums.

Das im GC/MS-Spektrum detektierte Molekülion mit einem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) von 588 resultiert aus der Summe der Masse von 23-Hydroxymarnerol von 444 g/mol und der Molekülmassen der beiden Silylgruppen mit insgesamt 144 g/mol. Die ebenfalls charakteristischen Fragmente mit den Masse/Ladungsverhältnissen von 498, 451 und 271, die mit den Literaturdaten übereinstimmen (Castillo *et al.* 2013), sind im Spektrum zu finden.

3.1.7 Einfluss von verschiedenen Lösungsvermittlern auf die CYP71A16-katalysierte Reaktion

Zunächst sollte die Funktionalität von CYP71A16 in *in-vitro*-Reaktionen getestet werden. Allerdings konnte in initialen Versuchen kein Produkt mittels GC/MS-Analyse festgestellt werden, da gereinigtes Protein ohne Triton X-100 im Aufschlusspuffer verwendet wurde. Erst als das nichtionische Detergenz Triton X-100 in der Reaktion präsent war, konnte eine Umsetzung von Marnerol festgestellt werden. Da Triton X-100 jedoch einen negativen Einfluss auf die Analytik, zum einen wegen der störenden zusätzlichen Signale und zum anderen wegen der Eigenschaft irreversibel an die Säule binden zu können, hat, wurde zunächst nach einem anderen Detergenz gesucht, welches sich leichter aus der Reaktion entfernen lässt oder in reinerer Form vorliegt als Triton X-100. Getestet wurden Fos-Cholin 14 (0,5% (w/v)), L- α -Phosphatidylcholin (0,5% (w/v)) und Igepal CO-520 (0,5% (v/v)). Nach 20 h Reaktionszeit konnte jedoch kein Reaktionsprodukt detektiert werden. Im Falle von Igepal CO-520 wurden viele Verunreinigungen auf dem Chromatogramm festgestellt, die zum Teil zur gleichen Zeit retentierten wie das erwartete Produkt. Triton X-100 stellte sich also trotz der Suche nach Alternativen als das, im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit getesteten Detergenzien, am besten geeignete Detergenz heraus. Da Triton X-100 und Marnerol hydrophobe Moleküle sind, musste eine sensitive Methode angewendet werden, um die Substanzen voneinander trennen zu können. Daher wurden nach durchgeführter

Extraktion und Trocknung, die Proben in 25% Methanol aufgenommen und anschließend eine Festphasenextraktion mit C-18 Material in Pipettenspitzen durchgeführt (Stage-Tip Extraktion). Eluiert wurde sequentiell mit verschiedenen Methanolkonzentrationen, die dann zunächst mittels GC/MS-Analyse auf An- bzw. Abwesenheit des Detergenz und des Eduktes sowie Produktes analysiert wurden. Dabei konnte beobachtet werden, dass Marnerol und das Produkt 23-Hydroxymarnerol bei einer Methanolkonzentration von 100% eluiert wurden, während diese Fraktion größtenteils frei von dem Detergenz war. Mit niedrigeren getesteten Methanolkonzentrationen konnten weder das Substrat noch das Produkt eluiert werden. Das Detergenz Triton X-100 war hauptsächlich in der Fraktion mit einer Methanolkonzentration von 75% zu finden (s. Abbildung 28). Eine Reinigung der Proben von dem Detergenz Triton X-100 konnte also erfolgreich angewendet werden.

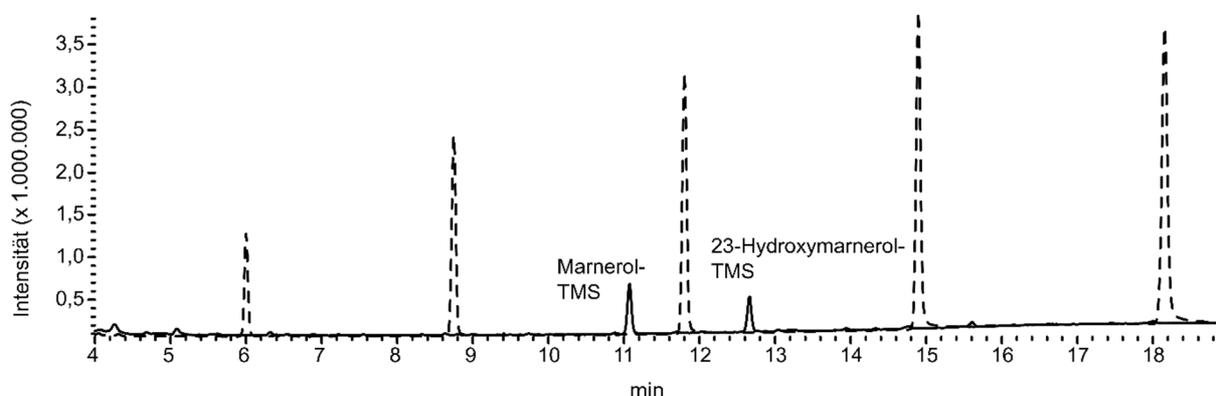


Abbildung 28. GC/MS Chromatogramme nach Marnerol-Oxidation durch CYP71A16. Gezeigt sind die Fraktionen der Stage-Tip Reinigung nach der Elution mit 100% Methanol (durchgezogene Linie) und 75% Methanol (gestrichelte Linie). Im Falle der Elutionsfraktion mit 100% Methanol konnte das Edukt Marnerol sowie das Produkt 23-Hydroxymarnerol detektiert werden. Im Falle der Elution mit 75% Methanol konnten Triton X-100 Peaks detektiert werden.

3.1.8 Optimierung der Reaktionsbedingungen der CYP71A16-katalysierten Oxidation von Marnerol

Die durchgeführten *in-vitro*-Reaktionen zur CYP71A16-katalysierten Marnerol-Oxidation, wurden in den vorher beschriebenen Experimenten im Überkopfschüttler mit einer langsamen Rotation (10 rpm) der Proben durchgeführt. Diese Methode der Inkubation wurde mit der Inkubation im Thermoschüttler (450 rpm) und der Inkubation im Stehen ohne Schütteln verglichen. Dabei wurden Reaktionsansätze mit einem Gesamvolumen von 250 μ L in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen verwendet. Hierbei zeigte sich, dass nach 20-stündiger Inkubation im Thermoschüttler ein relativer Umsatz von >99% detektiert werden konnte, während bei der Inkubation im Überkopfschüttler lediglich ein Umsatz von ~60% erreicht wurde. Die Inkubation der Reaktion im Stehen ohne kontinuierliche Durchmischung führte zu einem relativen Umsatz von ~30%. Der Sauerstoffeintrag und vermutlich auch die

Durchmischung mit dem wenig wasserlöslichen Substrat scheint demnach bei der Inkubation im Thermoschüttler vorteilhaft für die durchgeführte Reaktion unter Beteiligung der verwendeten Enzyme. Die weiteren Versuche wurden folglich im Thermoschüttler durchgeführt.

3.1.9 Zeitverlauf der CYP71A16-katalysierten Marnerol-Oxidation

Im Folgenden wurde der Zeitverlauf der Oxidation von Marnerol durch CYP71A16 aufgenommen (s. Abbildung 29). Dabei wurde die Verwendung der P450-Konzentrationen von 1 μM und 2 μM verglichen.

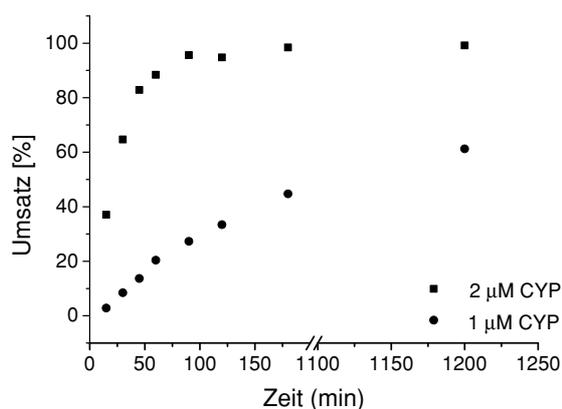


Abbildung 29. Marnerol-Oxidation katalysiert durch 2 μM CYP71A16 (viereckige Symbole) bzw. 1 μM CYP71A16 (runde Symbole), die Redoxpartner YkuN und Fpr wurden im vierfachen Überschuss zur P450 eingesetzt. Dargestellt ist die relative Konversion von 100 μM Marnerol nach verschiedenen Zeitpunkten (15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 1200 min). Die 250 μL -Reaktionen wurden in einem Thermoschüttler bei 450 rpm und 25°C inkubiert.

Bei dem Einsatz von 2 μM P450, konnte schon nach einer 15-minütigen Inkubationszeit ein Umsatz von knapp 37% beobachtet werden, nach 180 min war der Umsatz nahezu vollständig (> 98,5%). Auffällig bei dieser Analyse über die Zeit war, dass sich nach einiger Zeit ein Überoxidationsprodukt ausbildete, dessen Peakfläche mit der Zeit weiter zunahm (s. Tabelle 19). Das Überoxidationsprodukt wies, wie mittels GC/MS-Analyse ermittelt wurde, ein Molekülion von m/z 514 auf (s. Anhang, Abbildung 42), was darauf schließen lässt, dass eine der Hydroxylgruppen zu einem Aldehyd oxidiert wurde. Bei der Verwendung von 1 μM Enzym lag nach einer Zeit von 1200 min der Umsatz lediglich bei knapp 60%. Das Überoxidationsprodukt konnte in nur geringen Mengen (< 1%) nach der finalen Reaktionszeit detektiert werden. Wie erwartet zeigte sich insgesamt ein deutlich langsamerer Reaktionsverlauf im Vergleich zu dem Verlauf unter Verwendung von 2 μM P450.

Tabelle 19. Produktverteilung der Marnerol-Oxidation durch 2 μM CYP71A16 nach verschiedenen Zeitpunkten (15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 1200 min).

Reaktionszeit [min]	23-Hydroxymarnerol [%]	Überoxidationsprodukt [%]
15	100,0	
30	96,7	3,3
45	94,8	5,2
60	92,5	7,5
90	87,8	12,2
120	87,7	12,3
180	79,4	20,6
1200	68,4	31,6

3.1.10 Kinetische Konstanten von CYP71A16

Zur Bestimmung kinetischer Parameter von CYP71A16, wurden *in-vitro*-Reaktionen mit Marnerol-Konzentrationen von 10-500 μM durchgeführt. Die Reaktionen wurden nach 2,5 min durch die Extraktion mit Ethylacetat gestoppt. Die Konzentration an gebildetem Produkt wurde über die relativen Peakflächen der GC/MS-Analyse ermittelt. Durch die Auftragung der Produktkonzentration (23-Hydroxymarnerol) pro min gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen konnten mittels der Michaelis-Menten-Gleichung die kinetischen Parameter bestimmt werden (s. Abbildung 30). Hierbei ergab sich ein K_M -Wert von $142,1 \pm 29,3 \mu\text{M}$ und ein k_{cat} -Wert von $3,9 \text{ min}^{-1}$.

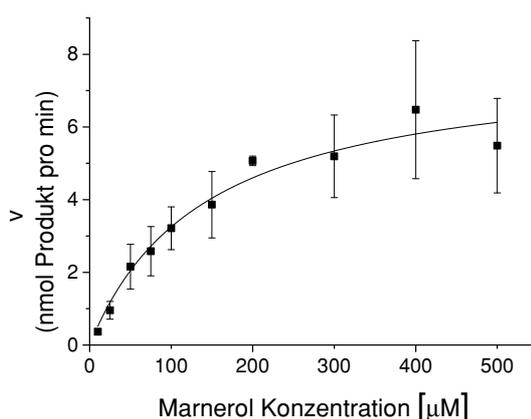


Abbildung 30. Marnerol-Umwandlung katalysiert durch CYP71A16 mit YkuN und Fpr als Redoxpartnern. Dargestellt ist die Reaktionsgeschwindigkeit in nmol Produkt pro min bei verschiedenen eingesetzten Marnerolkonzentrationen (10-500 μM). Die Reaktionen wurden in einem Thermoschüttler bei 450 rpm und 25°C für 2,5 min inkubiert. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus drei Experimenten.

3.1.11 Bestimmung der Funktionalität von CYP705A12

Da die natürliche Funktion von CYP705A12 noch nicht bekannt ist, aber vermutet wird, dass diese Cytochrom-P450-Monooxygenase ebenfalls in den Marneral-/Marnerol-Metabolismus in *A. thaliana* involviert ist (Field *et al.* 2011), wurde in *in-vitro*-Reaktionen getestet ob CYP705A12 in der Lage ist, 23-Hydroxymarnerol als Substrat zu akzeptieren und dementsprechend das Molekül weiter zu oxidieren. Dazu wurden zum einen CYP71A16 und CYP705A12 zusammen in einer Reaktion mit Marnerol verwendet. Zum anderen wurde CYP705A12 erst nach 20 h, also nach Ablauf der CYP71A16-katalysierten Reaktion, zugegeben. Eine dritte Möglichkeit war es, die Reaktion durch CYP71A16 für 20 h ablaufen zu lassen, die Probe zu extrahieren und zu trocknen und das Extrakt in einer Reaktion mit CYP705A12 einzusetzen. In allen Fällen war mittels GC/MS kein neuer Peak zu detektieren. 23-Hydroxymarnerol war also unter den getesteten Bedingungen kein Substrat für CYP705A12.

3.1.12 Substratbindestudien mit CYP71A16 und CYP705A12

Die gereinigten P450-Enzyme, CYP71A16 und CYP705A12, wurden für die Identifizierung potentieller Substrate und zur Bestimmung von Substratdissoziationskonstanten (K_D) in sogenannten Substratbindestudien verwendet. Die Substratbindung im aktiven Zentrum sollte dabei durch Typ I-Bindespektren detektiert werden. Durch diese Versuche sollte ein Eindruck gewonnen werden, welche Substanzen von CYP71A16 und CYP705A12 gebunden werden und so potentiell umgesetzt werden können. Bei gebundenen Substraten konnte zudem eine Dissoziationskonstante zur Enzymcharakterisierung bestimmt werden. Dabei wurden neben Marnerol auch Triterpenoide ausgewählt, die sich strukturell von dem natürlichen Substrat von CYP71A16 unterscheiden. Diese getesteten Triterpenoide wiesen tetra- und pentazyklische Strukturen auf. Außerdem wurden mit den Diterpenoiden Agatholal und Valencen zwei Substanzen ausgewählt, die durch die geringere Anzahl an Zyklen eher strukturelle Ähnlichkeiten zu Marnerol aufweisen. Beide Diterpenoide sind bityklisch, während Marnerol ein monozyklisches Molekül ist. In Tabelle 20 sind die Ergebnisse zusammengefasst; hierbei wurde aufgezeigt welche Substanzen gebunden werden (+) und welche nicht (-). Marnerol wurde erwartungsgemäß von CYP71A16 gebunden. Das bityklische Diterpenoid Agatholal jedoch wurde von CYP705A12 gebunden, während Marnerol hingegen nicht von dieser Cytochrom-P450-Monooxygenase gebunden wurde. Alle anderen getesteten Substanzen wurden nicht von CYP71A16 und CYP705A12 gebunden.

Tabelle 20. In Substratbindestudien mit CYP71A16 und CYP705A12 getestete Substanzen. Ein „+“ kennzeichnet die Substratbindung und bei einem „-“ konnte keine Bindung detektiert werden.

Getestete Substanz	CYP71A16	CYP705A12
Taraxasterol	-	-
α -Amyrin	-	-
Cycloartenol	-	-
Lupeol	-	-
Butyrospermol	-	-
Ergosterol	-	-
Valencen	-	-
Agatholal	-	+
Marnierol	+	-

In Abbildung 31A sind die Typ I-Spektren der Bindung von Marnierol an CYP71A16 zu sehen. Sequentiell wurde Substrat zu der Enzymlösung zugegeben und die Absorption zwischen 550 nm und 330 nm gemessen. Es bildete sich ein Typ I-Bindespektrum aus, was an dem Maximum bei 393 nm und einem Minimum bei 429 nm ausgemacht werden konnte. Anschließend wurde die Absorptionsdifferenz (Δ Absorption) gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen aufgetragen (s. Abbildung 31B). Es konnte ein K_D -Wert von 225 für die Bindung von Marnierol kalkuliert werden. Die Steigerung der eingesetzten Substratkonzentration über 645 μ M hinaus war durch die eingeschränkte Löslichkeit von Marnierol in dem wässrigen System beschränkt. Dies zeigte sich durch eine zunehmende Trübung der Messlösung mit steigender Substratkonzentration.

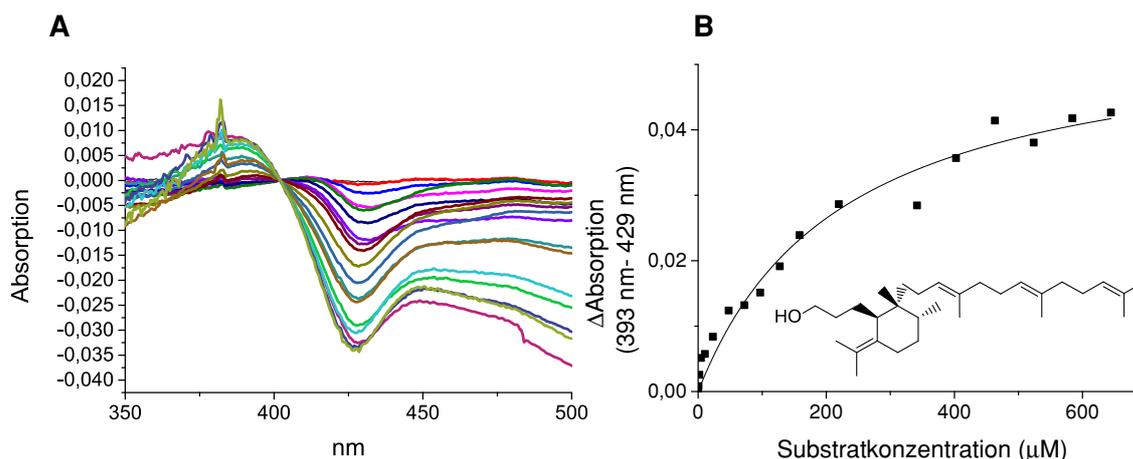


Abbildung 31. A) Typ I-Spektrum der Bindung von Marnerol an CYP71A16. Das Absorptionsmaximum wurde bei 393 nm und das Absorptionsminimum bei 429 nm detektiert. Marnerol-Konzentrationen von 0-645 µM wurden zugegeben. B) Die Δ Absorptionen von Maximum und Minimum wurden gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen aufgetragen. Die Kurve wurde mittels Formel 4 (s. Kapitel 2.6.10) angepasst.

In Abbildung 32A sind die Typ I-Spektren der Bindung von Agatholal an CYP705A12 zu sehen. Das Absorptionsmaximum wurde bei 385 nm und das Minimum bei 420 nm detektiert. Die Δ Absorption wurde bestimmt und gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen aufgetragen (s. Abbildung 32B). Die Dissoziationskonstante K_D konnte durch die Sättigungskurve bestimmt werden. Der kalkulierte K_D -Wert für Agatholal für CYP705A12 betrug 5,5 µM.

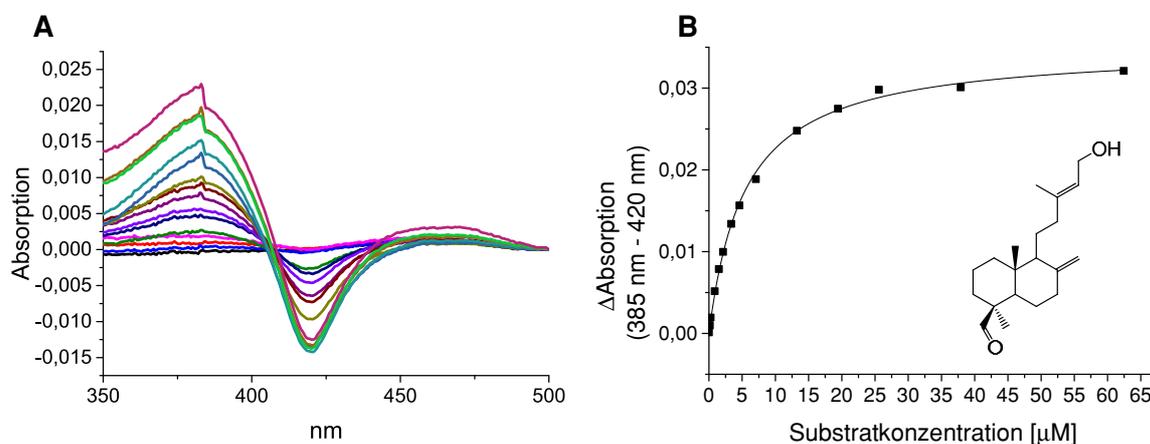


Abbildung 32. A) Typ I-Spektrum der Bindung des Diterpenoids Agatholal an CYP705A12. Das Absorptionsmaximum wurde bei 385 nm und das Absorptionsminimum bei 420 nm detektiert. Agatholal-Konzentrationen von 0-63 µM wurden eingesetzt. B) Die Δ Absorptionen von Maximum und Minimum wurden gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen (Agatholal, Struktur wird gezeigt) aufgetragen. Die Kurve wurde mittels Formel 4 (s. Kapitel 2.6.10) angepasst.

3.2 Oxidation von Triterpenoiden mittels CYP102A1 (P450-BM3) Mutanten

Viele Triterpenoid-oxidierende pflanzliche P450-Enzyme bleiben leider unentdeckt. In solchen Fällen können bekannte Cytochrom-P450-Monooxygenasen durch Proteinengineering verändert werden, um nicht-physiologische Substrate zu akzeptieren. Außerdem können in diesen Reaktionen neue oxyfunktionalisierte Derivate mit interessanten Eigenschaften hergestellt werden, die in der Natur nicht vorkommen. Dieser zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Oxidation dreier pentazyklischer Triterpenoide, α - und β -Amyrin sowie Lupeol und eines tetrazyklischen Triterpenoids, Cycloartenol, durch Mutanten der bakteriellen P450-BM3 mit dem Ziel der Synthese möglicher neuer Verbindungen.

Die Ziele dabei waren, nach der Selektion und weiterer Optimierung einer geeigneten P450-Variante, möglichst neue Substanzen mit potentiell biologischen Eigenschaften zu synthetisieren und die Position der Oxidation mittels NMR-Analysen aufzuklären. Hierzu wurden zunächst verschiedene Varianten der bakteriellen Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP102A1 (P450-BM3) aus *B. megaterium* in *in-vitro*-Reaktionen mit Triterpenoid-Substraten getestet. P450-BM3 wurde ausgewählt, da das Enzym gut untersucht ist und schon diverse Mutanten zur Oxidation nicht-physiologischer Substrate eingesetzt wurden (s. Kapitel 1.2.5.1). Nach einem Screening nach geeigneten Enzymvarianten sollte die enzymatische Reaktion zunächst optimiert werden, um anschließend den Reaktionsmaßstab zu vergrößern. Das Ziel dessen war die Produktisolierung und anschließende Aufklärung der Oxidationsposition mittels NMR-Analysen.

3.2.1 Auswahl der P450-BM3 Varianten für die Oxidation von Triterpenoiden

3.2.1.1 Screening einer P450-BM3-Bibliothek zur Triterpenoid-Oxidation

Zunächst wurden Hinweise auf Aminosäurereste der P450-BM3 gesammelt, die für die Umsetzung der oben genannten Triterpenoid-Substrate wichtig sind. Zu diesem Zweck wurde eine am Institut vorhandene P450-BM3-Bibliothek mit circa 150 Enzym-Varianten mit bekannten und unbekanntem Mutationen für die Oxidation von β -Amyrin (ein pentazyklisches Triterpenoid) durchmustert. Dazu wurden nach erfolgter Expression der P450-BM3-Varianten in 96-Well-Platten, Zell-Lysate gewonnen und in *in-vitro*-Reaktionen eingesetzt. Bei der anschließenden GC/MS-Analyse wurde die Dreifachmutante V78A F87A I263G identifiziert, die in der Lage war, β -Amyrin als Substrat zu akzeptieren. Mittels GC/MS-Analyse konnten Peaks für drei Produkte im Vergleich zur Negativkontrolle detektiert werden.

3.2.1.2 Rationales Proteindesign basierend auf den Screening-Ergebnissen zur Oxidation von Lupeol

Die im ersten Screening (s. Kapitel 3.2.1.1) gewonnenen Erkenntnisse wurden genutzt, um die identifizierten Aminosäuren der P450-BM3 an den Positionen 78, 87 und 263 schrittweise durch Mutagenese zu verändern. Dazu wurden Einzel-, Doppel- und Dreifachmutanten von P450-BM3 hergestellt, um die Bedeutung der identifizierten Aminosäure-Positionen auf die Substratoxidation zu untersuchen. Alle drei Aminosäurepositionen befinden sich in der Nähe des Häm-Eisens (s. Abbildung 33), es handelt sich um sogenannte Aminosäurereste der ersten Sphäre (Kolev *et al.* 2014). Die wildtypischen Aminosäuren an diesen Positionen (Valin 78, Phenylalanin 87 und Isoleucin 263) wurden durch die kleinen Aminosäuren Alanin und Glycin ausgetauscht, um so mehr Platz für die großen Triterpenoid-Substrate im aktiven Zentrum zu schaffen. Als Substrat wurde in den Versuchen das pentazyklische Lupeol verwendet.

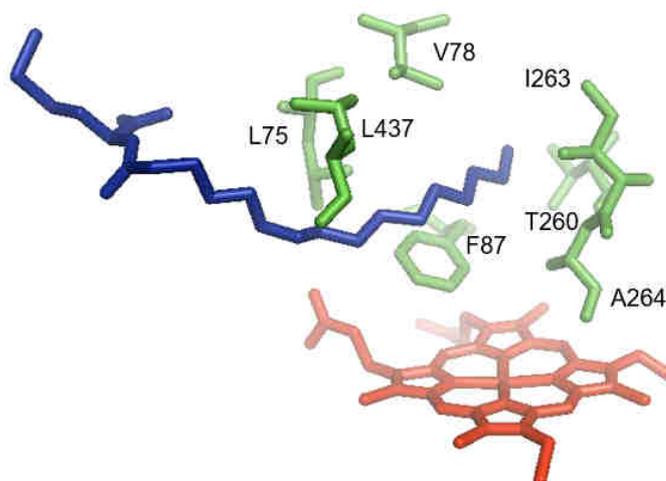


Abbildung 33. Substratbindetasche der P450-BM3 aus *B. megaterium* (PDB-Code PZO9 (Hegde *et al.* 2007)). Gezeigt ist die Kokristallisation der P450-BM3 mit dem Substrat N-Palmitoylmethionin (blau). Die Hämgruppe ist in rot dargestellt und ausgewählte Aminosäuren in grün.

Wie aus Abbildung 34 ersichtlich wird, kann das P450-BM3-Wildtyp-Enzym Lupeol nicht umsetzen. Auch beim Einsatz der P450-BM3-Variante F87G konnte kein Produkt detektiert werden. Die P450-BM3-Mutante F87A setzte das Triterpenoid hingegen um, wenn auch in sehr geringen Maße (<1%). Dies wurde mittels GC/MS-Analyse anhand eines neuen Peaks im Vergleich zur Negativkontrolle bestimmt. Die P450-BM3-Mutante F87A wurde demnach als Ausgangsmutante für weitere Mutagenesen verwendet. Im Wildtyp ragt die Seitenkette des aromatischen Phenylalanins an Position 87 in das Lumen des Substrateingangskanals. Diese Aminosäure wird häufig durch Aminosäuren mit kleineren Seitenketten ausgetauscht,

mit dem Ziel mehr Raum in der Umgebung des Häm-Eisens zu schaffen (Whitehouse *et al.* 2012).

Nach Reaktionen zur Umsetzung von Lupeol mit den erzeugten P450-BM3-Doppelmutanten V78G F87A, V78A F87A und F87A I263G, konnte gezeigt werden, dass mit diesen Mutanten ein höherer Umsatz des Substrates im Vergleich zum Einsatz der Einfachmutante F87A erfolgte. Mit der P450-BM3-Doppelmutante F87A I263A konnte jedoch keine Umsetzung von Lupeol verzeichnet werden. Der höchste Umsatz wurde mit der P450-BM3-Mutante V78G F87A, mit einer Steigerung um einen Faktor von über 25, im Vergleich zur Einfachmutante F87A, verzeichnet. Die P450-BM3-Doppelmutante V78A F87A hingegen, setzte das Substrat lediglich zu 2% um. Basierend auf diesen Ergebnissen, wurden im nächsten Schritt beide vorteilhaften Aminosäureaustausche V78G und I263G in der F87A Ausgangsmutante kombiniert. Der Umsatz von Lupeol konnte durch die Verwendung der P450-BM3-Mutante V78G F87A I263G um den Faktor 2 im Vergleich zur zuvor eingesetzten P450-BM3-Doppelmutante V78G F87A gesteigert werden (7% vs. 14%).

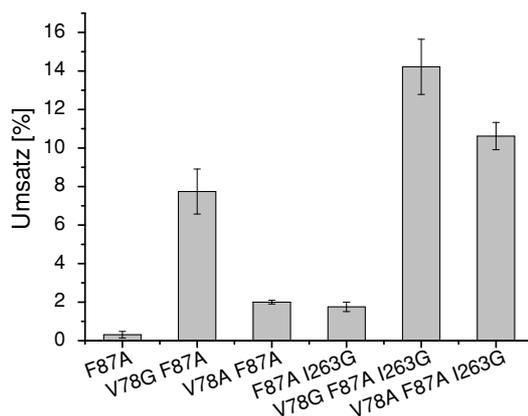


Abbildung 34. Umsetzung von 100 µM Lupeol durch verschiedene P450-BM3-Varianten. Gezeigt ist der Umsatz in % nach einer Reaktionszeit von 20 h bei 25°C. Es wurden 2 µM P450-BM3, 620 U/mL Katalase in einem finalen Volumen von 500 µL in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 eingesetzt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten.

Nach Evaluation der P450-BM3-Variante V78G F87A I263G wurde eine literaturbasierte Suche durchgeführt. Das Ziel war es, die Aktivität der Dreifachmutante V78G F87A I263G weiter zu erhöhen. Hierbei wurden weitere Aminosäuren adressiert, die sich ebenfalls in der Nähe des Häm-Eisens befinden, nämlich L75, T260, A264 und L437 (s. Abbildung 33). Diese Aminosäuren wurden in verschiedenen Arbeiten zur Mutagenese von P450-BM3 zur Umsetzung nicht-physiologischer großer Substrate, wie des makrozyklischen Diterpenoids β -Cembrendiol und des Steroids Trimethylestriol, verwendet (Carmichael und Wong 2001; Le-Huu *et al.* 2015; Lewis *et al.* 2010). In dieser Arbeit wurden die natürlichen Aminosäuren dieser Positionen wiederum durch die Aminosäuren Alanin und Glycin getauscht, um mehr Platz im aktiven Zentrum zu schaffen. Der Umsatz von Lupeol nach Einsatz der erzeugten

P450-BM3-Varianten ist in Abbildung 35 gezeigt. Mit den beiden Enzymvarianten, die zusätzlich an der Position 75 mutiert waren, konnte keine Oxidation von Lupeol erzielt werden. Lediglich mit der P450-BM3-Vierfachmutante V78G F87A I263G T260G ist ein vergleichbarer Umsatz zur Dreifachmutante V78G F87A I263G von ~14% detektierbar. Das Einführen weiterer Mutationen an den ausgewählten Positionen der P450-BM3-Dreifachmutante V78G F87A I263G führte also insgesamt nicht zu einer Steigerung des Umsatzes von Lupeol, weshalb die Dreifachmutante für weitere Versuche verwendet wurde.

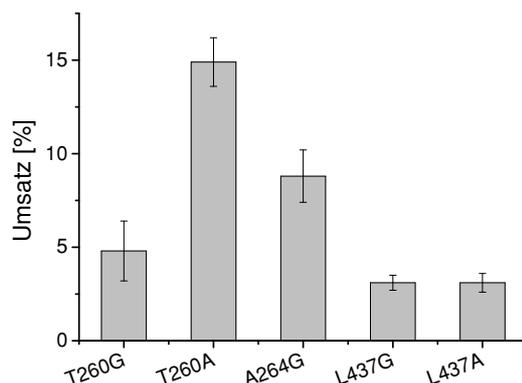


Abbildung 35. Umsetzung von 100 μM Lupeol durch die P450-BM3-Mutante V78G F87A I263G. Die Reaktionszeit betrug 20 h bei 25°C. Es wurden 2 μM P450-BM3, 620 U/mL Katalase in einem finalen Volumen von 500 μL in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 eingesetzt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten.

3.2.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Da der erzielte Umsatz von Lupeol durch Verwendung der P450-BM3-Dreifachmutante V78G F87A I263G lediglich bei ~14% lag (s. Kapitel 3.2.1.2), wurden im nächsten Schritt Versuche zur Optimierung der Reaktionsbedingungen durchgeführt, mit dem Ziel den Umsatz zu steigern. Hierbei wurden die Parameter Reaktionszeit, Konzentration des Biokatalysators, die Verwendung von Lösungsvermittlern und die Regeneration des Kofaktors NADPH untersucht.

Um zu evaluieren, ob die Reaktionszeit einen Einfluss auf den Umsatz hat, wurde sie zunächst auf 40 h verlängert (s. Abbildung 36A). Mit dieser Verdopplung der Reaktionszeit konnte der Umsatz im Vergleich zu 20 h allerdings nicht deutlich verbessert werden (~16%).

Als nächstes wurden Reaktionen mit Konzentrationen von 2, 4 und 6 μM der P450-BM3-Dreifachmutante V78G F87A I263G (s. Abbildung 36B) verglichen. Dabei konnte eine Zunahme des Umsatzes von Lupeol mit steigender P450-BM3-Konzentration detektiert werden (35% mit 6 μM P450-BM3).

Lupeol und die anderen gewählten Triterpenoide dieser Arbeit sind aufgrund ihrer unpolaren Strukturen nahezu wasserunlöslich. Aus diesem Grund wurde das Cyclodextrin (2-

Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (HP- β -CD) als Lösungsvermittler in der Reaktion eingesetzt. HP- β -CD wurde bereits erfolgreich zur Solubilisierung von Triterpenoiden und Steroiden verwendet (Bracco *et al.* 2013; Strüh *et al.* 2012). Cyclodextrine sind Moleküle, die aus ringförmig angeordneten Glucoseeinheiten bestehen. Durch den hydrophoben Charakter des Inneren der Kavitäten und der hydrophilen Eigenschaft der äußeren Fläche, lassen sich auch wasserunlösliche Substanzen in wässrige Lösungen bringen (Singh *et al.* 2002). Mittels GC/MS-Analyse konnte bestätigt werden, dass der Umsatz von Lupeol in Anwesenheit von 2% und 4% (w/v) des Cyclodextrins deutlich gesteigert werden konnte. Der Umsatz war mit bis zu 98% nach Stoppen der Reaktion nach 20 h nahezu vollständig (s. Abbildung 36C).

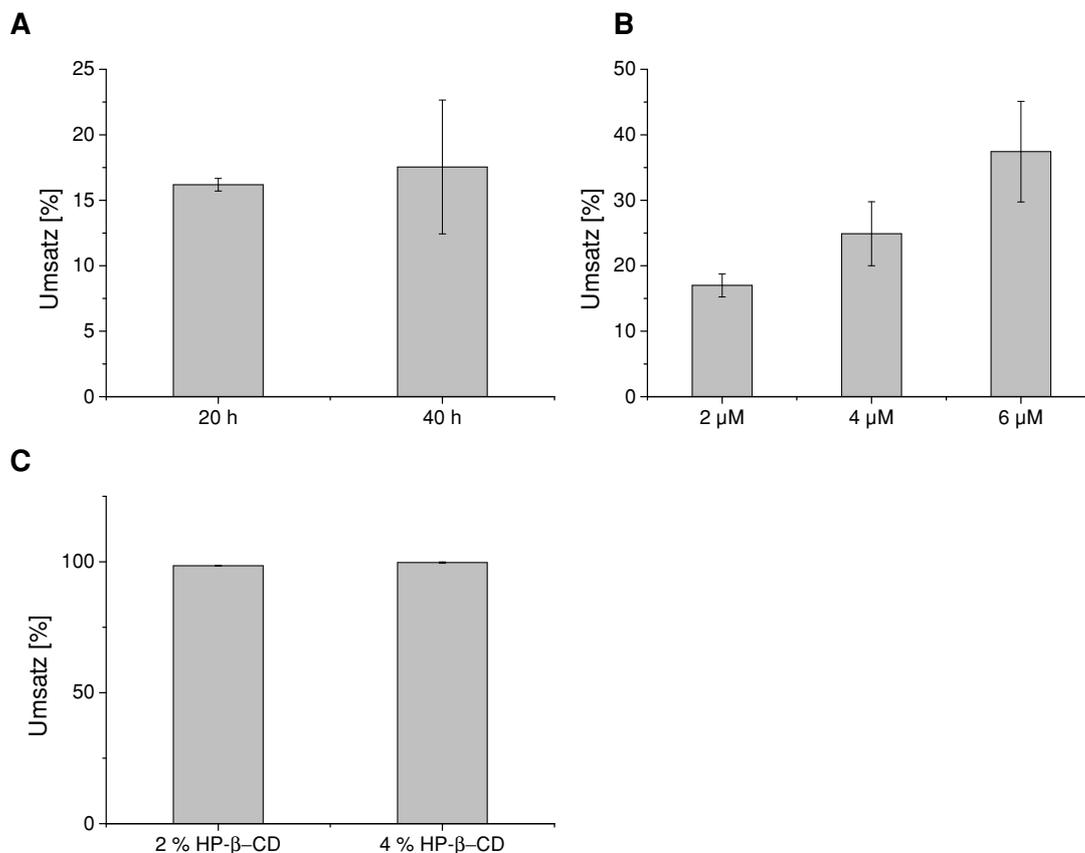


Abbildung 36. Umsetzung von Lupeol durch die P450-BM3-Dreifachmutante V78G F87A I263G. Getestet wurden verschiedene Reaktionsbedingungen. A) Testen unterschiedlicher Reaktionszeiten von 20 h und 40 h in Gegenwart von 100 μ M Substrat und 2 μ M P450. B) Verwendung von unterschiedlichen P450-Konzentrationen von 2 μ M, 4 μ M und 6 μ M. Die Substratkonzentration betrug 100 μ M und die Reaktionszeit 20 h. C) Verwendung von 2% und 4% (w/v) (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (HP- β -CD) als Lösungsvermittler in Gegenwart von 6 μ M P450. Die Reaktionstemperatur betrug in allen Fällen 25°C, zudem wurden 620 U/mL Katalase in einem finalen Reaktionsvolumen von 500 μ L in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 eingesetzt Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten. In den Fällen bei denen die Standardabweichung nicht sichtbar ist, lag diese bei <0,4.

Da in den Reaktionen kein Kofaktorregenerierungssystem zur Regenerierung von NADPH eingesetzt wurde und die 4-fache Menge reduzierter Kofaktor im Verhältnis zur eingesetzten Substratkonzentration verwendet wurde, müsste die Kopplung P450-BM3-Dreifachmutante

V78G F87A I263G theoretisch bei 25% liegen. Im anschließenden Experiment zur Bestimmung der Kopplung wurde jedoch ein Wert von knapp 1% Kopplung bestimmt. Mit dem Ziel, die Reaktion durch mehr verfügbaren Kofaktor zu beschleunigen, wurden zwei verschiedene Kofaktorregenerierungssysteme in den Lupeol-Umsetzungsreaktionen getestet. Ziel dieser Versuche war zudem, NADPH einzusparen, was vor allem beim Umsatz größerer Mengen einen Vorteil bietet. Zum einen wurde die Glucose-Dehydrogenase (GDH) aus *B. megaterium* mit Glucose als Substrat eingesetzt und zum anderen wurde die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) aus *S. cerevisiae* mit Glucose-6-Phosphat als Substrat verwendet. Mit keinem der beiden eingesetzten Systeme konnte eine Verbesserung des Lupeol-Umsatzes im Vergleich zu der Reaktion ohne extern zugegebenes Kofaktorregenerierungssystem beobachtet werden. Im Vergleich zum Ansatz ohne Regenerierungssystem konnten sogar geringere Umsätze von Lupeol detektiert werden. Bei der Verwendung der GDH wurde ein um den Faktor von ~7 geringerer Umsatz erzielt, verglichen mit der Reaktion ohne Regenerierung. Auch mit der G6P-DH wurde ein geringerer Umsatz detektiert. Es konnten nur knapp 60% der Aktivität im Vergleich zu dem System ohne Regenerierung erzielt werden. Demnach wurde in den weiteren Versuchen auf ein Kofaktorregenerierungssystem verzichtet. Die Regenerierung des Kofaktors erfolgte scheinbar durch die im Zell-Lysat enthaltenen *E. coli*-Proteine.

3.2.3 Produktverteilung nach der Umsetzung von Lupeol

Ausgewählte P450-BM3-Varianten, die in der Lage waren Lupeol zu oxidieren (s. Kapitel 3.2.1.2), wurden im Folgenden verwendet, um die Reaktion unter optimierten Bedingungen (s. Kapitel 2.7.3.3) zu wiederholen und die mittels GC/MS detektierten Produktverteilungen und Umsätze zu bestimmen (s. Tabelle 21).

Tabelle 21. Prozentuale Verteilungen der Lupeol-Oxidationsprodukte und Umsatz von Lupeol. Die Reaktionen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt; bei Werten ohne aufgeführte Standardabweichung ist diese <1. RT=Retentionszeit.

P450-BM3-Variante	Umsatz in %	P1 (%), RT 16,0 min	P2 (%), RT 18,0 min	P3 (%), RT 18,5 min	P4 (%), RT 19,1 min	Andere Produkte (%)
V78G F87A	75 ± 1	42 ± 1	6	45	4	4 ± 1
V78A F87A	17 ± 1	100	-	-	-	-
F87A I263G	6 ± 1	100	-	-	-	-
V78G F87A I263G	96	9 ± 1	9 ± 1	74 ± 2	5 ± 1	2 ± 1

Wie schon zuvor beobachtet (s. Kapitel 3.2.1.2), wurde mit der P450-BM3-Dreifachmutante V78G F87A I263G der höchste Umsatz erzielt. Mit der P450-BM3-Doppelmutante V78G F87A konnte unter optimierten Bedingungen ein Umsatz von 75% beobachtet werden (im Vergleich zu 7% unter nicht optimierten Bedingungen), jedoch eine andere Produktverteilung als mit der Dreifachmutante. In der GC/MS-Analyse tauchte der Produktpeak 1 nach der Reaktion mit der P450-BM3-Zweifachmutante V78G F87A mit einem Anteil von knapp 42% auf, während dieser bei der Reaktion mit der Dreifachmutante lediglich 9% ausmachte. Nach der Reaktion mit der zuvor genannten Doppelmutante, konnte zudem der Produktpeak 3 mit 45% detektiert werden. Dieser Peak stellte bei der Dreifachmutante das Hauptprodukt mit >70% dar. Die anderen beiden getesteten P450-BM3-Zweifachmutanten V78A F87A und F87A I263G wiesen geringe Umsätze von 17% und 6% auf, es konnte lediglich Produktpeak 1 detektiert werden, dies kann jedoch mit dem geringen Umsatz und der theoretisch geringen Signalintensität von weiteren möglichen Produkten zusammenhängen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die P450-BM3-Dreifachmutante V78G F87A I263G den höchsten Umsatz mit einer hohen Selektivität für die Bildung des Produktes 3 aufweist. Mit der P450-BM3-Zweifachmutante V78G F87A kann ebenfalls ein hoher Umsatz erreicht werden, allerdings ist die Selektivität mit zwei Hauptprodukten mit gleichen Anteilen geringer. Mit den anderen beiden getesteten Doppelmutanten konnten auch unter optimierten Reaktionsbedingungen lediglich geringe Umsätze erzielt werden.

Mittels der durchgeführten MS-Analyse konnten auch Rückschlüsse auf die Art der Oxidation der Produkte gezogen werden. Hierbei musste berücksichtigt werden, dass die Proben zuvor silyliert wurden. Zu erwartende m/z -Werte für die Molekülonen für das Substrat sowie detektierte Produkte sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Für das silylierte Substrat Lupeol konnte erwartungsgemäß mittels Massenspektrum das Molekülion mit einem Masse/Ladungsverhältnis m/z von 498 detektiert werden. Produkt 1 weist ein Molekülion mit m/z von 586 auf, was auf eine Hydroxylierung von Lupeol schließen lässt. Wäre an dieser Stelle ein Epoxid entstanden, würde die Epoxygruppe im Gegensatz zur Hydroxylgruppe nicht silyliert werden und in einem Molekülion mit einem geringeren Masse/Ladungsverhältnis resultieren. Bei Produkt 2 ließ sich aufgrund der geringen Signalintensitäten kein eindeutiges Molekülion identifizieren. Bei Produkt 3 hingegen konnte ein Molekülion mit einem Masse/Ladungsverhältnis m/z von 600 beobachtet werden, was auf die Bildung einer Säurefunktion schließen lässt. Ebenfalls denkbar wäre, aufgrund der detektierten Masse, eine einfache Hydroxylierung und die Bildung einer Keto-/Aldehydfunktion an einer weiteren Position. Bei Produkt 4 ließ sich ebenfalls kein eindeutiges Molekülion anhand der Spektren bestimmen.

Tabelle 22. Übersicht über die zu erwartenden Masse/Ladungsverhältnisse der Oxidationsprodukte von Lupeol nach Silylierung (TMS).

Modifizierung Lupeol	Molekülion (Masse/Ladungsverhältnis m/z)
+ TMS	498
+ 2x TMS + O	586
+ 2x TMS + 2x O - 2x H	600

3.2.4 Zeitverlauf der Oxidation von Lupeol katalysiert durch die P450-BM3-Mutante V78G F87A I263G

Um mehr Informationen über den Ablauf der Reaktion über die Zeit zu gewinnen, wurde der Reaktionsverlauf der Lupeol-Oxidation katalysiert durch die P450-BM3-Mutante V78G F87A I263G über die Zeit, ohne extern zugegebenes Kofaktorregenerierungssystem, beobachtet. Dazu wurden Proben nach 0; 0,5; 2; 5 und 20 h mittels GC/MS analysiert. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 37 ein GC/MS Chromatogramm nach 5 h Reaktionszeit dargestellt.

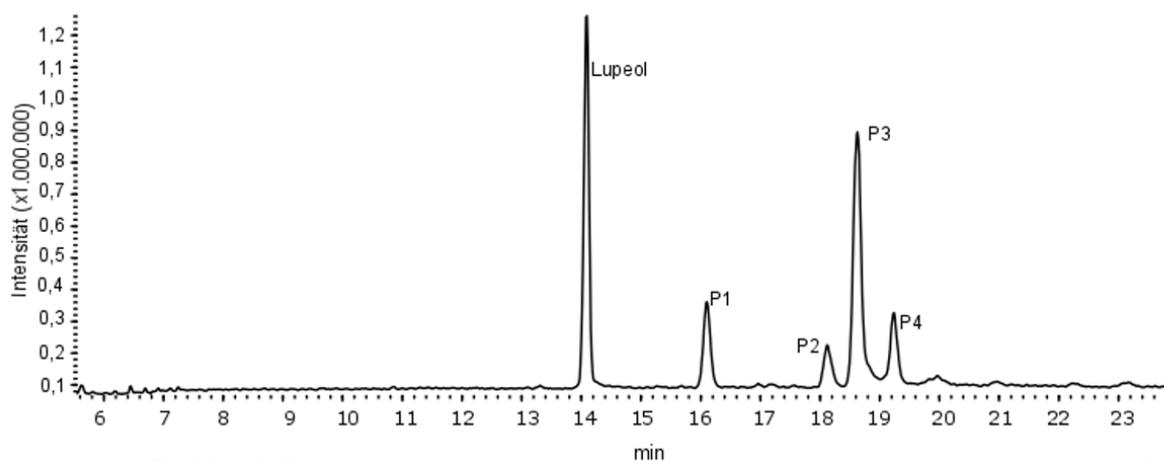


Abbildung 37. GC/MS Chromatogramm der Umsetzung von Lupeol katalysiert durch die P450-BM3-Mutante V78G F87A I263G nach einer Reaktionszeit von 5 h.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Abweichend zu dem Versuch der Produktverteilung in Kapitel 3.2.3 wurden hier statt 4% HP- β -CD nur 2% des Lösungsvermittlers eingesetzt, was leicht abweichende Ergebnisse erklären kann. Zudem wurden bei der Auswertung des Zeitverlaufs nur die gebildeten Produkte 1-4 berücksichtigt. Der Umsatz betrug nach 0,5 h bereits 7%, alle 4 Produkte konnten zu diesem Zeitpunkt detektiert werden. Der prozentuale Anteil des Hauptproduktes 3 war nach 20 h mit 88% am höchsten. Die anderen Produkte P1, P2 und P4 waren nach 20 h nur noch in geringem Maße zu (<5%) zu detektieren.

Tabelle 23. Umsätze und Produktverteilung der Oxidation von Lupeol durch die P450-BM3-Mutante V78G F87A I263G nach 0,5; 2; 5 und 20 h Reaktionszeit. Die Werte repräsentieren Mittelwerte aus zwei Experimenten. Durch Rundungen kann die Summe der Produktanteile in manchen Fällen nicht 100% ergeben.

	0,5 h	2 h	5 h	20 h
Umsatz in %	7	42	66	94
Anteil an P1 in %	26	30	17	4
Anteil an P2 in %	12	8	9	4
Anteil an P3 in %	53	41	61	88
Anteil an P4 in %	10	21	14	3

3.2.5 Identifizierung des Hauptproduktes der Lupeol-Oxidation katalysiert durch die P450-BM3-Mutante V78G F87A I263G

Um mehr Informationen über die Struktur des gebildeten Hauptproduktes P3 (s. Kapitel 3.2.3) zu erlangen, musste eine ausreichende Menge dieses für nachfolgende NMR-Analysen hergestellt und isoliert werden. In einem vergrößerten Maßstab (20 x 100 mL) wurden 25,6 mg Lupeol als Substrat eingesetzt. Das Hauptprodukt P3 wurde mittels eines semipräparativen HPLC-Ansatzes über eine Normalphasen-Säule aus dem Reaktionsansatz isoliert. Dabei wurden 7,6 mg P3 mit einer Reinheit von 96% (GC/MS; HPLC) gewonnen. Die Substanz wurde anschließend in CD₃OD gelöst und in 1D- und 2D-NMR-Experimenten (¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H-¹³C-HSQC, ¹H-¹³C-HMBC, DEPT-135, ¹H-¹H-COSY, ¹H-¹H-NOESY, s. Anhang, Kapitel 6.2) eingesetzt. Insgesamt ließen sich mittels ¹H-NMR sechs Methylgruppen mit Verschiebungen von δ 0,83; 0,85; 0,99; 1,09; 1,37 und 1,69 ppm detektieren. Im Spektrum konnten die zwei olefinischen H-29 Protonen mit chemischen Verschiebungen von δ 4,70 und 4,57 ppm detektiert werden. Das Wasserstoffatom H-3 wurde mit einer chemischen Verschiebung von δ 3,11 ppm und das H-19 Wasserstoffatom mit einer chemischen Verschiebung von δ 2,42 ppm detektiert. Das ¹³C-NMR-Spektrum des P3 zeigte ein Signal mit einer Verschiebung von δ 181,28 ppm, was charakteristisch für eine Carboxylsäure ist. Mit Hilfe von DEPT-135, ¹H-¹³C-HSQC, ¹H-¹³C-HMBC und ¹H-¹H-COSY NMR-Analysen wurden die Kohlenstoffe und Wasserstoffe soweit wie möglich zugeordnet (s. Anhang, Kapitel 6.2). Im ¹H-¹³C-HMBC-Spektrum wurde ermittelt, dass das Kohlenstoffatom mit der chemischen Verschiebung von 181,28 ppm Korrelationen mit den Protonen mit den chemischen Verschiebungen von δ 3,11; 1,37 und 0,89 ppm zeigte, die den Protonen H-3; H-23 und H-5 zuzuordnen sind. Korrelationen des H-3 mit den C-Atomen mit den Verschiebungen δ 181,28 ppm (C-24) und 24,61 ppm (C-23) konnten beobachtet werden. Die Stereochemie an den Positionen 23 und 24 wurde mittels des ¹H-¹H-NOESY

Experimentes aufgeklärt (s. Abbildung 38A). Dabei wurden Korrelationen zwischen der Methylgruppe $^1\text{H} \delta$ 1,37 (H-23) und den Protonen H-3 und H-5 detektiert. Die Carboxylgruppe scheint also an Position 24 lokalisiert zu sein, das gebildete Produkt ist demnach 3β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure (s. Abbildung 38B), das ein Stereoisomer der Lupeolsäure (3α -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure) (Büchele *et al.* 2003; Culioli *et al.* 2003) ist.

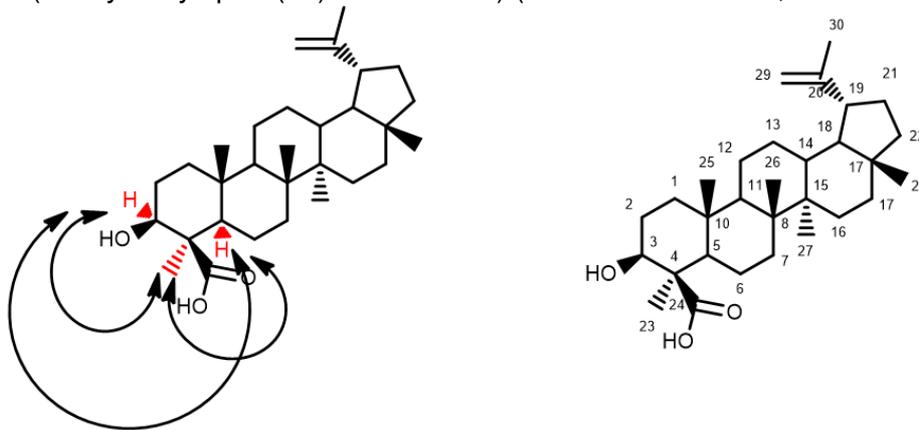


Abbildung 38. A) Wichtige ^1H - ^1H -NOESY Korrelationen zur Bestimmung der Position der Carboxylgruppe des Lupeol-Oxidationsproduktes 3β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure. B) Gezeigt ist die Struktur des gebildeten Produktes 3β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure sowie die Nummerierung der C-Atome.

Die Oxidationsroute, die demnach bei der Lupeol-Oxidation hin zur Säure erfolgen sollte, ist in Abbildung 39 dargestellt. Folglich würde die Methylgruppe an Position C-24 zunächst einfach hydroxyliert werden bevor diese weiter zur Aldehydgruppe oxidiert wird. Im letzten Schritt würde die Bildung der Säure erfolgen.

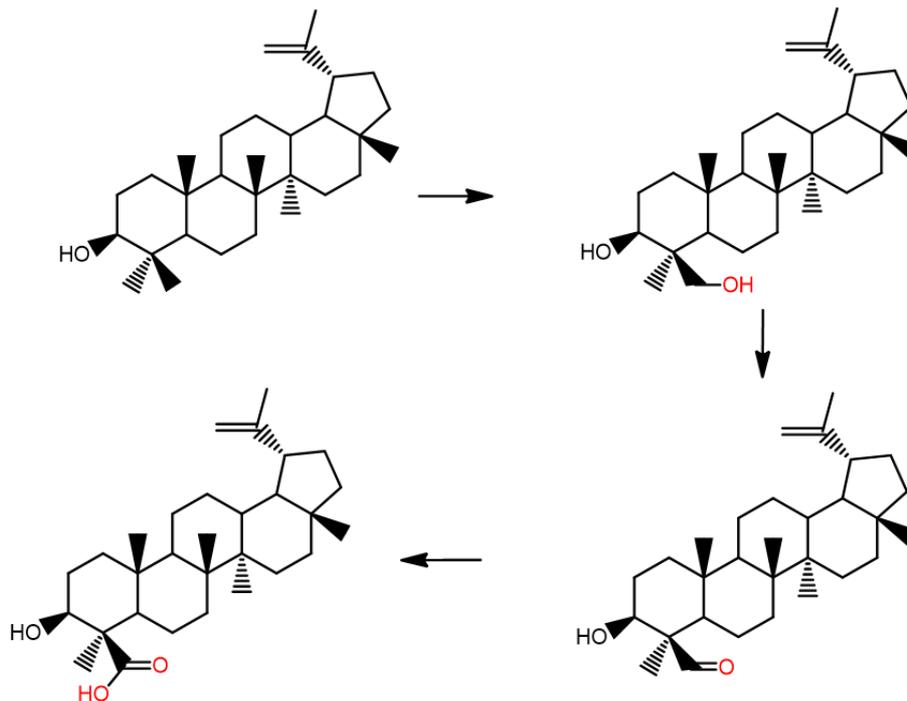


Abbildung 39. Vorgeschlagene Oxidationsroute von Lupeol durch die P450-BM3-Mutante V78G F87A I263G zur 3β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure. Die Oxidationspositionen sind in rot dargestellt.

3.2.6 Oxidation von α -Amyrin, β -Amyrin und Cycloartenol katalysiert durch die P450 BM3-Mutante V78G F87A I263G

Zur Oxidation der weiteren Triterpenoid-Substrate α -Amyrin, β -Amyrin und Cycloartenol, wurde die P450-BM3-Dreifachmutante V78G F87A I263G in *in-vitro*-Reaktionen unter optimierten Bedingungen (s. Kapitel 3.2.2) eingesetzt. Nach 20-stündiger Inkubationszeit wurden die Proben extrahiert, derivatisiert und mittels GC/MS analysiert (s. Abbildung 40).

α -, β -Amyrin und Cycloartenol wurden zu 85%, 59% und 73% umgesetzt. Bei diesen drei Substraten konnte ein geringerer Umsatz im Vergleich zum Substrat Lupeol detektiert werden, das nahezu vollständig umgesetzt werden konnte. Insgesamt wurden in allen Fällen einige Produktpeaks detektiert.

Bei der Oxidation von α -Amyrin zeigten Produkt 1 und 2 einen ähnlich prozentualen Produktanteil von ungefähr 40%. Produkt 1 wies ein Molekülion mit m/z von 586 auf, was auf eine einfache Hydroxylierung schließen lässt. Eine Epoxidierung anstelle einer Hydroxylierung ist an dieser Stelle nicht anzunehmen, da ein Epoxid nicht silyliert würde. Das Spektrum des Produktpeaks 2 wies ein Molekülion mit m/z von 600 auf. Dies ließe auf eine Säuregruppe oder eine Hydroxylierung und zusätzliche Bildung eines Ketons/Aldehyds schließen.

Für β -Amyrin wurde ein Hauptproduktpeak (P1) mit einem Anteil von knapp 80% detektiert, das zugehörige Massenspektrum lässt wiederum auf eine einfache Hydroxylierung schließen.

Was die Oxidation von Cycloartenol betrifft, lässt sich sagen, dass der Produktpeak 2 mit 60% den höchsten relativen Anteil aufweist. Das Spektrum des Peaks lässt ebenfalls auf eine einfache Hydroxylierung von Cycloartenol schließen, da das Molekülion ein Masse/Ladungsverhältnis m/z von 586 aufweist.

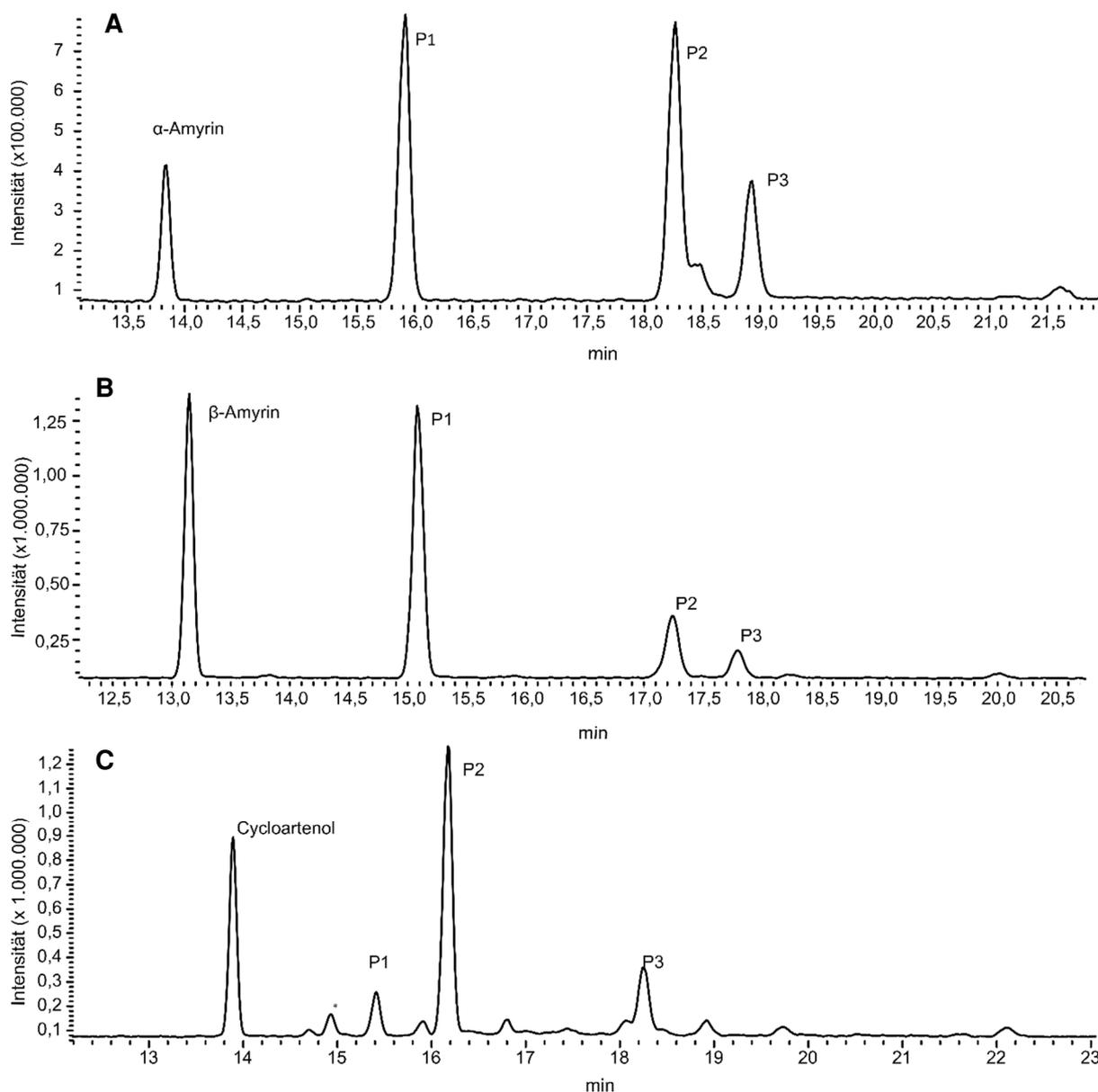


Abbildung 40. GC/MS Chromatogramme der Umsetzungen von A) α -Amyrin, B) β -Amyrin und C) Cycloartenol katalysiert durch die P450-BM3-Dreifachmutante V78G F87A I263G. In Chromatogramm A) ist eine Überlagerung des P2 durch einen anderen nicht-identifizierten Produktpeak zu sehen. In Chromatogramm C) kennzeichnet * einen unspezifischen Peak in C) (wurde auch in der Negativkontrolle detektiert).

Die P450-BM3-Dreifachmutante V78G F87A I263G Variante ließ sich also auch erfolgreich für die Umsetzung der pentazyklischen Triterpenoide α - und β -Amyrin sowie des tetrazyklischen Cycloartenols einsetzen.

4 Diskussion

Cytochrom-P450-Monooxygenasen sind in allen Lebensdomänen zu finden und katalysieren höchst selektiv ein großes Spektrum an Reaktionen. Die in dieser Arbeit adressierten Substrate, gehören der Gruppe der pflanzlichen Triterpenoide an. Diese sind interessante Sekundärmetabolite, die in einer beachtlichen Vielzahl und Diversität in der Natur vorkommen. Von zahlreichen Triterpenoiden ist bekannt, dass sie verschiedenste biologische Aktivitäten aufweisen (s. Kapitel 1.1.2).

In dieser Arbeit war die Oxidation von pflanzlichen Triterpenoiden, sowohl mittels pflanzlicher Cytochrom-P450-Monooxygenasen als auch mittels Mutanten einer bakteriellen Cytochrom-P450-Monooxygenase, von Interesse. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die Evaluation und Charakterisierung pflanzlicher P450-Enzyme, deren Gene im Marnerol-Gencluster in *A. thaliana* lokalisiert sind. Die P450-Enzyme sollten in *E. coli* hergestellt und anschließend charakterisiert werden. Zum anderen sollten durch Einsatz von Mutanten der bakteriellen CYP102A1 (P450-BM3) aus *B. megaterium* weitere Sauerstofffunktionen in die biologisch aktiven Triterpenoide, Lupeol, α - und β -Amyrin sowie Cycloartenol, eingeführt werden. Die P450-Enzyme wurden im Rahmen dieser Arbeit im Hinblick auf die zukünftige potentielle Einbindung dieser in rekonstituierte Biosynthesewege in mikrobiellen Systemen untersucht.

4.1 Marnerol-Oxidation mittels pflanzlicher Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus *A. thaliana*

4.1.1 Heterologe Herstellung der P450-Enzyme

Die Produktion funktioneller eukaryotischer Proteine in bakteriellen Wirten kann wegen fehlender posttranslationalen Modifikationen oder durch die Verankerung in die Membran und der Unterschiede pro- und eukaryotischer Systeme die Proteine in die Membran zu leiten, mit Schwierigkeiten verknüpft sein (Yesilirmak und Sayers 2009; Zelasko *et al.* 2013). Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit Strategien zur verbesserten heterologen Expression der natürlicherweise N-terminal membrangebundenen *A. thaliana* Cytochrom-P450-Monooxygenasen in *E. coli* entwickelt werden.

E. coli als prokaryotischer Organismus besitzt im Gegensatz zu Eukaryoten keine Zellorganellen. Somit fehlt *E. coli* das endoplasmatische Retikulum, in dem pflanzliche P450-Enzyme typischerweise gebunden sind. Es gibt generell zwei Strategien zur N-terminalen Trunkierung eukaryotischer P450-Enzyme, mit dem Ziel sie funktionell in *E. coli* synthetisieren. Zum einen kann der N-Terminus dahingehend verändert werden, das Protein

in die *E. coli*-Plasmamembran zu leiten und zum anderen gibt es Möglichkeiten die Zielproteine löslich oder teilweise löslich im Cytosol herzustellen (Zelasko *et al.* 2013).

In dieser Arbeit wurden beide P450-codierenden, codon-optimierten Gene nach der Identifizierung der putativen N-terminalen Membranregionen modifiziert, um die natürliche Membranregion partiell oder gänzlich durch schon beschriebene Aminosäuresequenzen zur Verbesserung der Expression in *E. coli* zu ersetzen (Barnes *et al.* 1991; Wachenfeldt *et al.* 1997). So konnte die funktionelle Produktion der Proteine CYP71A16 und CYP705A12 im bakteriellen Organismus *E. coli* realisiert werden. In den Fällen der beiden untersuchten P450-Enzyme war die Trunkierung der gesamten vorhergesagten Membranregion und das Anfügen einer modifizierten, polaren Aminosäuresequenz der Hasen-CYP2C3 erfolgreicher als die partielle Trunkierung der Membranregion und das Anfügen einer unpolaren/hydrophoben Sequenz der bovinen CYP17A (s. Kapitel 3.1.1 und 3.1.2). Beide modifizierten Versionen konnten zudem besser hergestellt werden als die Volllängen-Proteine (CYP71A16lang und CYP705A12lang). In einer Studie von Morrone *et al.* wurden zur Synthese der CYP701A3 aus *A. thaliana* in *E. coli* neben der CYP2C3-Sequenz ebenfalls modifizierte Konstrukte mit der bovinen CYP17A-Sequenz getestet, wobei die höchste relative Aktivität mit einer codon-optimierten Variante mit CYP2C3-Sequenz erreicht wurde (Morrone *et al.* 2010). Generell führt das Anfügen der Hasen-Sequenz zu einer höheren heterologen P450-Produktion als das Anfügen der CYP17A-Sequenz (Zelasko *et al.* 2013). Die Strategie der Trunkierung und des Anfügens der CYP2C3-Sequenz konnte bereits in einer Reihe von Studien zur verbesserten Herstellung eukaryotischer Cytochrom-P450-Monooxygenasen in *E. coli* erfolgreich angewendet werden (Morrone *et al.* 2010; Sohl und Guengerich 2010; Swaminathan *et al.* 2009; Wang *et al.* 2012a; Wang *et al.* 2012b; Wu *et al.* 2011). Generell kann allerdings festgestellt werden, dass die funktionelle Herstellung, speziell pflanzlicher Cytochrom-P450-Monooxygenasen in bakteriellen Systemen, eine große Herausforderung darstellt (Chang *et al.* 2007; Chemler und Koffas 2008; Misawa 2011). Für die Herstellung tierischer und humaner P450-Enzyme in *E. coli* konnten im Vergleich dazu viele erfolgreiche Beispiele genannt werden (Zelasko *et al.* 2013).

Es gibt verschiedene *E. coli*-Stämme, die für die heterologe Genexpression verwendet werden können. Dazu wurden in dieser Arbeit drei *E. coli*-Stämme zur Expression des CYP71A16-Gens getestet (s. Abbildung 11, Abbildung 12). Der oft verwendete *E. coli*-Stamm BL21(DE3) mit dem pET-Vektor System ist dafür bekannt, hohe Mengen an Zielprotein produzieren zu können. Die BL21(DE3)-Derivate, C41(DE3) und C43(DE3) (Miroux und Walker 1996) weisen unter anderem Mutationen im *lacUV5*-Promotor auf, der zur Expression des chromosomal codierten T7-Polymerase-Gens dient, die benötigt wird, um

das Zielgen vom pET-Vektor abzulesen. Das Resultat der Mutationen ist eine langsamere Synthese des Zielproteins (Wagner *et al.* 2008). Obwohl der oft verwendete *E. coli*-Stamm BL21(DE3) viel Zielprotein akkumulierte, war dies großteils in nicht funktioneller Form vorhanden. Es kann vermutet werden, dass zuviel Protein auf einmal produziert wurde und dabei möglicherweise als fehlgefaltete Proteinaggregate, sogenannten *inclusion bodies*, vorlag. In dieser Arbeit konnten mit dem *E. coli*-Stamm C43(DE3), nach einer Expressionsdauer von 96 h, Zielproteintiter mit 52 mg CYP71A16rab/L (entspricht 950 nmol CYP71A16rab/L) und knapp 33 mg CYP705A12rab/L (entspricht 600 nmol CYP705A12rab/L) erzielt werden (s. Abbildung 14, Abbildung 17). Diese Werte liegen in einem, für pflanzliche Cytochrom-P450-Monooxygenasen, hohen Bereich im Vergleich zu Literaturwerten. So konnte beispielsweise eine modifizierte Version von CYP90B1 aus *A. thaliana* mit 350 nmol P450/L rekombinant in *E. coli* hergestellt werden (Fujita *et al.* 2006), während eine Obtusifoliol-14-Demethylase aus *Sorghum bicolor* (L.) mit 200-400 nmol P450/L in *E. coli* produziert wurde (Bak *et al.* 1997). Hohe Titer für heterolog in *E. coli* hergestellte Säuger-P450 konnten mit einer modifizierten CYP2B1 aus der Ratte mit 800-1000 nmol P450/L (Scott *et al.* 2001), mit einer modifizierten Hasen CYP4B1 von 660 nmol P450/L (Cheesman *et al.* 2003) oder aber mit einer humanen CYP46A1-Variante mit 650 nmol P450/L (Mast *et al.* 2004) erreicht werden. Insgesamt lässt sich sagen, dass sich eine Vielzahl von eukaryotischen P450-Enzymen funktionell in *E. coli* herstellen lässt. Obwohl *S. cerevisiae* oft zur Produktion pflanzlicher Cytochrom-P450-Monooxygenasen verwendet wird, sind die erreichten Proteinmengen jedoch oft geringer als in *E. coli*, was die Proteincharakterisierung erschwert. Zur Produktion pflanzlicher P450-Enzyme in *E. coli* kann keine universelle Strategie der Modifikation aufgestellt werden, die zur erfolgreichen Herstellung eukaryotischer Cytochrom-P450-Monooxygenasen in *E. coli* führt. Allerdings kristallisierten sich hauptsächlich zwei Trunkierungsstrategien heraus, die oftmals, wie auch in dieser Arbeit beobachtet, zur erfolgreichen funktionellen Expression führen. Welche Strategie jedoch im Einzelfall besser funktioniert, muss individuell getestet und erarbeitet werden.

4.1.2 Heterologe Herstellung und Vergleich von ATR2 aus *A. thaliana* Ler-0 und Col-0

Fast alle pflanzlichen Cytochrom-P450-Monooxygenasen interagieren mit ebenfalls membrangebundenen Cytochrom-P450-Reduktasen (CPR), die für die Katalyse notwendig sind. Das Genom von *A. thaliana* beinhaltet neben zwei CPRs, ATR1 und ATR2, eine putative CPR, ATR3 (Urban *et al.* 1997; Varadarajan *et al.* 2010). In einer vorangegangenen Arbeit, wurden ATR1 und ATR2 aus *A. thaliana* Col-0 bereits in trunkierter Form in *E. coli* hergestellt und verglichen (Schückel *et al.* 2012). Dabei konnte mit Cytochrom *c* als

Elektronenakzeptor ein niedrigerer K_M Wert für ATR2 (16 μM) als für ATR1 (23 μM) detektiert werden (Schückel *et al.* 2012). Die katalytische Konstante für ATR2 lag bei 5 s^{-1} , während die für ATR1 um den Faktor 50 niedriger war (Schückel *et al.* 2012). Aus diesem Grund und vor dem Hintergrund, dass ATR2 schon in rekombinanter *S. cerevisiae* als Redoxpartner für CYP71A16 verwendet wurde (Castillo *et al.* 2013), war es naheliegend in der hier vorliegenden Arbeit ATR2 als Redoxpartner für CYP71A16 und CYP705A12 *in vitro* zu testen. Des Weiteren konnte ATR2 bereits für einige pflanzliche P450-Enzyme erfolgreich als Redoxpartner eingesetzt werden (Haudenschild *et al.* 2000; Miki und Asano 2014; Mizutani und Ohta 1998; Schückel *et al.* 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ATR2 aus zwei *A. thaliana* Ökotypen - L-ATR2 aus Landsberg *erecta* (Urban *et al.* 1997) und C-ATR2 aus Columbia (Mizutani und Ohta 1998) in *E. coli* heterolog hergestellt und verglichen (s. Abbildung 21). Dazu wurden die ATR2-Proteine in trunkierter Form, ähnlich wie bereits beschrieben, hergestellt (Schückel *et al.* 2012) und anschließend in Aktivitätsassays mit dem externen Elektronenakzeptor Cytochrom *c* evaluiert. Dass nur bei der C-ATR2, im Vergleich zur Negativkontrolle, eine Aktivität im Cytochrom *c* Assay detektiert werden konnte, obwohl die *codon usage* mit einer für *S. cerevisiae* optimierten Gensequenz nicht optimal war, erstaunte zunächst. Zwischen den beiden Proteinen liegen auf Aminosäureebene lediglich 11 Unterschiede vor (s. Abbildung 20). Die Struktur der ATR2 aus *A. thaliana* Col-0 wurde kürzlich publiziert (Niu *et al.* 2017). Unterschiede zwischen einigen Aminosäuren zwischen den zwei Ökotypen sind in der FAD-Bindedomäne lokalisiert. In der Literatur wurde des Weiteren bereits von Castillo und Kollegen diskutiert, dass mehrere Gensequenzen für ATR2 veröffentlicht wurden und demzufolge die publizierte Sequenz für ATR2 aus Landsberg *erecta*, aufgrund der im Jahre 1992 bestehenden manuellen Splicing-Technologien, inkorrekt sein könnte (Castillo *et al.* 2013). Diese Vermutung wird durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse unterstützt. Um jedoch eindeutig zu verifizieren, ob eine nicht korrekte Sequenz für die ATR2 aus Landsberg *erecta* publiziert wurde, müsste die entsprechende cDNA aus *A. thaliana* Ler resequenziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die C-ATR2 weiter gereinigt werden und im Anschluss daran die spezifischen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{453} = 13,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\epsilon_{381} = 12,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ermittelt werden (s. Abbildung 23). Das aufgenommene Absorptionsspektrum mit den beiden Absorptionsmaxima um 450 und 380 nm sowie einer „Schulter“ bei 485 nm ist charakteristisch für Diflavinreduktasen, wie beispielsweise ebenfalls mit der CPR aus *Candida apicola* (Girhard *et al.* 2013) oder der BmCPR aus *B. megaterium* (Milhim *et al.* 2016) gezeigt wurde.

4.1.3 Charakterisierung von CYP71A16

4.1.3.1 Vergleich von Redoxpartnersystemen für CYP71A16

Die pflanzliche Cytochrom-P450-Reduktase ATR2 wurde neben dem bakteriellen Redoxpartnersystem, bestehend aus YkuN aus *B. subtilis* und der Flavodoxin-Reduktase Fpr aus *E. coli*, in Reaktionen mit CYP71A16 getestet. YkuN ist ein FMN-haltiges Flavodoxin und Fpr eine FAD-haltige Reduktase, was bedeutet, dass diese Redoxpartner zusammen die gleichen Kofaktoren aufweisen wie die CPR ATR2. Die bakteriellen Redoxpartner sind aufgrund ihrer einfachen heterologen Herstellung in löslicher Form und ihrer hohen Aktivität als alternative Redoxpartner für pflanzliche Cytochrom-P450-Monooxygenasen von Interesse. YkuN und Fpr wurden dabei in dieser Arbeit als freie Enzyme und als artifizielle Diflavinreduktase YkuN-Fpr (Bakkes *et al.* 2017) verwendet. Das Fusionskonstrukt YkuN-Fpr sollte im Vergleich zu den freien Redoxpartnerenzymen die Komplexität verringern und die Effizienz des Elektronentransfers erhöhen (Bakkes *et al.* 2017). Das bakterielle Redoxpartnersystem bestehend aus den freien Enzymen YkuN und Fpr wurde bereits in Umsetzungen mit einigen P450-Enzymen verschiedener Organismen angewendet. So konnten die Proteine beispielsweise erfolgreich als Elektronentransfersystem in *in-vitro*-Reaktionen mit CYP154E1 aus *Thermobifida fusca* YX und CYP154A8 aus *Nocardia farcinica* IFM 10152 genutzt werden (von Bühler *et al.* 2013). Auch die CYP109B1 aus *B. subtilis* war mit Hilfe des Elektronenpartnersystems YkuN/Fpr in der Lage das Substrat Myristinsäure umzusetzen (Girhard *et al.* 2010). Die kürzlich publizierte artifizielle Diflavinreduktase YkuN-Fpr konnte ebenfalls mit bakteriellen und Säuger- Cytochrom-P450-Monooxygenasen erfolgreich verwendet werden (Bakkes *et al.* 2017). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch pflanzliche P450 mit nicht-physiologischen Redoxpartnern bakterieller Herkunft interagieren und dadurch höhere Substratumsätze verursachen als mit Redoxpartnern aus dem gleichen Organismus.

Der Umsatz von Marnerol in Gegenwart von CYP71A16 mit dem *A. thaliana* Redoxpartner ATR2 war mit weniger als 10 % nach 20 h Reaktionszeit vergleichsweise gering. Mit dem bakteriellen Redoxpartnersystem sowohl als Fusion als auch in Form von freien Enzymen konnte ein mit über ~45% bzw. ~60% höherer Umsatz von Marnerol zu 23-Hydroxymarnerol erzielt werden (s. Abbildung 26). Der Umsatz konnte demnach bei der Verwendung von freien Enzymen bzw. artifizieller Diflavinreduktase, in Form von fusionierten Redoxpartnerproteinen, um einen Faktor von ~6 bzw. ~4,5, im Vergleich zur Nutzung der ATR2, gesteigert werden. Ob ATR2 der physiologische Redoxpartner in *A. thaliana* ist, konnte mittels dieser Arbeit nicht festgestellt werden, da z.B. auch ATR1 als ein natürlicher Redoxpartner in Frage kommt. Es ist auch nicht auszuschließen, dass beide ATRs mit der

Cytochrom-P450-Monooxygenase interagieren. Während ATR1 ein N-terminales Motiv zur Verankerung im endoplasmatischen Retikulum aufweist, sind bei ATR2 zwei Start-Methionine zu finden. Nach dem ersten Start-Methionin findet sich eine Serin/Threoninreiche Sequenz, die auf die Verankerung in der Chloroplastenmembran hinweist, während auf das zweite Start-Methionin eine Sequenz folgt, die auf eine Verankerung im endoplasmatischen Retikulum schließen lässt (Urban *et al.* 1997). Der geringere Umsatz der Reaktion mit CYP71A16 und dem Redoxpartner ATR2 im Vergleich zum Einsatz der getesteten bakteriellen Redoxpartnersysteme, könnte auf die Reaktionsumgebung *in vitro* sowie den Fakt, dass beide Proteine, sowohl P450 als auch CPR, in N-terminal trunkierter Form vorlagen, zurückzuführen sein. Dies ließe auch die niedrige Kopplungseffizienz des Systems erklären. Beide Proteine könnten außerdem in natürlicher Umgebung von der Lipidumgebung beeinflusst werden (Imaoka *et al.* 1992), dabei ist auch erwähnenswert, dass Triton X-100 in der Reaktion präsent war (s. Kapitel 4.1.3.2). Ein Grund für die höheren Umsätze unter Kofaktorregenerierungsbedingungen mit den bakteriellen Redoxpartnersystemen im Vergleich zur ATR2, können die höheren gemessenen NADPH-Oxidationsraten darstellen. Darüber hinaus muss der natürliche Kontext der verwendeten Redoxpartner-Enzyme betrachtet werden. Während die beiden verwendeten bakteriellen Redoxpartner unter physiologischen Bedingungen im Primärmetabolismus eine Rolle spielen (Fujii und Huennekens 1974; Lawson *et al.* 2004; McIver *et al.* 1998; Sanyal *et al.* 1994), ist ATR2 natürlicherweise im Sekundärmetabolismus zu finden (Mizutani und Ohta 1998), der in den meisten Fällen nicht auf eine hohe Produktivität ausgelegt ist. Außerdem hat das molare Verhältnis von Redoxpartnern einen starken Einfluss auch die Kopplungseffizienz: je höher die Konzentration von ATR2 im Vergleich zur Cytochrom-P450-Monooxygenase, desto niedriger ist die Kopplungseffizienz. In vielen Fällen wird dies jedoch als Kompromiss in Kauf genommen, um einen höheren Substratumsatz zu erreichen. Die durch die Entkopplung „verlorenen“ Redoxäquivalente wurden durch Kofaktorrecycling regeneriert.

4.1.3.2 Einfluss des nichtionischen Detergenz Triton X-100 auf die Reaktion und Identifikation von 23-Hydroxymarnerol

Zunächst wurde die Aktivität der rekombinant in *E. coli* hergestellten und gereinigten CYP71A16 *in vitro* getestet. Dazu wurde Marnerol als Substrat verwendet. Interessanterweise konnte lediglich ein Produktpeak mittels GC/MS-Analysen detektiert werden, wenn das nichtionische Detergenz Triton X-100 in der Reaktion anwesend war (s. Abbildung 28). Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass Detergenzien gewissermaßen Ähnlichkeiten zu Biomembranen aufweisen (Seddon *et al.* 2004) und CYP71A16 auf die Anwesenheit einer solchen Lipidumgebung angewiesen ist, wie schon in

einer Studie mit eukaryotischen Cytochrom-P450-Monooxygenasen in rekonstituierten Systemen mit Phospholipiden gezeigt werden konnte (Imaoka *et al.* 1992). So wurde in einer Studie zur Optimierung eines *in-vivo*-Biosyntheseweges zur Herstellung oxidierter Taxol-Vorstufen in *E. coli*, beobachtet, dass membrangebundene, mit einem nicht-polaren N-terminus versehene, pflanzliche CPR und P450 effizienter waren als vermutlich lösliche, mit einem polaren N-terminus versehene Varianten (Biggs *et al.* 2016). Eine andere Erklärung könnte die geringe Löslichkeit von Marnerol sein, das nur in Gegenwart eines Lösungsvermittlers in der wässrigen Reaktionsumgebung in Lösung geht. Marnerol enthält lediglich eine Hydroxylgruppe und weist eine lipidähnliche Struktur auf, weshalb das Molekül, ähnlich wie die meisten Terpene/Terpenoide, wasserunlöslich ist.

Der mittels GC/MS-Analysen beobachtete Produktpeak wurde aufgrund des charakteristischen MS-Fragmentierungsmusters 23-Hydroxymarnerol zugeordnet, (s. Abbildung 27) das bereits als Produkt der Oxidation von Marnerol durch CYP71A16 in einem *in-vivo*-System in *S. cerevisiae* beschrieben wurde (Castillo *et al.* 2013). Die Produktbildung entsprach also den Erwartungen und konnte in *in-vitro*-Analysen im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

4.1.3.3 *In-vitro*-Reaktionsoptimierung, -verlauf und Bestimmung kinetischer Konstanten

Nach der Identifikation eines geeigneten Redoxpartnersystems für die *in-vitro*-Reaktionen mit CYP71A16, wurden die Reaktionsbedingungen hinsichtlich der Schüttelbedingungen optimiert. Dabei stellte sich eine Inkubation im Thermoschüttler im Vergleich mit der Inkubation ohne Schütteln oder Über-Kopf-Schütteln als am besten bezüglich des Umsatzes heraus (s. Kapitel 3.1.8). Es kann angenommen werden, dass im Falle der Anwendung des Thermoschüttlers, die Kombination aus dem erhöhten Sauerstoffeintrag und der guten Durchmischung der Komponenten der entscheidende Faktor für den besseren Umsatz war. Im Falle des Über-Kopf-Schüttelns kann vermutet werden, dass durch das insgesamt geringere Schütteln im Vergleich zur Verwendung des Thermoschüttlers, es nur geringfügig zur Ausbildung einer Interphase kam, sodass die Interaktion des hydrophoben Substrates mit der Cytochrom-P450-Monooxygenase eingeschränkt war. Auffällig war, dass bei optimierten Reaktionsbedingungen in Gegenwart von 2 μ M CYP71A16 neben dem erwarteten Hauptprodukt 23-Hydroxymarnerol, ein zweites Produkt deutlich mit der Zeit weiter zunahm (s. Tabelle 19, s. Anhang, Abbildung 42). Dies könnte dem im Massenspektrum detektierten Molekülion zufolge ein Überoxidationsprodukt des gebildeten 23-Hydroxymarnerols sein. Das vermutlich gebildete Aldehyd ist demnach an der C-3 oder C-23 Position lokalisiert. Würde die Oxidation an Position C-3 stattfinden, würde das schon beschriebene 23-Hydroxymarneral entstehen, während nach Oxidation an Position C-23 ein

neues Produkt entstünde. Wahrscheinlich ist jedoch die Weiteroxidation an Position C-23 und somit die Bildung eines neuen Produktes. Die Bildung eines solchen Überoxidationsproduktes mit einem so hohen Produktanteil wurde bislang noch nicht beschrieben. Dass sich dieses in der *in-vitro*-Reaktion bildete, kann an den optimierten Reaktionsbedingungen und nicht-physiologischen Redoxpartnern liegen. Im Vergleich zu 2 μM CYP71A16 konnte in Gegenwart von nur 1 μM CYP71A16 kein Überoxidationsprodukt detektiert werden. Überoxidationsprodukte können entstehen, wenn Elektronen zu schnell auf die Cytochrom-P450-Monooxygenase übertragen werden. Dies kann beispielsweise bei der Verwendung nicht-physiologischer Redoxpartner auftreten. 2018 wurden in einer Studie mit der bakteriellen CYP106A2 verschiedene Redoxpartnersysteme getestet, wobei beobachtet wurde, dass sich die Produktverteilung der Oxidation von Progesteron bei der Verwendung verschiedener Redoxpartnersysteme unterschied. Dabei gab es Redoxpartner:CYP106A2-Kombinationen, bei denen mehr monohydroxylierte Produkte detektiert wurden, als auch Kombinationen, bei denen höhere Mengen an polyhydroxylierten Produkten festgestellt werden konnten (Sagadin *et al.* 2018). Der Überoxidation kann beispielsweise durch Erniedrigung der Reaktionsrate durch eine Reduktion der Sauerstoffkonzentration entgegen gewirkt werden (van Beilen *et al.* 2003; Schneider *et al.* 1999). Bei der Oxidation des Sesquiterpens (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton ist die Weiteroxidation des Alkohol-Zwischenproduktes (+)-Nootkatol zu (+)-Nootkaton gewünscht (Sowden *et al.* 2005).

Bei der Evaluation kinetischer Konstanten von CYP71A16 mit dem bakteriellen Redoxpartnersystem konnte eine Michaelis-Konstante K_M von 142,1 μM und eine katalytische Konstante k_{cat} von 3,9 min^{-1} detektiert werden (s. Abbildung 30). Bislang sind noch nicht viele Arbeiten veröffentlicht worden, die sich mit der Bestimmung kinetischer Parameter von pflanzlichen Cytochrom-P450-Monooxygenasen für die Triterpenoid-Oxidation befassen. Eines der wenigen Beispiele ist die in die Oxidation der Phytosterole Campesterol und Campestanol involvierte CYP90B1, deren Michaelis-Konstante K_M bei 0,35-3 μM lag, während die katalytische Konstante k_{cat} 5,2 und 0,016 min^{-1} betrug (Fujita *et al.* 2006). Damit liegt der in dieser Arbeit ermittelte k_{cat} -Wert für CYP71A16 in dem gleichen Bereich, wie für CYP90B1. Der K_M -Wert jedoch ist in der vorliegenden Arbeit um eine Zehnerpotenz höher als die publizierten Werte für CYP90B1; jedoch sind die Werte nur begrenzt miteinander vergleichbar, da im Falle der CYP90B1 eine CPR aus *A. thaliana* verwendet wurde. In einer Studie von Halkier *et al.* wurde für P450_{TYR} aus *Sorghum bicolor* ein K_M -Wert für die Umsetzung von Tyrosin von 0,22 mM ermittelt, hohe k_{cat} -Wert von 49 min^{-1} /350 min^{-1} konnten detektiert werden (Verwendung von isolierter rekombinanter P450/Verwendung rekombinanter P450-enthaltender *E. coli* Membranen) (Halkier *et al.*

1995). Der K_M -Wert, der zuvor erwähnten Studie, ist also in einem ähnlichen Bereich wie der in dieser Arbeit ermittelte Wert für CYP71A16, die k_{cat} -Werte sind allerdings in der Literatur weitaus höher. Allerdings zeigt die Arbeit von Halkier *et al.*, dass der k_{cat} -Wert stark variiert, je nachdem in welcher Form das rekombinante Enzym vorlag (Halkier *et al.* 1995).

4.1.3.4 Substratbindestudien

Es wird angenommen, dass Cytochrom-P450-Enzyme aus pflanzlichen biosynthetischen Wegen hoch substratspezifisch sind, d.h. nur ein Substrat akzeptieren. Allerdings wird diese Annahme oft nicht durch Experimente bestätigt. Durch die hohen erzielten Titer an CYP71A16, mit anschließender Aufreinigung zur Homogenität, wurde die Möglichkeit gegeben, dies zu prüfen. In Substratbindestudien sollte einerseits die Dissoziationskonstante der Bindung des natürlichen Substrats Marnerol durch CYP71A16 bestimmt und andererseits weitere mögliche Substrate identifiziert werden. Durch die Bindung eines echten Substrates in der Nähe der Häm-Gruppe wird der axiale Wasserligand verdrängt, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 420 nm auf ~390 nm, einer sogenannte Typ I-Verschiebung führt (Schenkman *et al.* 1981). Die Nutzung dieser Methode zur Substratidentifizierung sollte jedoch nur als Hinweis dienen, da nicht alle Substanzen, die von den P450-Enzymen gebunden werden, auch tatsächliche Substrate sind und umgesetzt werden können. So zeigte beispielsweise CYP109B1 aus *Sorangium cellulosum* eine Bindung von Indol, jedoch konnte in Reaktionen kein Umsatz detektiert werden (Girhard *et al.* 2010). Ebenso kann es vorkommen, dass Substrate keine Typ I-Verschiebung induzieren, obwohl sie umgesetzt werden. So konnte mit der CYP109B1 aus *S. cellulosum* keine typische Typ I-Verschiebung mit den Substraten Testosteron und (+)-Valencen nachgewiesen werden, obwohl diese nachweislich Substrate für die Cytochrom-P450-Monooxygenase sind (Girhard *et al.* 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich in Substratbindestudien mit verschiedenen Substraten lediglich eine Bindung des natürlichen Substrats Marnerol (s. Abbildung 31). Eine Dissoziationskonstante von 225 μM konnte ermittelt werden. Die Dissoziationskonstante liegt in einem vergleichsweise hohen Bereich im Vergleich zu bekannten K_D -Werten pflanzlicher Cytochrom-P450-Monooxygenasen mit ihren natürlichen Substraten. Verschiedene rekombinante Varianten von CYP73A1 aus *Helianthus tuberosus* weisen K_D -Werte $<10 \mu\text{M}$ für das natürliche Substrat Zimtsäure auf (Schoch *et al.* 2003). Für CYP707A3 aus *A. thaliana* konnte eine Dissoziationskonstante von 2,7 μM für (+)-Abscisinsäure ermittelt werden (Saito *et al.* 2004). Keines der anderen Triterpenoide oder die Diterpenoide wiesen eine Bindung zu CYP71A16 auf, was auf ein eher enges Substratspektrum schließen lässt. Wie oben erwähnt, ist das für ein pflanzliches P450-Enzym, das im Sekundärmetabolismus eine Rolle spielt, zu erwarten. Um dies

genauer zu untersuchen, müssten weitere strukturell Marnerol-ähnliche Substrate getestet werden. Darüber hinaus müsste in zukünftigen Arbeiten evaluiert werden, ob die getesteten Substanzen von CYP71A16 umgesetzt werden.

4.1.4 Evaluierung von CYP705A12

4.1.4.1 *In-vitro*-Reaktionen

Die ebenfalls in dem Rahmen der Arbeit untersuchte CYP705A12 wurde als gereinigtes Protein in *in-vitro*-Umsetzungen eingesetzt, um Hinweise auf die Rolle der Cytochrom-P450-Monooxygenase in der Marnerol-Modifikation zu erlangen. Es konnte kein weiteres Produkt mittels GC/MS-Analyse detektiert werden, wenn aus der CYP71A16-Reaktion hervorgegangenes 23-Hydroxymarnerol eingesetzt wurde. Demnach konnte keine Involvierung der CYP705A12 in den Marnerol-Metabolismus gezeigt werden.

Ein Grund dafür könnte sein, dass keines der getesteten Redoxpartnersysteme geeignet war, um Elektronen auf die CYP705A12 zu übertragen. Weitere mögliche Gründe könnten die *in-vitro*-Bedingungen sein, die möglicherweise zu weit von den physiologischen Bedingungen abweichen. Auch die Trunkierung des P450-Enzyms könnte einen negativen Einfluss auf die Stabilität und Funktionalität der CYP705A12 gehabt haben. Da dies nur spekulativ angenommen werden kann, müssten weitere Experimente durchgeführt werden. Zur weiteren Evaluierung der natürlichen Rolle von CYP705A12, könnten zukünftig *in-vivo*-Versuche, beispielsweise in rekombinanten *S. cerevisiae*-Stämmen, durchgeführt werden.

Das Gen, das für die CYP705A12 codiert, liegt geclustert mit dem CYP71A16-codierenden Gen und des der Marneral-Synthase vor (Field *et al.* 2011). Darüber hinaus wird *CYP705A12* mit *CYP71A16* und *MRN1* in *A. thaliana* coexprimiert (Field *et al.* 2011). Es gibt bislang einige bekannte Sekundärmetabolit-Gencluster in Pflanzen (Chu *et al.* 2011; Nützmänn und Osbourn 2014). Allerdings können die Gene, die für einen Biosyntheseweg codieren, auch verstreut über das Genom vorliegen, was für Eukaryoten üblich ist. Möglich wäre also auch, dass neben der CYP705A12 ein weiteres/mehrere Enzyme in den Marneral-Metabolismus involviert sind, sodass das natürliche Substrat für CYP705A12 nicht 23-Hydroxymarneral/marnerol, sondern ein weiter modifiziertes Marneral/Marnerol-Metabolit ist und weitere Gene für Marneral/Marnerol-Derivat modifizierende Enzyme nicht geclustert vorliegen.

4.1.4.2 Substratbindestudien

Bei der Aufnahme der Bindespektren mit CYP705A12 zeigte sich eine feste Bindung des Diterpenoids Agatholal an CYP705A12 (s. Abbildung 32). Das Diterpenoid weist einige strukturelle Ähnlichkeiten zu 23-Hydroxymarneral auf. Zum einen enthält Agatholal zwei

Sauerstoffgruppen, ist ein Bizyklus, während Hydroxymarneral ein Monozyklus mit einem A-Seco-Ring ist. Außerdem weisen beide Moleküle eine Kohlenwasserstoffseitenkette, allerdings unterschiedlicher Länge, auf. Durch die Bindung des Diterpenoids kann eine Beteiligung der CYP705A12 am Marneral/Marnerol-Metabolismus vermutet werden, allerdings scheint dies nur ein schwacher Hinweis zu sein. Aufgrund des nicht-vorhandenen gereinigten 23-Hydroxymarnerols konnten keine Bindestudien mit diesem möglichen Substrat für CYP705A12 durchgeführt werden. Die Messung von Bindespektren mit 23-Hydroxymarnerol würde jedoch weitere Hinweise auf die Beteiligung der CYP705A12 am Marnerol-Metabolismus liefern. Zu diesem Zweck müsste zukünftig der Maßstab der durch CYP71A16 katalysierten Oxidationsreaktion von Marnerol vergrößert werden, um so ausreichend 23-Hydroxymarnerol zu isolieren, um damit Bindestudien durchführen zu können. Ebenfalls wäre es möglich, anhand der Struktur der CYP705A12 oder eines geeigneten Homologiemodells, Vorhersagen mittels Docking-Studien über potentielle Substrate zu treffen.

4.1.5 Schlussfolgerung

CYP71A16 und CYP705A12 konnten erfolgreich in hohen Mengen rekombinant in *E. coli* hergestellt und anschließend gereinigt werden. CYP71A16 konnte darüber hinaus in Umsetzungen mit dem natürlichen Substrat Marnerol eingesetzt und erstmalig *in vitro* charakterisiert werden. Dabei wurden geeignete Redoxpartnersysteme identifiziert. Bei der Oxidation von Marnerol *in vitro* konnte zudem ein mögliches noch nicht beschriebenes Überoxidationsprodukt detektiert werden. Substratbindestudien haben einen Hinweis darauf geliefert, dass CYP71A16 hoch spezifisch ist und nur ein Substrat, Marnerol, bindet. Die Funktion der CYP705A12 konnte in der Arbeit nicht in *in-vitro*-Reaktionen ermittelt werden. Ein detektiertes Typ I-Bindespektrum mit einem zu Marnerol strukturell ähnlichen Diterpenoid, Agatholal, konnte einen weiteren Anhaltspunkt zur Aufklärung der Funktion der CYP705A12 liefern.

4.2 Triterpenoid-Oxidation mittels Varianten der bakteriellen Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP102A1 (P450-BM3)

Die bakterielle CYP102A1 (P450-BM3) ist eine der am besten untersuchten Monooxygenasen im Hinblick auf die Erzeugung verschiedenster Mutanten zur Oxidation nicht-physiologischer Substrate (vgl. Kapitel 1.2.5.1) (Whitehouse *et al.* 2012). Das Wildtyp-Enzym akzeptiert natürlicherweise Fettsäuren als Substrate, die es in subterminalen Positionen oxidiert (Miura und Fulco 1974). Die Handhabung der natürlichen Fusion aus P450- und Diflavin-Reduktase-Domäne sowie die Kenntnis über die Kristallstruktur von P450-BM3, ist neben der einfachen heterologen Herstellung der Cytochrom-P450-Monooxygenase ein Grund dafür, dass das Enzym gut untersucht ist und zur biokatalytischen Umsetzung verschiedenster Substrate eingesetzt wird. In dieser Studie sollte P450-BM3 für die Oxidation der ausgewählten pentazyklischen Triterpenoide Lupeol, α -Amyrin und β -Amyrin sowie des tetrazyklischen Cycloartenols etabliert und optimiert werden. Die ausgewählten pentazyklischen Triterpenoide sind als Substrate interessant, da sie eine Vielzahl biologischer Eigenschaften aufweisen (Gallo und Sarachine 2009; Vázquez *et al.* 2009). Cycloartenol ist das Vorläufermolekül der Steroide in Pflanzen. Durch die Oxidation der ausgewählten Substrate können neue, oxidierte Triterpenoid-Derivate generiert werden, die potentiellerweise neue biologische Eigenschaften aufweisen.

Zu Beginn der Arbeit waren keine literaturbekannten P450-BM3-Varianten beschrieben, die zur Oxidation pentazyklischer Triterpenoide (wie β -Amyrin oder Lupeol) eingesetzt wurden. Bekannte große Substrate, die durch P450-BM3-Varianten umgesetzt werden, umfassen beispielsweise Steroide (Kille *et al.* 2011; Lewis *et al.* 2010) und makrozyklische Diterpenoide (Le-Huu *et al.* 2015; Le-Huu *et al.* 2016). Eine bekannte bakterielle Cytochrom-P450-Monooxygenase, die in der Lage ist, das tetrazyklische Dipterocarpol, sowie die pentazyklischen Triterpenoide 11-Keto- β -Boswelliasäure und Betulin umzusetzen, ist CYP106A2 aus *B. megaterium* (Bleif *et al.* 2012; Schmitz *et al.* 2012).

In den ersten Durchmusterungsexperimenten der institutseigenen P450-BM3-Bibliothek, konnten für β -Amyrin drei für die Umsetzung bedeutende Aminosäurepositionen - namentlich Valin 78, Phenylalanin 87 und Isoleucin 263 - ermittelt werden (s. Kapitel 3.2.1.1). Diese drei Aminosäuren, welche in der ersten Sphäre des Enzyms lokalisiert sind, sich also in direkter Nähe zum Häm-Eisen befinden (Kolev *et al.* 2014), wurden systematisch mutiert. Dazu wurden die natürlichen Aminosäuren durch die kleinen Aminosäuren Alanin und Glycin getauscht, um mehr Raum im aktiven Zentrum zu schaffen. Diese Herangehensweise wurde in ähnlicher Weise bereits angewendet. So wurden in einer Arbeit von Frances Arnold und

Mitarbeitern zur Oxidation des Steroids Trimethyl-Estriol und von Alkaloiden durch P450-BM3-Mutanten, Aminosäurepositionen ausgewählt, bei denen die natürliche Aminosäuren ausschließlich gegen die kleine Aminosäure Alanin getauscht wurde (Lewis *et al.* 2010). Durch die Auswahl einer beschränkten Anzahl von Aminosäuren, die letztendlich getestet werden sollte, wurde die Variantenzahl gering gehalten.

Das P450-BM3-Wildtyp Enzym kann das Substrat Lupeol nicht umsetzen. Ursächlich hierfür ist die Aminosäure Phenylalanin an Position 87, die in das Lumen des Substrateingangskanals ragt und den Zugang zum katalytisch aktiven Häm verengt (Whitehouse *et al.* 2012), daher kann angenommen werden, dass das „sperrige“ Triterpenoid nicht in einer für die Biokatalyse zugänglichen Weise binden kann. Phenylalanin 87 ist die in diesem Enzym am häufigsten mutierte Position (Whitehouse *et al.* 2012). Da auch die P450-BM3-Mutante F87G Lupeol nicht umsetzte, wurde die P450 BM3-Variante F87A als Ausgangsmutante gewählt. In Studien zeigten F87A Mutanten bereits ein erweitertes Substrat- bzw. Produktspektrum. In einer Arbeit von Kille und Kollegen wurde P450-BM3 F87A als Ausgangsmutante für die Oxidation des Steroids Testosteron verwendet, da das Wildtyp-Enzym das Substrat nicht akzeptierte (Kille *et al.* 2011). Des Weiteren konnte die Oxidation des Sesquiterpens Valencen zu Nootkaton durch die Schaffung von mehr Raum im aktiven Zentrum von P450-BM3 durch die Mutationen F87A und I263A realisiert werden (Sowden *et al.* 2005). In einer Studie von Vottero *et al.*, wurde zusammengefasst, dass der Austausch des „sperrigen“ Phenylalanins an Position 87 gegen kleinere Aminosäuren, generell zur Erhöhung der Aktivität gegenüber nicht-Fettsäuresubstraten führte (Vottero *et al.* 2011).

Nach Mutation der Aminosäurepositionen V78 und I263, die in den ersten Durchmusterungsexperimenten aufgefallen waren, konnte für die P450-BM3-Dreifachmutante V78G F87A I263G ein Umsatz des Substrates Lupeol von 14% detektiert werden (s. Abbildung 34). Valin an Position 78 befindet sich auf der B'-Helix und ist ebenfalls eine häufig mutierte Aminosäure bei der Umsetzung nicht-physiologischer Substrate durch P450-BM3 (Kille *et al.* 2011; Le-Huu *et al.* 2015; Whitehouse *et al.* 2012). Zur Umsetzung des makrozyklischen Diterpenoids β -Cembrenol konnte unter anderem V78 als wichtige Position identifiziert werden (Le-Huu *et al.* 2015). I263 befindet sich auf der I-Helix, die Substitution an dieser Stelle durch Alanin oder Glycin führte beispielsweise zur Schaffung von mehr Raum im aktiven Zentrum für den ω -Terminus der Laurinsäure (Dietrich *et al.* 2009). Wie oben beschrieben, wurde außerdem die P450-BM3-Mutante F87A I263A zur Oxidation des Sesquiterpens Valencen eingesetzt (Sowden *et al.* 2005).

Im Anschluss wurden weitere Mutationen an Aminosäurepositionen der ersten Sphäre, 75, 260, 264 und 437, in die zuvor identifizierte Dreifachmutante, eingeführt. Die hierfür ausgewählten Aminosäuren wurden ebenfalls bereits in Studien mit P450-BM3 zur Konversion nicht-physiologischer, „sperriger“ Substrate eingesetzt (Carmichael und Wong 2001; Kille *et al.* 2011; Le-Huu *et al.* 2015). Allerdings konnten im Rahmen dieser Arbeit durch Mutation dieser Positionen keine weiteren Varianten mit erhöhter Aktivität gegenüber Lupeol gefunden werden, lediglich die Anwendung der P450-BM3-Vierfachmutante V78G F87A T260A I263G führte zu einem, zur Dreifachmutante V78G F87A I263G, vergleichbaren Lupeol-Umsatz (s. Abbildung 35), weshalb für die weiteren Versuche die Dreifachmutante verwendet wurde.

4.2.1 Reaktionsoptimierung zur Oxidation von Lupeol

Durch den Einsatz höherer P450-Konzentrationen von 6 μM im Vergleich zu 2 μM und vor allem durch den Einsatz des Lösungsvermittlers HP- β -Cyclodextrin konnte eine Steigerung des Umsatzes von Lupeol von bis zu 98% nach 20 h erreicht werden (s. Abbildung 36). Oftmals führt der Einsatz von Cyclodextrinen als Lösungsvermittler zu einem deutlich gesteigerten Umsatz von in wässrigen Lösungen beschränkt löslichen Substraten. Cyclodextrine bestehen aus α -1,4-glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten, die einen Ring bilden. Die äußere Oberfläche ist hydrophil, die innere Kavität hydrophob, sodass in Wasser schlecht lösliche Substrate, wie Triterpenoide, so mit dem Inneren der Cyclodextrine eine nicht-kovalente wasserlösliche Verbindung eingehen (Loftsson und Brewster 1996). Die mit den Cyclodextrinen komplexierten Substanzen zeichnen sich durch eine erhöhte Wasserlöslichkeit und Stabilität in der Lösung aus (Loftsson und Brewster 1996). So bewirkte die Verwendung von Methyl- β -Cyclodextrin als Lösungsvermittler in *in-vitro* Reaktionen mit CYP154E1 G239A und (*E*)-3-Hydroxystilben als Substrat im Vergleich zu Reaktionen ohne Lösungsvermittler, deutlich gesteigerte Umsätze und die Möglichkeit höhere Substratkonzentrationen (20 mM im Vergleich zu 1 mM) einsetzen zu können (Rühlmann *et al.* 2017). Cyclodextrine werden ebenfalls zur Solubilisierung von Steroiden in wässrigen Reaktionsmedien eingesetzt, wie in der Arbeit von Bracco und Kollegen in Ganzzell- und *in-vitro*-Reaktionen mit CYP154C5 gezeigt wurde (Bracco *et al.* 2013). Auch im Zusammenhang der Solubilisierung von pentazyklischen Triterpenoiden, wurde ein Cyclodextrin zu Triterpenoid-produzierenden Hefekulturen gegeben werden, um eine Steigerung der Anreicherung von Triterpenoid-Sapogeninen im Nährmedium zu erzielen (Moses *et al.* 2014).

Enzymbasierte Ansätze zur Regenerierung des teuren Nikotinamidkofaktors NADPH sind ein in der Biokatalyse weit verbreiteter Ansatz. Auch die im Rahmen dieser Arbeit getestete

GDH wurde schon erfolgreich in Studien mit P450-BM3 zur Kofaktorregenerierung eingesetzt (Le-Huu *et al.* 2015; Schulz *et al.* 2015). In der vorliegenden Studie führte der Einsatz der GDH und auch der G6P-DH allerdings zu einem schlechteren Umsatz von Lupeol im Vergleich zu Reaktionen ohne Regenerierungssystem, daher wurde auf ein Kofaktorregenerierungssystem verzichtet, und angenommen, dass der Kofaktor durch im *E. coli* Zell-Lysat enthaltende Proteine regeneriert wird. Der Grund für den niedrigeren Umsatz mit Regenerierungssystem wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass sich die Substrate oder Produkte der Regenerierungsreaktionen negativ auf die gewünschte Triterpenoid-Oxidationsreaktion auswirken. Zur zukünftigen Regenerierung des Kofaktors in der *in-vitro*-Reaktion, mit dem Ziel, die Reaktion zu beschleunigen und die Reaktion ökonomisch günstiger zu gestalten, könnten weitere Kofaktorregenerierungssysteme, wie beispielsweise Alkohol-Dehydrogenase (ADHs) getestet werden. So könnte beispielsweise eine ADH, welche einen Alkohol in dem das Substrat gelöst ist, als Substrat akzeptiert, effektiv genutzt werden. Ein solches System wurde in einer Reaktion zur Epoxidierung von linearen Alkenen durch P450-BM3-Varianten angewendet: Isopropanol wurde dabei durch eine ADH zu Aceton umgesetzt und dadurch NADPH für die P450-katalysierte Reaktion bereitgestellt (Kubo *et al.* 2006). In einer Kaskadenreaktion zur Synthese von (+)-Nootkaton aus (+)-Valencen, wurde im ersten Schritt mittels der P450-BM3-Mutante F87A A328I Nootkatol gebildet, welches in einem weiteren Schritt durch eine ADH unter Reduktion von NAD⁺ zu (+)-Nootkaton oxidiert wurde. Gleichzeitig oxidierte die ADH die Co-Solventien 2-Butanol oder 2-Pentanol, wodurch zusätzlicher reduzierter Kofaktor für die P450-Reaktion bereitgestellt werden konnte (Schulz *et al.* 2015). Ein weiteres Enzym zur Kofaktorregenerierung ist die NADPH-abhängige Format-Dehydrogenase (FDH), die Format zu CO₂ umsetzt (Seelbach *et al.* 1996; Tishkov und Popov 2006). So konnte eine FDH aus *Pseudomonas* sp. 101 verwendet werden, um NADPH aus der Reaktion von P450-BM3 zur Hydroxylierung von Cyclohexan, Oktan und Myristinsäure zu regenerieren (Maurer *et al.* 2005).

Die für den Umsatz von Lupeol im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Kopplung der P450-BM3-Dreifachmutante war mit knapp 1% sehr gering. In der Literatur sind jedoch ebenfalls Beispiele für niedrige Kopplungseffizienzen von P450-BM3-Mutanten gezeigt, wie in der Anwendung zur O-Dealkylierung von Alkoxyresorufin mit einer Kopplungseffizienz von unter 1% (Vottero *et al.* 2011). Andere Studien berichteten jedoch, dass auch für den Umsatz nicht-physiologischer Substrate unter Verwendung von P450-BM3-Mutanten, moderate Kopplungseffizienzen erreicht werden konnten, z.B. 45% im Falle der Testosteron-Oxidation durch F87A R47Y T49F V78L A82M (Kille *et al.* 2011). Mutationen verschiedenster Positionen der P450-BM3 können sich auf die Kopplungseffizienz auswirken, wie z.B. in

einer Studie zur Umsetzung von Naphtalin durch P450-BM3 und Mutanten bestimmt wurde. Während der Wildtyp eine Kopplungseffizienz von 3,9% aufwies, konnte mit der Dreifachmutante R47L Y51F A330P eine Kopplungseffizienz von 51% erreicht werden (Whitehouse *et al.* 2008). In einer Studie von 2009 konnten mit der I401P-Mutante bei Umsetzungen der Substrate (+)- α -Pinen, Propylbenzol, 3-Methylpentan und Verbenol gesteigerte Kopplungseffizienzen im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden (Whitehouse *et al.* 2009). In einer weiteren Arbeit von 2016 konnte durch Einfügen der Mutation I401P in eine P450-BM3-Dreifachmutante die Kopplungseffizienz bei der Umsetzung von *R*-(+)-Limonen von 13% auf 43% gesteigert werden (Tieves 2016).

4.2.2 Produktverteilung und Produktidentifizierung

Das Substrat Lupeol besitzt zahlreiche mögliche Positionen an denen durch P450-katalysierte Oxidationen prinzipiell stattfinden können, jedoch ist in der Literatur bisher nur für eine dieser Positionen tatsächlich eine Oxidation durch P450-Enzyme beschrieben. Dabei handelt es sich um Position C-28, für die dreischrittige Oxidationen katalysiert durch pflanzliche Cytochrom-P450-Monooxygenasen beschrieben sind, was zur Bildung von Betulinsäure (3 β -Hydroxylup-20(29)-en-28-säure) führt (Carelli 2011; Fukushima 2011; Huang 2012).

In dieser Arbeit wurde die Produktverteilung (s. Kapitel 3.2.3) nach Lupeol-Oxidation durch die aktivsten P450-BM3-Varianten evaluiert. Dabei ließen sich mittels GC/MS-Analyse vier Produkte (P1-P4) detektieren. Beim Vergleich der Zweifachmutante V78G F87A mit der durch die I263G-Mutation erweiterte Dreifachmutante fällt auf, dass bei der Zweifachmutante das Verhältnis P1:P3 zu ungefähr 1:1 betrug, während bei Einsatz der Dreifachmutante P3 das Hauptprodukt mit einem Anteil > 70% war (s. Tabelle 21).

Durch die im Massenspektrum aufgenommenen Molekülionen, konnten die gebildeten Produkte als Hydroxy- (P1) bzw. Aldehydderivate (P2) zugeordnet werden. Das Molekülion von P3 entsprach einem dreifach oxidierten Produkt. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Lupeol konsekutiv an der gleichen Position von P1 zu P3 oxidiert wurde, womit die P450-BM3-Varianten eine hohe Regioselektivität besitzen. Für P4 konnte wegen der geringen Signalintensität das Molekülion im Massenspektrum nicht identifiziert werden. Die Betrachtung des Zeitverlaufs der Reaktion (s. Tabelle 23) spricht für die Theorie der hohen Regioselektivität, da P1 und P2 (bis auf einen leichten Anstieg des Anteils von P1 von 0,5 h auf 2 h) über die Zeit abnehmen, während der Anteil von P3 zunimmt. Die fünf Ringe des Substrates Lupeol sind *trans*-verknüpft, weshalb das Molekül besonders starr ist (Broniatowski *et al.* 2014; Wachter *et al.* 2014); durch diese Beschaffenheit ist es möglich,

dass Lupeol recht unbeweglich gebunden im aktiven Zentrum der P450 vorliegt, was dafür spricht, dass die Oxidation regioselektiv erfolgt. Um diese Schlussfolgerung final zu bestätigen, müssten (analog zu dem im Rahmen dieser Arbeit isolierten Produkt P3) auch P1 und P2 in ausreichenden Mengen hergestellt werden, um NMR-Analysen zur Strukturaufklärung durchführen zu können.

Bei P3, dessen Struktur durch NMR-Analysen im Rahmen dieser Arbeit ermittelt werden konnte, handelt es sich um 3β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure (s. Abbildung 38), ein Stereoisomer der bereits literaturbeschriebenen Lupeol-Säure (3α -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure) (Büchele *et al.* 2003; Culioli *et al.* 2003). Lupeol-Säure, deren Biosyntheseroute bisher nicht beschrieben ist und lediglich aus Pflanzen isoliert und identifiziert werden konnte, unterscheidet sich in der Stereochemie der OH-Gruppe an Position 3 von dem in dieser Arbeit identifizierten Produkt. 3α -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure weist biologische Aktivitäten, wie chemopräventive und entzündungshemmende Eigenschaften auf (Akihisa *et al.* 2006; Banno *et al.* 2006). Das Potenzial von 3β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure hinsichtlich der biologischen Aktivität sollte in weiterführenden Studien getestet werden.

Die dreischrittige Oxidation von Triterpenoid-Substraten durch eine Cytochrom-P450-Monooxygenase (Alkohol \rightarrow Aldehyd \rightarrow Carbonsäure) besitzt hohes biotechnologisches Potential, da das säurefunktionalisierte Produkt nicht unter Verwendung mehrerer Enzyme (P450, Alkohol-Dehydrogenase, Aldehyd-Dehydrogenase), sondern mithilfe von nur eines P450-Enzyms synthetisiert werden kann. Diese Methode wurde z.B. zur Synthese von Artemisininsäure, einer Vorstufe des anti-Malaria Wirkstoffes Artemisinin, durch CYP71AV1 aus *Artemisia annua* eingesetzt. Dabei wurde CYP71AV1 heterolog in *S. cerevisiae* hergestellt und *in vivo* zur dreischrittigen Oxidation von Amorpha-4,11-Dien zur Artemisininsäure verwendet (Ro *et al.* 2006). Allerdings muss angemerkt werden, dass später gezeigt werden konnte, dass durch den Einsatz der physiologischen Dehydrogenasen des Biosynthesewegs, ADH und ALDH aus *A. annua*, die Produkttiter an Artemisininsäure nochmals deutlich gesteigert werden konnten (Paddon *et al.* 2013).

4.2.3 Oxidation von α - und β -Amyrin und Cycloartenol

Die P450-BM3-Dreifachmutante V78G F87A I263G konnte in weiteren *in-vitro*-Reaktionen die Substrate α - und β -Amyrin sowie Cycloartenol oxidieren. Der Umsatz war dabei mit $> 80\%$ für α -Amyrin am höchsten (s. Abbildung 40). Die höchste Selektivität wurde jedoch bei der Umsetzung von β -Amyrin erreicht, bei der ein Hauptprodukt mit 80% Anteil gebildet wurde, das laut Massenspektrum eine zusätzliche Hydroxylgruppe aufwies. Die Charakterisierung der weiteren Oxidationsprodukte war aufgrund ihres jeweils geringen

Anteils nicht möglich. Da alle verwendeten Substrate die Gemeinsamkeit der zwei Methylgruppen am A-Ring aufwiesen, kann jedoch darüber gemutmaßt werden, dass diese Substrate ebenfalls (analog zu Lupeol) an Position C-24 (bei Cycloartenol wäre die analoge Position C-29) oxidiert wurden. Diese Annahme wird durch literaturbeschriebene GC/MS-Daten von 24-Hydroxy- β -Amyrin unterstützt (Fukushima *et al.* 2011), da das Massenspektrum dieses β -Amyrinderivats mit dem in dieser Arbeit detektierten Produkt verglichen werden kann. In beiden Fällen ist das Molekülion 586 m/z, weitere charakteristische Masse/Ladungsverhältnisse, die in der Literatur beschrieben sind, sind die m/z-Werte 496, 483, 406, 393, 368 und 278, welche sich alle im detektierten Spektrum dieser Arbeit wiederfinden (s. Anhang, Abbildung 49). Zur definitiven Bestätigung müssten allerdings alle Produkte für NMR-Analysen aus größeren Reaktionsansätzen isoliert werden. Wie auch Lupeol sind die Amyrine als auch Cycloartenol starre Moleküle. Bei den Amyrinen sind alle Ringe, bis auf die D/E-Ringe, *trans*-verknüpft (Broniatowski *et al.* 2014). Bei dem tetrazyklischen Cycloartenol sind, ebenfalls wie bei Lupeol, alle Ringe *trans*-verknüpft (Breitmaier und Jung 2012; Wachter *et al.* 2014). Da diese Eigenschaften zu einer regioselektiven Oxidation führen können, kann angenommen werden, dass wie bei Lupeol auch die anderen Zielsubstrate regioselektiv an einer Position oxidiert werden.

Die zwei Hauptprodukte der α -Amyrin-Oxidation entsprechen einem hydroxylierten und einem Produkt mit einer Säuregruppe oder einer Aldehyd-/Ketofunktion. Wenn α -Amyrin wie Lupeol an der Position C-24 oxidiert würde, dann würde sich die möglicherweise gebildete Säure nur in der Stereochemie an Position der Hydroxylgruppe an C-3 von der bekannten β -Boswelliasäure, die vor allem in Weihraucharten vorkommt, unterscheiden. Das mögliche Hauptprodukt der β -Amyrin-Oxidation, 24-OH- β -Amyrin, wäre dementsprechend ein Vorläufer der α -Boswelliasäure. Boswelliasäuren und insbesondere deren weiter modifizierten Derivate, haben vielfältige biologische Eigenschaften. Darunter konnten unter anderem eine entzündungshemmende Wirkung nachgewiesen werden. Viele Studien wurden zudem zu den anti-karzinogenen Eigenschaften durchgeführt (Liu *et al.* 2002; Park *et al.* 2002; Park *et al.* 2011; Yadav *et al.* 2012). Bei der Oxidation von Cycloartenol durch die P450-BM3 Dreifachmutante konnte in dieser Arbeit ein Hauptprodukt detektiert werden, das auf eine Hydroxylierung hinweist. Wenn auch Cycloartenol, wie Lupeol an der Methylgruppe (in Lupeol C-24, in Cycloartenol analog dazu C-29), oxidiert würde, würde ein schon bekanntes Cycloartenol-Derivat entstehen, das beispielsweise ein Intermediat des Sterols Stigmasterol ist (Nes 2011).

4.2.4 Schlussfolgerung

Abschließend lässt sich sagen, dass das Ziel dieses Versuchsteils, neuartige oxyfunktionalisierte Triterpenoide mittels P450-BM3-Varianten zu generieren, erreicht wurde. Lupeol konnte *in vitro* in einer dreischrittigen Oxidationsreaktion durch die P450-BM3-Dreifachmutante V78G F87A I263G zu 3 β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure umgesetzt werden. Das generierte Lupeol-Derivat konnte in dieser Arbeit (nach bestem Wissen) erstmals beschrieben werden.

Die identifizierte P450-BM3-Variante konnte zudem zur Oxidation der pentazyklischen Triterpenoide α - und β -Amyrin sowie des tetrazyklischen Cycloartenols eingesetzt werden. Damit konnten P450-BM3-Varianten erstmals zur Oxidation pentazyklischer Triterpenoide eingesetzt werden. Steroide hingegen wurden schon durch P450-BM3-Varianten umgesetzt (Cha *et al.* 2014; Kille *et al.* 2011; Lewis *et al.* 2010; Liu *et al.* 2016; Lussenburg *et al.* 2005; Vottero *et al.* 2011); Cycloartenol jedoch wurde in diesen Studien nicht als Substrat benutzt, weshalb dies (nach bestem Wissen) die erste Beschreibung der Oxidation von Cycloartenol durch P450-BM3-Varianten ist.

4.3 Ausblick

In zukünftigen Studien sollen die untersuchten pflanzlichen Cytochrom-P450-Monooxygenasen und auch die Triterpenoid-oxidierenden P450-BM3-Mutanten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, in rekombinanten bakteriellen Systemen zur Rekonstitution von Triterpenoid-Biosynthesewegen für die Produktion von oxyfunktionalisierten Triterpenoiden, verwendet werden. Denkbar wäre dazu eine Anwendung der P450-Enzyme in den mikrobiellen Wirten *E. coli*, *R. capsulatus* oder *Synechocytis* sp. PCC 6803, die schon erfolgreich zur Rekonstitution von Teilen von Biosynthesewegen zur Synthese von Triterpenoiden wie Dammarendiol-II, Marnerol und Lupeol verwendet werden konnten (Li *et al.* 2016; Loeschcke *et al.* 2017).

5 Literatur

- Acevedo-Rocha C. G., Gamble C. G., Lonsdale R., Li A., Nett N., Hoebenreich S., Lingnau J. B., Wirtz C., Fares C., Hinrichs H., Deege A., Mulholland A. J., Nov Y., Leys D., McLean K. J., Munro A. W., Reetz M. T. (2018): P450-catalyzed regio- and diastereoselective steroid hydroxylation: efficient directed evolution enabled by mutability landscaping. *ACS Catalysis* 8:3395–3410.
- Akihisa T., Tabata K., Banno N., Tokuda H., Nishihara R., Nakamura Y., Kimura Y., Yasukawa K., Suzuki T. (2006): Cancer chemopreventive effects and cytotoxic activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29:1976–1979.
- Arnold F. H. (2015): The nature of chemical innovation: New enzymes by evolution. *Quarterly Reviews of Biophysics* 48:404–410.
- Augustin J. M., Kuzina V., Andersen S. B., Bak S. (2011): Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 72:435–457.
- Bak S., Beisson F., Bishop G., Hamberger B., Höfer R., Paquette S., Werck-Reichhart D. (2011): Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book* 9:e0144.
- Bak S., Kahn R. A., Olsen C. E., Halkier B. A. (1997): Cloning and expression in *Escherichia coli* of the obtusifoliol 14 α -demethylase of *Sorghum bicolor* (L) Moench, a cytochrome P450 orthologous to the sterol 14 α -demethylases (CYP51) from fungi and mammals. *The Plant Journal* 11:191–201.
- Bakkes P. J., Biemann S., Bokel A., Eickholt M., Girhard M., Urlacher V. B. (2015): Design and improvement of artificial redox modules by molecular fusion of flavodoxin and flavodoxin reductase from *Escherichia coli*. *Scientific Reports* 5:12158.
- Bakkes P. J., Riehm J. L., Sagadin T., Rühlmann A., Schubert P., Biemann S., Girhard M., Hutter M. C., Bernhardt R., Urlacher V. B. (2017): Engineering of versatile redox partner fusions that support monooxygenase activity of functionally diverse cytochrome P450s. *Scientific Reports* 7:9570.
- Baltina L. A., Flekhter O. B., Nigmatullina L. R., Boreko E. I., Pavlova N. I., Nikolaeva S. N., Savinova O. V., Tolstikov G. A. (2003): Lupane triterpenes and derivatives with antiviral activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13:3549–3552.
- Banno N., Akihisa T., Tokuda H., Yasukawa K., Taguchi Y., Akazawa H., Ukiya M., Kimura Y., Suzuki T., Nishino H. (2005): Anti-inflammatory and antitumor-promoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28:1995–1999.

- Banno N., Akihisa T., Yasukawa K., Tokuda H., Tabata K., Nakamura Y., Nishimura R., Kimura Y., Suzuki T. (2006): Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*. *Journal of Ethnopharmacology* 107:249–253.
- Barnes H. J., Arlotto M. P., Waterman M. R. (1991): Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:5597–5601.
- Benoit-Vical F., Imbert C., Bonfils J.-P., Sauvaire Y. (2003): Antiplasmodial and antifungal activities of iridal, a plant triterpenoid. *Phytochemistry* 62:747–751.
- Biggs B. W., Lim C. G., Sagliani K., Shankar S., Stephanopoulos G., de Mey M., Ajikumar P. K. (2016): Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated taxol precursor synthesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:3209–3214.
- Bleif S., Hannemann F., Zapp J., Hartmann D., Jauch J., Bernhardt R. (2012): A new *Bacillus megaterium* whole-cell catalyst for the hydroxylation of the pentacyclic triterpene 11-keto- β -boswellic acid (KBA) based on a recombinant cytochrome P450 system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93:1135–1146.
- Bornscheuer U. T., Pohl M. (2001): Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology* 5:137–143.
- Bozak K. R., Yu H., Sirevåg R., Christoffersen R. E. (1990): Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:3904–3908.
- Bracco P., Janssen D. B., Schallmeyer A. (2013): Selective steroid oxyfunctionalisation by CYP154C5, a bacterial cytochrome P450. *Microbial Cell Factories* 12:95.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254.
- Breitmaier E., Jung G. (Hrsg.) (2012): *Organische Chemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Broniatowski M., Flasiński M., Zięba K., Miśkowiec P. (2014): Langmuir monolayer studies of the interaction of monoamphiphilic pentacyclic triterpenes with anionic mitochondrial and bacterial membrane phospholipids - Searching for the most active terpene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1838:2460–2472.
- Büchele B., Zugmaier W., Simmet T. (2003): Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related phytopharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. Identification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpene. *Journal of Chromatography B* 791:21–30.

- Budde M. (2007): Biokatalyse mit Cytochrom P450 Monooxygenasen: Zur selektiven Oxidation von Terpenen und Fettsäuren. Dissertation. Universität Stuttgart.
- Carmichael A. B., Wong L. L. (2001): Protein engineering of *Bacillus megaterium* CYP102. The oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *European Journal of Biochemistry* 268:3117–3125.
- Castillo D. A., Kolesnikova M. D., Matsuda S. P. T. (2013): An effective strategy for exploring unknown metabolic pathways by genome mining. *Journal of the American Chemical Society* 135:5885–5894.
- Cha G. S., Ryu S. H., Ahn T., Yun C.-H. (2014): Regioselective hydroxylation of 17 β -estradiol by mutants of CYP102A1 from *Bacillus megaterium*. *Biotechnology Letters* 36:2501–2506.
- Chang M. C. Y., Eachus R. A., Trieu W., Ro D.-K., Keasling J. D. (2007): Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nature Chemical Biology* 3:274–277.
- Cheesman M. J., Baer B. R., Zheng Y.-M., Gillam E. M. J., Rettie A. E. (2003): Rabbit CYP4B1 engineered for high-level expression in *Escherichia coli*: ligand stabilization and processing of the N-terminus and heme prosthetic group. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 416:17–24.
- Chemler J. A., Koffas M. A. G. (2008): Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Current Opinion in Biotechnology* 19:597–605.
- Chu H. Y., Wegel E., Osbourn A. (2011): From hormones to secondary metabolism: the emergence of metabolic gene clusters in plants. *The Plant Journal* 66:66–79.
- Corbu A., Aquino M., Perez M., Gandara Z., Arseniyadis S. (2009): Natural and unnatural *A-seco* terpenes from pulegone: synthesis of galbanic acid and marneral revisited. *European Journal of Organic Chemistry* 2009:6386–6392.
- Corbu A., Aquino M., Pratap T. V., Retailleau P., Arseniyadis S. (2008): Enantioselective synthesis of iridal, the parent molecule of the iridal triterpenoid class. *Organic Letters* 10:1787–1790.
- Corpet F. (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16:10881–10890.
- Culioli G., Mathe C., Archier P., Vieillescazes C. (2003): A lupane triterpene from frankincense (*Boswellia* sp., Burseraceae). *Phytochemistry* 62:537–541.
- Dietrich M., Do T. A., Schmid R. D., Pleiss J., Urlacher V. B. (2009): Altering the regioselectivity of the subterminal fatty acid hydroxylase P450 BM-3 towards γ - and λ -positions. *Journal of Biotechnology* 139:115–117.

- Durst F., Nelson D. R. (1995): Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases. *Drug Metabolism and Drug Interactions* 12:189–206.
- Fang R., Houghton P. J., Hylands P. J. (2008): Cytotoxic effects of compounds from *Iris tectorum* on human cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 118:257–263.
- Field B., Fiston-Lavier A.-S., Kemen A., Geisler K., Quesneville H., Osbourn A. E. (2011): Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:16116–16121.
- Field B., Osbourn A. E. (2008): Metabolic diversification—-independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. *Science* 320:543–547.
- Fujii K., Huennekens F. M. (1974): Activation of methionine synthetase by a reduced triphosphopyridine nucleotide-dependent flavoprotein system. *Journal of Biological Chemistry* 249:6745–6753.
- Fujii Y., Hirose S., Fujii T., Matsumoto N., Agematu H., Arisawa A. (2006): Hydroxylation of oleanolic acid to quercetinic acid by cytochrome P450 from *Nonomuraea relictatena*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70:2299–2302.
- Fujita S., Ohnishi T., Watanabe B., Yokota T., Takatsuto S., Fujioka S., Yoshida S., Sakata K., Mizutani M. (2006): *Arabidopsis* CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C 27 , C 28 and C 29 sterols. *The Plant Journal* 45:765–774.
- Fukushima E. O., Seki H., Ohyama K., Ono E., Umemoto N., Mizutani M., Saito K., Muranaka T. (2011): CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. *Plant & Cell Physiology* 52:2050–2061.
- Gallo M. B. C., Sarachine M. J. (2009): Biological activities of lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 3:46–66.
- Geisler K., Hughes R. K., Sainsbury F., Lomonosoff G. P., Rejzek M., Fairhurst S., Olsen C.-E., Motawia M. S., Melton R. E., Hemmings A. M., Bak S., Osbourn A. (2013): Biochemical analysis of a multifunctional cytochrome P450 (CYP51) enzyme required for synthesis of antimicrobial triterpenes in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:E3360-E3367.
- Girhard M., Klaus T., Khatri Y., Bernhardt R., Urlacher V. B. (2010): Characterization of the versatile monooxygenase CYP109B1 from *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:595–607.
- Girhard M., Tieves F., Weber E., Smit M. S., Urlacher V. B. (2013): Cytochrome P450 reductase from *Candida apicola*: versatile redox partner for bacterial P450s. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97:1625–1635.

- Go Y. S., Lee S. B., Kim H. J., Kim J., Park H.-Y., Kim J.-K., Shibata K., Yokota T., Ohyama K., Muranaka T., Arseniyadis S., Suh M. C. (2012): Identification of marneral synthase, which is critical for growth and development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 72:791–804.
- Grinkova Y. V., Denisov I. G., Sligar S. G. (2010): Functional reconstitution of monomeric CYP3A4 with multiple cytochrome P450 reductase molecules in nanodiscs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 398:194–198.
- Halkier B. A., Nielsen H. L., Koch B., Moller B. L. (1995): Purification and characterization of recombinant cytochrome P450_{TYR} expressed at high levels in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 322:369–377.
- Hannemann F., Bichet A., Ewen K. M., Bernhardt R. (2007): Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770:330–344.
- Haudenschild C., Schalk M., Karp F., Croteau R. (2000): Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 379:127–136.
- Hawkes D. B., Slessor K. E., Bernhardt P. V., de Voss J. J. (2010): Cloning, expression and purification of cindoxin, an unusual Fmn-containing cytochrome p450 redox partner. *ChemBioChem* 11:1107–1114.
- Hegde A., Haines D. C., Bondlela M., Chen B., Schaffer N., Tomchick D. R., Machius M., Nguyen H., Chowdhary P. K., Stewart L., Lopez C., Peterson J. A. (2007): Interactions of substrates at the surface of P450s can greatly enhance substrate potency. *Biochemistry* 46:14010–14017.
- Imaoka S., Imai Y., Shimada T., Funae Y. (1992): Role of phospholipids in reconstituted cytochrome P450 3A form and mechanism of their activation of catalytic activity. *Biochemistry* 31:6063–6069.
- Irmeler S., Schröder G., St-Pierre B., Crouch N. P., Hotze M., Schmidt J., Strack D., Matern U., Schröder J. (2000): Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *The Plant Journal* 24:797–804.
- Isin E. M., Guengerich F. P. (2008): Substrate binding to cytochromes P450. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392:1019–1030.
- Jefcoate C. R. (1978): Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy. *Methods in Enzymology* 52:258–279.

- Kassi E., Papoutsi Z., Pratsinis H., Aligiannis N., Manoussakis M., Moutsatsou P. (2007): Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 133:493–500.
- Kemen A. C., Honkanen S., Melton R. E., Findlay K. C., Mugford S. T., Hayashi K., Haralampidis K., Rosser S. J., Osbourn A. (2014): Investigation of triterpene synthesis and regulation in oats reveals a role for β -amyrin in determining root epidermal cell patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:8679–8684.
- Kille S., Zilly F. E., Acevedo J. P., Reetz M. T. (2011): Regio- and stereoselectivity of P450-catalysed hydroxylation of steroids controlled by laboratory evolution. *Nature Chemistry* 3:738–743.
- Kolev J. N., O'Dwyer K. M., Jordan C. T., Fasan R. (2014): Discovery of potent parthenolide-based antileukemic agents enabled by late-stage P450-mediated C-H functionalization. *ACS Chemical Biology* 9:164–173.
- Korendovych I. V. (2018): Rational and semirational protein design. *Methods in Molecular Biology* 1685:15–23.
- Kranz-Finger S., Mahmoud O., Ricklefs E., Ditz N., Bakkes P. J., Urlacher V. B. (2018): Insights into the functional properties of the marneral oxidase CYP71A16 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1866:2–10.
- Krest C. M., Onderko E. L., Yosca T. H., Calixto J. C., Karp R. F., Livada J., Rittle J., Green M. T. (2013): Reactive intermediates in cytochrome P450 catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 288:17074–17081.
- Krokida A., Delis C., Geisler K., Garagounis C., Tsikou D., Peña-Rodríguez L. M., Katsarou D., Field B., Osbourn A. E., Papadopoulou K. K. (2013): A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytologist* 200:675–690.
- Kubo T., Peters M. W., Meinhold P., Arnold F. H. (2006): Enantioselective epoxidation of terminal alkenes to (*R*)- and (*S*)-epoxides by engineered cytochromes P450 BM-3. *Chemistry* 12:1216–1220.
- Kuchner O., Arnold F. H. (1997): Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends in Biotechnology* 15:523–530.
- Kushiro T., Shibuya M., Ebizuka Y. (1998): β -amyrin synthase: cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *European Journal of Biochemistry* 256:238–244.
- Lawson R. J., Wachenfeldt C. von, Haq I., Perkins J., Munro A. W. (2004): Expression and characterization of the two flavodoxin proteins of *Bacillus subtilis*, YkuN and YkuP:

- biophysical properties and interactions with cytochrome P450 Biol. Biochemistry 43:12390–12409.
- Le-Huu P., Heidt T., Claasen B., Laschat S., Urlacher V. B. (2015): Chemo-, regio-, and stereoselective oxidation of the monocyclic diterpenoid β -cembrenediol by P450 BM3. ACS Catalysis 5:1772–1780.
- Le-Huu P., Petrović D., Strodel B., Urlacher V. B. (2016): One-pot, two-step hydroxylation of the macrocyclic diterpenoid β -cembrenediol catalyzed by P450 BM3 mutants. ChemCatChem 8:3755–3761.
- Lewis J. C., Mantovani S. M., Fu Y., Snow C. D., Komor R. S., Wong C.-H., Arnold F. H. (2010): Combinatorial alanine substitution enables rapid optimization of cytochrome P450_{BM3} for selective hydroxylation of large substrates. ChemBioChem 11:2502–2505.
- Li C.-H., Chen P.-Y., Chang U.-M., Kan L.-S., Fang W.-H., Tsai K.-S., Lin S.-B. (2005): Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells. Life Sciences 77:252–265.
- Li D., Zhang Q., Zhou Z., Zhao F., Lu W. (2016): Heterologous biosynthesis of triterpenoid dammarenediol-II in engineered *Escherichia coli*. Biotechnology Letters 38:603–609.
- Li H., Poulos T. L. (1997): The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. Nature Structural and Molecular Biology 4:140–146.
- Li Q.-S., Ogawa J., Schmid R. D., Shimizu S. (2001): Engineering cytochrome P450 BM-3 for oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology 67:5735–5739.
- Liu J. (2005): Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. Journal of Ethnopharmacology 100:92–94.
- Liu J.-J., Nilsson A., Oredsson S., Badmaev V., Zhao W.-Z., Duan R.-D. (2002): Boswellic acids trigger apoptosis via a pathway dependent on caspase-8 activation but independent on Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells. Carcinogenesis 23:2087–2093.
- Liu X., Wang Z.-B., Wang Y.-N., Kong J.-Q. (2016): Probing steroidal substrate specificity of cytochrome P450 BM3 variants. Molecules 21:760.
- Loeschcke A., Dienst D., Wewer V., Hage-Hülsmann J., Dietsch M., Kranz-Finger S., Hüren V., Metzger S., Urlacher V. B., Gigolashvili T., Kopriva S., Axmann I. M., Drepper T., Jaeger K.-E. (2017): The photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 as new hosts for cyclic plant triterpene biosynthesis. PloS One 12:e0189816.
- Loftsson T., Brewster M. E. (1996): Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. Journal of Pharmaceutical Sciences 85:1017–1025.

- Looman A. C., Bodlaender J., Comstock L. J., Eaton D., Jhurani P., de Boer, H A, van Knippenberg, P H (1987): Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified lacZ gene in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* 6:2489–2492.
- Lussenburg B. M. A., Babel L. C., Vermeulen N. P. E., Commandeur J. N. M. (2005): Evaluation of alkoxyresorufins as fluorescent substrates for cytochrome P450 BM3 and site-directed mutants. *Analytical Biochemistry* 341:148–155.
- Luthra A., Denisov I. G., Sligar S. G. (2011): Spectroscopic features of cytochrome P450 reaction intermediates. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 507:26–35.
- Lutz S. (2010): Beyond directed evolution - semi-rational protein engineering and design. *Current Opinion in Biotechnology* 21:734–743.
- Mallavadhani U. V., Mahapatra A., Jamil K., Reddy P. S. (2004): Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27:1576–1579.
- Marner F.-J. (1997): Iridals and cycloiridals, products of an unusual squalene metabolism in sword lilies (*Iridaceae*). *Current Organic Chemistry* 1:153–186.
- Marner F.-J., Gladtko D., Jaenicke L. (1988): Studies on the biosynthesis of iridals and cycloiridals. *Helvetica Chimica Acta* 71:1331–1338.
- Marner F.-J., Longerich I. (1992): Isolation and structure determination of new iridals from *Iris sibirica* and *Iris versicolor*. *Liebigs Annalen der Chemie* 1992:269–272.
- Mast N., Andersson U., Nakayama K., Bjorkhem I., Pikuleva I. A. (2004): Expression of human cytochrome P450 46A1 in *Escherichia coli*: effects of N- and C-terminal modifications. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 428:99–108.
- Maurer S. C., Kühnel K., Kaysser L. A., Eiben S., Schmid R. D., Urlacher V. B. (2005): Catalytic hydroxylation in biphasic systems using CYP102A1 mutants. *Advanced Synthesis & Catalysis* 347:1090–1098.
- McIver L., Leadbeater C., Campopiano D. J., Baxter R. L., Daff S. N., Chapman S. K., Munro A. W. (1998): Characterisation of flavodoxin NADP⁺ oxidoreductase and flavodoxin; key components of electron transfer in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* 257:577–585.
- Mencherini T., Picerno P., Scesa C., Aquino R. (2007): Triterpene, antioxidant, and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*. *Journal of Natural Products* 70:1889–1894.
- Miki Y., Asano Y. (2014): Biosynthetic pathway for the cyanide-free production of phenylacetonitrile in *Escherichia coli* by utilizing plant cytochrome P450 79A2 and bacterial aldoxime dehydratase. *Applied and Environmental Microbiology* 80:6828–6836.

- Milhim M., Gerber A., Neunzig J., Hannemann F., Bernhardt R. (2016): A Novel NADPH-dependent flavoprotein reductase from *Bacillus megaterium* acts as an efficient cytochrome P450 reductase. *Journal of Biotechnology* 231:83–94.
- Miroux B., Walker J. E. (1996): Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology* 260:289–298.
- Misawa N. (2011): Pathway engineering for functional isoprenoids. *Current Opinion in Biotechnology* 22:627–633.
- Miura Y., Fulco A. J. (1974): (ω -2) hydroxylation of fatty acids by a soluble system from *Bacillus megaterium*. *The Journal of Biological Chemistry* 249:1880–1888.
- Mizutani M., Ohta D. (1998): Two isoforms of NADPH:cytochrome P450 reductase in *Arabidopsis thaliana*. Gene structure, heterologous expression in insect cells, and differential regulation. *Plant Physiology* 116:357–367.
- Morant M., Bak S., Møller B. L., Werck-Reichhart D. (2003): Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 14:151–162.
- Morrone D., Chen X., Coates R. M., Peters R. J. (2010): Characterization of the kaurene oxidase CYP701A3, a multifunctional cytochrome P450 from gibberellin biosynthesis. *The Biochemical Journal* 431:337–347.
- Moses T., Pollier J., Almagro L., Buyst D., van Montagu M., Pedreño M. A., Martins J. C., Thevelein J. M., Goossens A. (2014): Combinatorial biosynthesis of saponins and saponins in *Saccharomyces cerevisiae* using a C-16 α hydroxylase from *Bupleurum falcatum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:1634–1639.
- Moses T., Pollier J., Thevelein J. M., Goossens A. (2013): Bioengineering of plant (tri)terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology *in vivo* and *in vitro*. *The New Phytologist* 200:27–43.
- Nagao T., Mitamura T., Wang X. H., Negoro S., Yomo T., Urabe I., Okada H. (1992): Cloning, nucleotide sequences, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030. *Journal of Bacteriology* 174:5013–5020.
- Narhi L. O., Fulco A. J. (1986): Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *The Journal of Biological Chemistry* 261:7160–7169.
- Narhi L. O., Fulco A. J. (1987): Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *The Journal of Biological Chemistry* 262:6683–6690.

- Ndjimi P. M. (2014): Klonierung und Expression einer Cytochrom P450 Reduktase aus *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Nebert D. W., Adesnik M., Coon M. J., Estabrook R. W., Gonzalez F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper B., Levin W., Phillips I. R., Sato R., Waterman M. R. (1987): The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 6:1–11.
- Nebert D. W., Nelson D. R., Adesnik M., Coon M. J., Estabrook R. W., Gonzalez F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper B., Levin W., Phillips I. R., Sato R., Waterman M. R. (1989): The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA* 8:1–13.
- Nebert D. W., Nelson D. R., Coon M. J., Estabrook R. W., Feyereisen R., Fujii-Kuriyama Y., Gonzalez F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F. (1991): The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA and Cell Biology* 10:1–14.
- Nelson D., Werck-Reichhart D. (2011): A P450-centric view of plant evolution. *66*:194–211.
- Nelson D. R. (2006): Cytochrome P450 nomenclature, 2004. In: Phillips I.R., Shephard E.A. *Cytochrome P450 protocols. Methods in Molecular Biology*. 320:1–10.
- Nelson D. R., Kamataki T., Waxman D. J., Guengerich F. P., Estabrook R. W., Feyereisen R., Gonzalez F. J., Coon M. J., Gunsalus I. C., Gotoh O., Okuda K., Nebert D. W. (1993): The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology* 12:1–51.
- Nelson D. R., Schuler M. A., Paquette S. M., Werck-Reichhart D., Bak S. (2004): Comparative genomics of rice and *Arabidopsis*. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiology* 135:756–772.
- Nes W. D. (2011): Biosynthesis of cholesterol and other sterols. *Chemical Reviews* 111:6423–6451.
- Niedermeyer T. H. J., Lindequist U., Mentel R., Gördes D., Schmidt E., Thurow K., Lalk M. (2005): Antiviral Terpenoid Constituents of *Ganoderma pfeifferi*. *Journal of Natural Products* 68:1728–1731.
- Niu G., Zhao S., Wang L., Dong W., Liu L., He Y. (2017): Structure of the *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductase 2 (ATR2) provides insight into its function. *The FEBS Journal* 284:754–765.
- Noble M. A., Miles C. S., Chapman S. K., Lysek D. A., MacKay A. C., Reid G. A., Hanzlik R. P., Munro A. W. (1999): Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3. *The Biochemical Journal* 339:371–379.
- Nützmann H.-W., Osbourn A. (2014): Gene clustering in plant specialized metabolism. *Current Opinion in Biotechnology* 26:91–99.

- Omura T., Sato R. (1964a): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *The Journal of Biological Chemistry* 239:2370–2378.
- Omura T., Sato R. (1964b): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *The Journal of Biological Chemistry* 239:2379–2385.
- Ortiz de Montellano P. R. (2010): Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Reviews* 110:932–948.
- Paddon C. J., Westfall P. J., Pitera D. J., Benjamin K., Fisher K., McPhee D., Leavell M. D., Tai A., Main A., Eng D., Polichuk D. R., Teoh K. H., Reed D. W., Treynor T., Lenihan J., Fleck M., Bajad S., Dang G., Dengrove D., Diola D., Dorin G., Ellens K. W., Fickes S., Galazzo J., Gaucher S. P., Geistlinger T., Henry R., Hepp M., Horning T., Iqbal T., Jiang H., Kizer L., Lieu B., Melis D., Moss N., Regentin R., Secrest S., Tsuruta H., Vazquez R., Westblade L. F., Xu L., Yu M., Zhang Y., Zhao L., Lievens J., Covello P. S., Keasling J. D., Reiling K. K., Renninger N. S., Newman J. D. (2013): High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* 496:528–532.
- Papadopoulou K., Melton R. E., Leggett M., Daniels M. J., Osbourn A. E. (1999): Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:12923–12928.
- Park B., Prasad S., Yadav V., Sung B., Aggarwal B. B. (2011): Boswellic acid suppresses growth and metastasis of human pancreatic tumors in an orthotopic nude mouse model through modulation of multiple targets. *PloS One* 6:e26943.
- Park Y. S., Lee J. H., Bondar J., Harwalkar J. A., Safayhi H., Golubic M. (2002): Cytotoxic action of acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA) on meningioma cells. *Planta Medica* 68:397–401.
- Pathirana A. L., Stubblefield J. M., Zhou X., Miao J., Newsome A. L., Dunlap N. (2016): Antitrypanosomal activity of iridals from *Iris domestica*. *Phytochemistry Letters* 18:44–50.
- Peters M. W., Meinhold P., Glieder A., Arnold F. H. (2003): Regio- and enantioselective alkane hydroxylation with engineered cytochromes P450 BM-3. *Journal of the American Chemical Society* 125:13442–13450.
- Phillips D. R., Rasbery J. M., Bartel B., Matsuda S. P. T. (2006): Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology* 9:305–314.
- Pisha E., Chai H., Lee I.-S., Chagwedera T. E., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Beecher C. W. W., Fong H. H. S., Kinghorn A. D., Brown D. M., Wani M. C., Wall M. E., Hieken T. J., Gupta T. K. D., Pezzuto J. M. (1995): Discovery of betulonic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nature Medicine* 1:1046–1051.

- Qi X., Bakht S., Leggett M., Maxwell C., Melton R., Osbourn A. (2004): A gene cluster for secondary metabolism in oat: implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:8233–8238.
- Rappsilber J., Ishihama Y., Mann M. (2003): Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Analytical Chemistry* 75:663–670.
- Ravichandran K. G., Boddupalli S. S., Hasermann C. A., Peterson J. A., Deisenhofer J. (1993): Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science* 261:731–736.
- Ro D.-K., Paradise E. M., Ouellet M., Fisher K. J., Newman K. L., Ndungu J. M., Ho K. A., Eachus R. A., Ham T. S., Kirby J., Chang M. C. Y., Withers S. T., Shiba Y., Sarpong R., Keasling J. D. (2006): Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440:940–943.
- Rosano G. L., Ceccarelli E. A. (2014): Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5:172.
- Rühlmann A., Antovic D., Müller T. J. J., Urlacher V. B. (2017): Regioselective hydroxylation of stilbenes by engineered cytochrome P450 from *Thermobifida fusca* YX. *Advanced Synthesis & Catalysis* 359:984–994.
- Sagadin T., Riehm J. L., Milhim M., Hutter M. C., Bernhardt R. (2018): Binding modes of CYP106A2 redox partners determine differences in progesterone hydroxylation product patterns. *Communications Biology* 1:99.
- Saito S., Hirai N., Matsumoto C., Ohigashi H., Ohta D., Sakata K., Mizutani M. (2004): *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology* 134:1439–1449.
- Salvador J. A. R., Moreira V. M., Gonçalves B. M. F., Leal A. S., Jing Y. (2012): Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. *Natural Product Reports* 29:1463–1479.
- Sanyal I., Cohen G., Flint D. H. (1994): Biotin synthase: purification, characterization as a [2Fe-2S]cluster protein, and *in vitro* activity of the *Escherichia coli* bioB gene product. *Biochemistry* 33:3625–3631.
- Schenkman J. B., Remmer H., Estabrook R. W. (1967): Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Molecular Pharmacology* 3:113–123.
- Schenkman J. B., Sligar S. G., Cinti D. L. (1981): Substrate interaction with cytochrome P-450. *Pharmacology & Therapeutics* 12:43–71.

- Schmitz D., Zapp J., Bernhardt R. (2012): Hydroxylation of the triterpenoid dipterocarpol with CYP106A2 from *Bacillus megaterium*. *The FEBS Journal* 279:1663–1674.
- Schneider S., Wubbolts M. G., Oesterhelt G., Sanglard D., Witholt B. (1999): Controlled regioselectivity of fatty acid oxidation by whole cells producing cytochrome P450BM-3 monooxygenase under varied dissolved oxygen concentrations. *Biotechnology and Bioengineering* 64:333–341.
- Schoch G. A., Attias R., Belghazi M., Dansette P. M., Werck-Reichhart D. (2003): Engineering of a water-soluble plant cytochrome P450, CYP73A1, and NMR-based orientation of natural and alternate substrates in the active site. *Plant Physiology* 133:1198–1208.
- Schückel J. (2012): Development of a new platform technology for plant cytochrome P450 fusions. PhD thesis. University of York.
- Schückel J., Rylott E. L., Grogan G., Bruce N. C. (2012): A gene-fusion approach to enabling plant cytochromes p450 for biocatalysis. *ChemBioChem* 13:2758–2763.
- Schulz S., Girhard M., Gaßmeyer S. K., Jäger V. D., Schwarze D., Vogel A., Urlacher V. B. (2015): Selective enzymatic synthesis of the grapefruit flavor (+)-nootkatone. *ChemCatChem* 7:601–604.
- Schulz S., Schumacher D., Raszkowski D., Girhard M., Urlacher V. B. (2016): Fusion to hydrophobin HFBI improves the catalytic performance of a cytochrome P450 system. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 4:57.
- Scott E. E., Spatzenegger M., Halpert J. R. (2001): A truncation of 2B subfamily cytochromes P450 yields increased expression levels, increased solubility, and decreased aggregation while retaining function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 395:57–68.
- Seddon A. M., Curnow P., Booth P. J. (2004): Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666:105–117.
- Seelbach K., Riebel B., Hummel W., Kula M.-R., Tishkov V. I., Egorov A. M., Wandrey C., Kragl U. (1996): A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Letters* 37:1377–1380.
- Seifert A., Vomund S., Grohmann K., Kriening S., Urlacher V. B., Laschat S., Pleiss J. (2009): Rational design of a minimal and highly enriched CYP102A1 mutant library with improved regio-, stereo- and chemoselectivity. *ChemBioChem* 10:853–861.
- Seki H., Ohyama K., Sawai S., Mizutani M., Ohnishi T., Sudo H., Akashi T., Aoki T., Saito K., Muranaka T. (2008): Licorice β -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:14204–14209.

- Seki H., Sawai S., Ohyama K., Mizutani M., Ohnishi T., Sudo H., Fukushima E. O., Akashi T., Aoki T., Saito K., Muranaka T. (2011): Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. *The Plant Cell* 23:4112–4123.
- Shibuya M., Hoshino M., Katsube Y., Hayashi H., Kushiro T., Ebizuka Y. (2006): Identification of β -amyrin and sophoradiol 24-hydroxylase by expressed sequence tag mining and functional expression assay. *The FEBS Journal* 273:948–959.
- Singh M., Sharma R., Banerjee U. (2002): Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances* 20:341–359.
- Sligar S. G. (1976): Coupling of spin, substrate, and redox equilibria in cytochrome P450. *Biochemistry* 15:5399–5406.
- Sohl C. D., Guengerich F. P. (2010): Kinetic analysis of the three-step steroid aromatase reaction of human cytochrome P450 19A1. *The Journal of Biological Chemistry* 285:17734–17743.
- Sowden R. J., Yasmin S., Rees N. H., Bell S. G., Wong L.-L. (2005): Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450_{cam} and P450_{BM-3}. *Organic & Biomolecular Chemistry* 3:57–64.
- Strüh C. M., Jäger S., Schempp C. M., Scheffler A., Martin S. F. (2012): A novel triterpene extract from mistletoe induces rapid apoptosis in murine B16.F10 melanoma cells. *Phytotherapy Research* 26:1507–1512.
- Swaminathan S., Morrone D., Wang Q., Fulton D. B., Peters R. J. (2009): CYP76M7 is an ent-cassadiene C11 α -hydroxylase defining a second multifunctional diterpenoid biosynthetic gene cluster in rice. *The Plant Cell* 21:3315–3325.
- Thimmappa R., Geisler K., Louveau T., O'Maille P., Osbourn A. (2014): Triterpene biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology* 65:225–257.
- Tieves F. (2016): Entwicklung von *Pseudomonas putida* Ganzzellbiokatalysatoren zur Synthese oxyfunktionalisierter Verbindungen. Dissertation. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Tishkov V. I., Popov V. O. (2006): Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomolecular Engineering* 23:89–110.
- Urban P., Mignotte C., Kazmaier M., Delorme F., Pompon D. (1997): Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *Journal of Biological Chemistry* 272:19176–19186.
- Urlacher V. B., Girhard M. (2012): Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends in Biotechnology* 30:26–36.

- Urlacher V. B., Makhsumkhanov A., Schmid R. D. (2006): Biotransformation of β -ionone by engineered cytochrome P450 BM-3. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70:53–59.
- van Beilen J. B., Duetz W. A., Schmid A., Witholt B. (2003): Practical issues in the application of oxygenases. *Trends in Biotechnology* 21:170–177.
- van Gelder B. F., Slater E. C. (1962): The extinction coefficient of cytochrome *c*. *Biochimica et Biophysica Acta* 58:593–595.
- Varadarajan J., Guillemot J., Saint-Jore-Dupas C., Piégu B., Chabouté M.-E., Gomord V., Coolbaugh R. C., Devic M., Delorme V. (2010): ATR3 encodes a diflavin reductase essential for *Arabidopsis* embryo development. *New Phytologist* 187:67–82.
- Vázquez L. H., Palazon J., Navarro-Ocaña A. (2009): The pentacyclic triterpenes α -, β -amyryns: a review of sources and biological activities. *Phytochemicals* 23:487–502.
- Vermilion J. L., Coon M. J. (1974): Highly purified detergent-solubilized NADPH-cytochrome P-450 reductase from phenobarbital-induced rat liver microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 60:1315–1322.
- von Bühler C., Le-Huu P., Urlacher V. B. (2013): Cluster screening: an effective approach for probing the substrate space of uncharacterized cytochrome P450s. *ChemBioChem* 14:2189–2198.
- Vottero E., Rea V., Lastdrager J., Honing M., Vermeulen N. P. E., Commandeur J. N. M. (2011): Role of residue 87 in substrate selectivity and regioselectivity of drug-metabolizing cytochrome P450 CYP102A1 M11. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16:899–912.
- Wachenfeldt C. von, Richardson T. H., Cosme J., Johnson E. F. (1997): Microsomal P450 2C3 is expressed as a soluble dimer in *Escherichia coli* following modification of its N-terminus. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 339:107–114.
- Wachter H., Hausen A., Reibnegger G. (2014): *Chemie in der Medizin*. De Gruyter Studium. De Gruyter, Berlin.
- Wagner S., Klepsch M. M., Schlegel S., Appel A., Draheim R., Tarry M., Högbom M., van Wijk K. J., Slotboom D. J., Persson J. O., de Gier J.-W. (2008): Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:14371–14376.
- Wang Q., Hillwig M. L., Okada K., Yamazaki K., Wu Y., Swaminathan S., Yamane H., Peters R. J. (2012a): Characterization of CYP76M5-8 indicates metabolic plasticity within a plant biosynthetic gene cluster. *The Journal of Biological Chemistry* 287:6159–6168.
- Wang Q., Hillwig M. L., Wu Y., Peters R. J. (2012b): CYP701A8: a rice ent-kaurene oxidase paralog diverted to more specialized diterpenoid metabolism. *Plant Physiology* 158:1418–1425.

- Wang Z.-Q., Lawson R. J., Buddha M. R., Wei C.-C., Crane B. R., Munro A. W., Stuehr D. J. (2007): Bacterial flavodoxins support nitric oxide production by *Bacillus subtilis* nitric-oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 282:2196–2202.
- Watanabe Y., Laschat S., Budde M., Affolter O., Shimada Y., Urlacher V. B. (2007): Oxidation of acyclic monoterpenes by P450 BM-3 monooxygenase: influence of the substrate E/Z-isomerism on enzyme chemo- and regioselectivity. *Tetrahedron* 63:9413–9422.
- Weber E., Seifert A., Antonovici M., Geinitz C., Pleiss J., Urlacher V. B. (2011): Screening of a minimal enriched P450 BM3 mutant library for hydroxylation of cyclic and acyclic alkanes. *Chemical Communications* 47:944–946.
- Werck-Reichhart D., Bak S., Paquette S. (2002): Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book* 1:e0028.
- Whitehouse C. J. C., Bell S. G., Tufton H. G., Kenny R. J. P., Ogilvie L. C. I., Wong L.-L. (2008): Evolved CYP102A1 (P450_{BM3}) variants oxidise a range of non-natural substrates and offer new selectivity options. *Chemical Communications*:966–968.
- Whitehouse C. J. C., Bell S. G., Wong L.-L. (2012): P450_{BM3} (CYP102A1): connecting the dots. *Chemical Society Reviews* 41:1218–1260.
- Whitehouse C. J. C., Bell S. G., Yang W., Yorke J. A., Blanford C. F., Strong A. J. F., Morse E. J., Bartlam M., Rao Z., Wong L.-L. (2009): A highly active single-mutation variant of P450_{BM3} (CYP102A1). *ChemBioChem* 10:1654–1656.
- Wu Y., Hillwig M. L., Wang Q., Peters R. J. (2011): Parsing a multifunctional biosynthetic gene cluster from rice: biochemical characterization of CYP71Z6 & 7. *FEBS Letters* 585:3446–3451.
- Xiong Q., Wilson W. K., Matsuda S. P. T. (2006): An *Arabidopsis* oxidosqualene cyclase catalyzes iridal skeleton formation by grob fragmentation. *Angewandte Chemie* 118:1307–1310.
- Xu R., Fazio G. C., Matsuda S. P. T. (2004): On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* 65:261–291.
- Yadav V. R., Prasad S., Sung B., Gelovani J. G., Guha S., Krishnan S., Aggarwal B. B. (2012): Boswellic acid inhibits growth and metastasis of human colorectal cancer in orthotopic mouse model by downregulating inflammatory, proliferative, invasive and angiogenic biomarkers. *International Journal of Cancer* 130:2176–2184.
- Yamamoto H., Katano N., Ooi A., Inoue K. (2000): Secologanin synthase which catalyzes the oxidative cleavage of loganin into secologanin is a cytochrome P450. *Phytochemistry* 53:7–12.

-
- Yesilirmak F., Sayers Z. (2009): Heterologous expression of plant genes. *International Journal of Plant Genomics* 2009.
- Yogeeswari P., Sriram D. (2005): Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Current Medicinal Chemistry* 12:657–666.
- Zelasko S., Palaria A., Das A. (2013): Optimizations to achieve high-level expression of cytochrome P450 proteins using *Escherichia coli* expression systems. *Protein Expression and Purification* 92:77–87.
- Zhang C.-L., Wang Y., Liu Y.-F., Ni G., Liang D., Luo H., Song X.-Y., Zhang W.-Q., Chen R.-Y., Chen N.-H., Yu D.-Q. (2014): Iridal-type triterpenoids with neuroprotective activities from *Iris tectorum*. *Journal of Natural Products* 77:411–415.
- Zhang K., Shafer B. M., Demars M. D., Stern H. A., Fasan R. (2012): Controlled oxidation of remote sp³ C-H bonds in artemisinin via P450 catalysts with fine-tuned regio- and stereoselectivity. *Journal of the American Chemical Society* 134:18695–18704.

6 Anhang

6.1 GC/MS Spektren

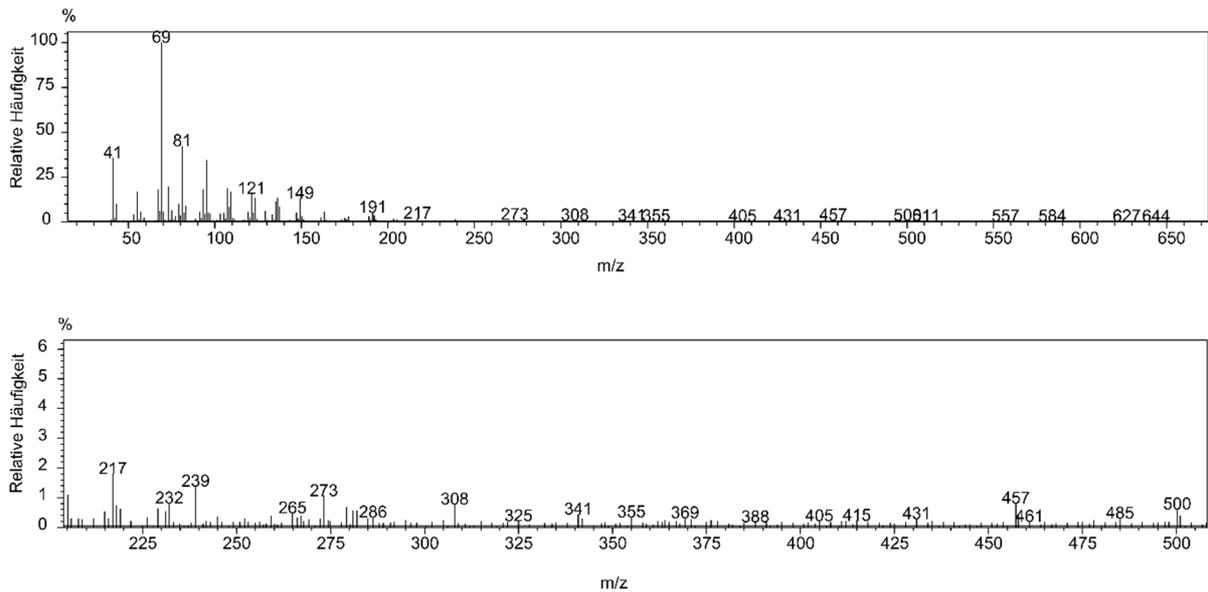


Abbildung 41. Massenspektrum von Marnerol. Die untere Abbildung zeigt die Vergrößerung des Spektrums für eine höhere m/z-Region.

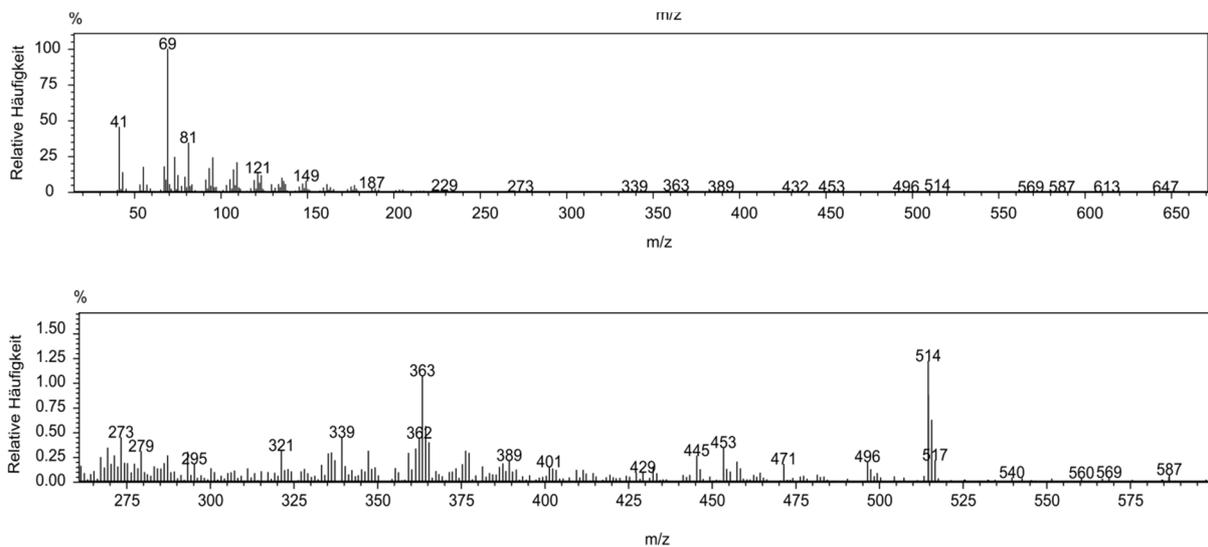


Abbildung 42. Massenspektrum des Marnerol-Überoxidationsproduktes. Die untere Abbildung zeigt die Vergrößerung des Spektrums für eine höhere m/z-Region.

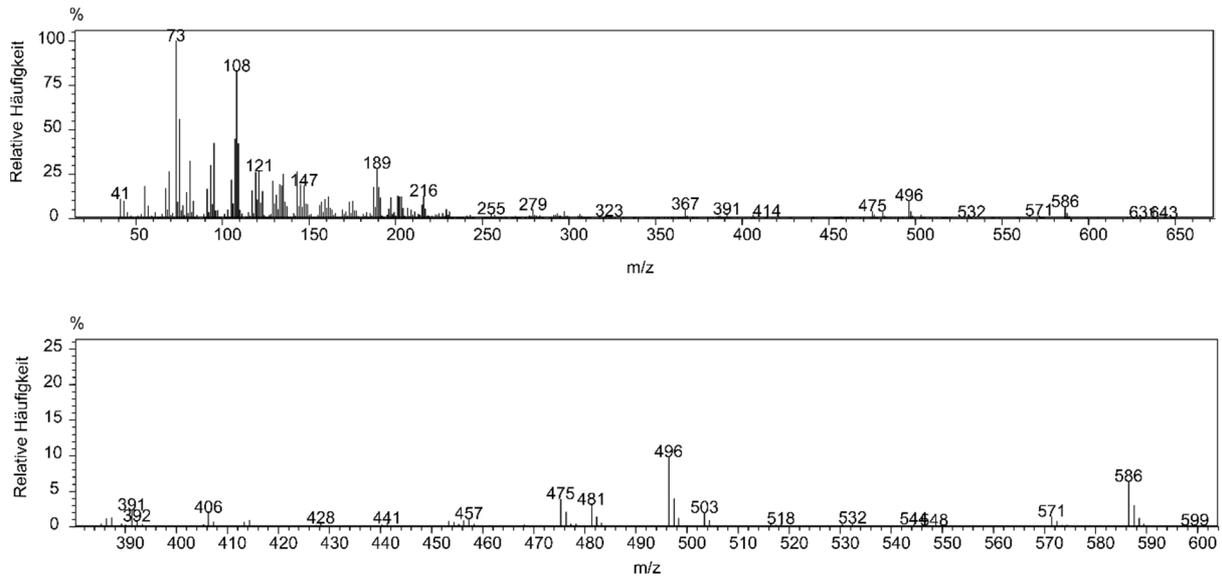


Abbildung 43. Massenspektrum des Lupeol-Oxidationsproduktes 1 (P1). Die untere Abbildung zeigt die Vergrößerung des Spektrums für eine höhere m/z-Region.

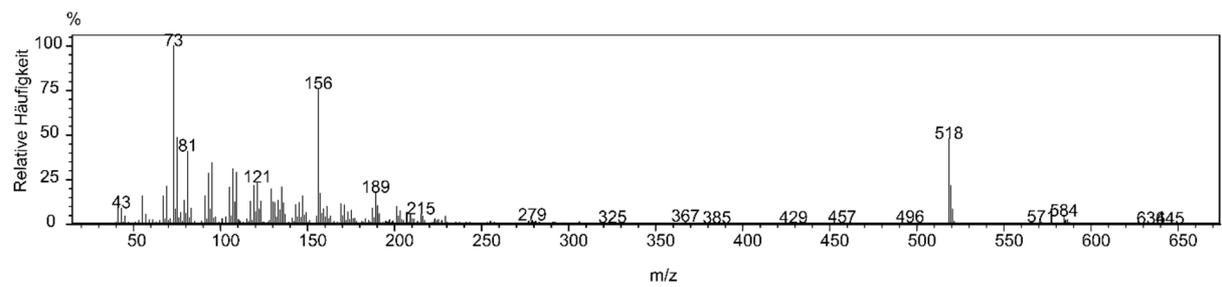


Abbildung 44. Massenspektrum des Lupeol-Oxidationsproduktes 2 (P2).

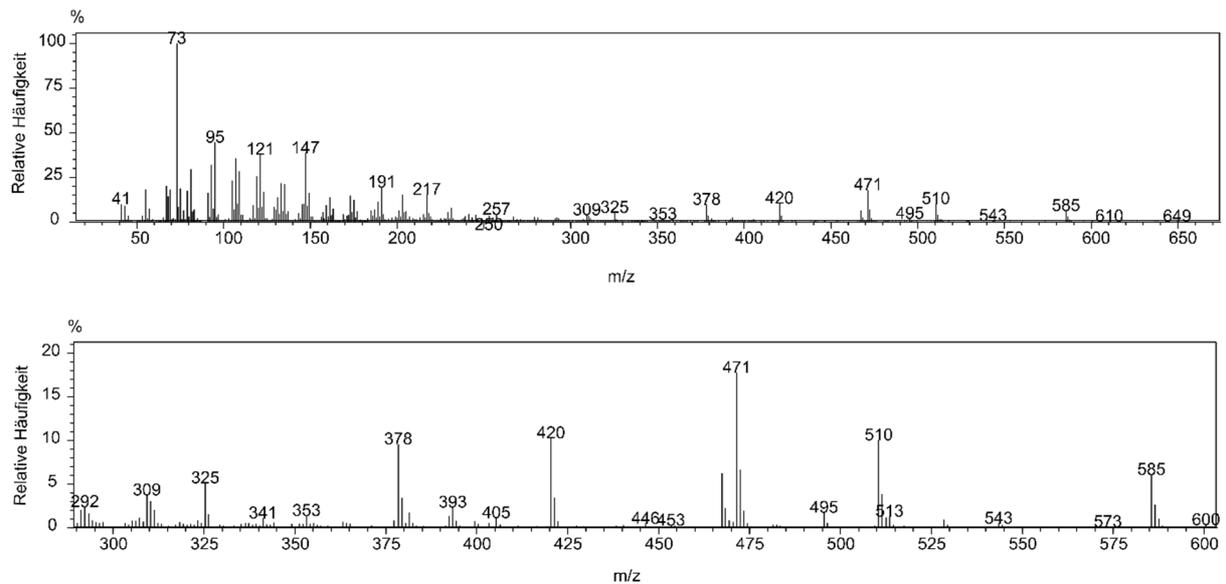


Abbildung 45. Massenspektrum des Lupeol-Oxidationsproduktes 3 (P3). Die untere Abbildung zeigt die Vergrößerung des Spektrums für eine höhere m/z-Region.

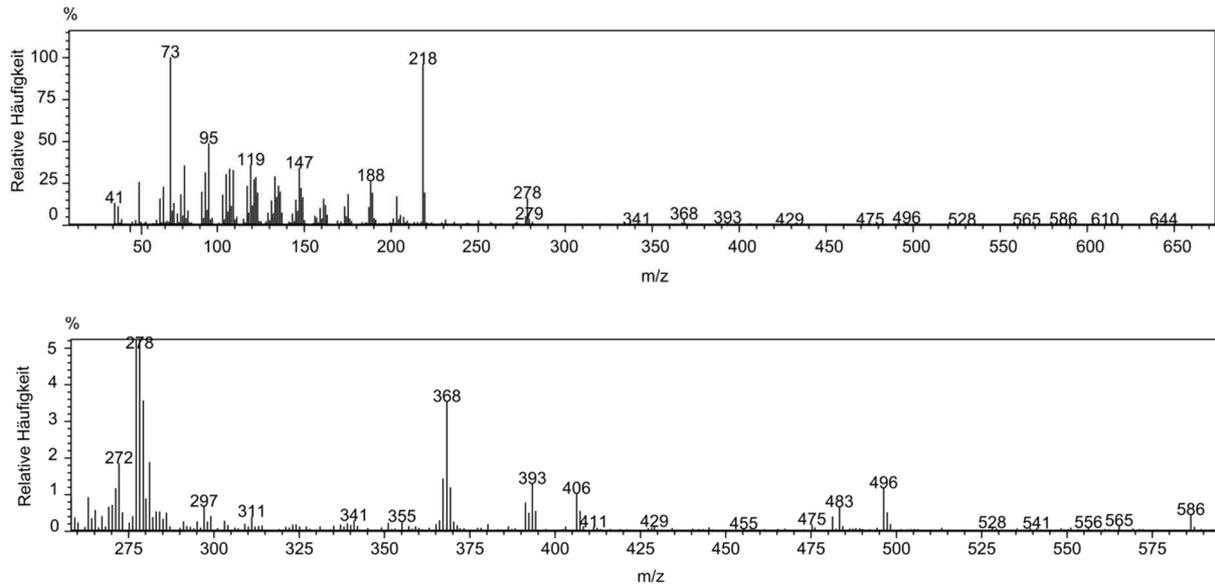


Abbildung 46. Massenspektrum des α -Amyrin-Oxidationsproduktes 1 (P1). Die untere Abbildung zeigt die Vergrößerung des Spektrums für eine höhere m/z-Region.

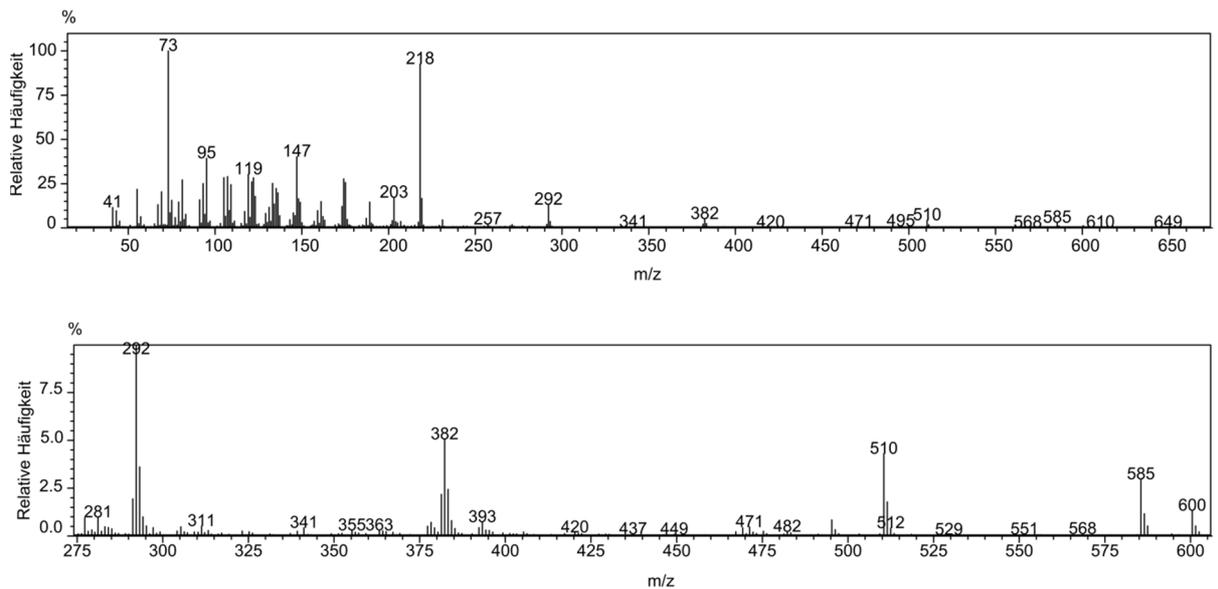


Abbildung 47. Massenspektrum des α -Amyrin-Oxidationsproduktes 2 (P2). Die untere Abbildung zeigt die Vergrößerung des Spektrums für eine höhere m/z-Region.

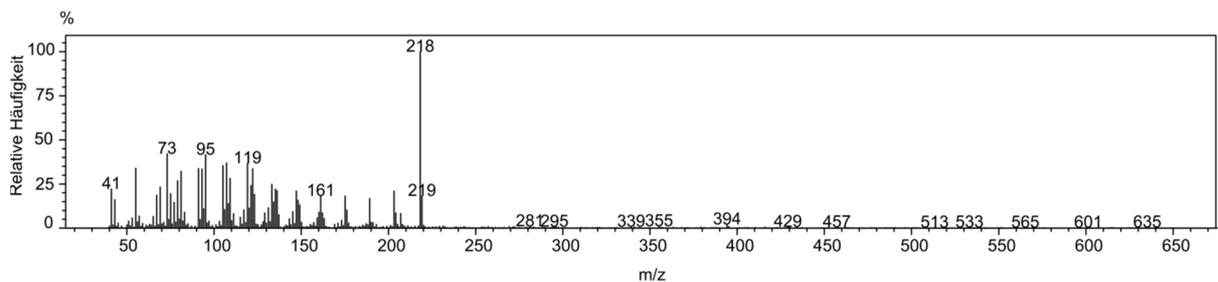


Abbildung 48. Massenspektrum des α -Amyrin-Oxidationsproduktes 3 (P3).

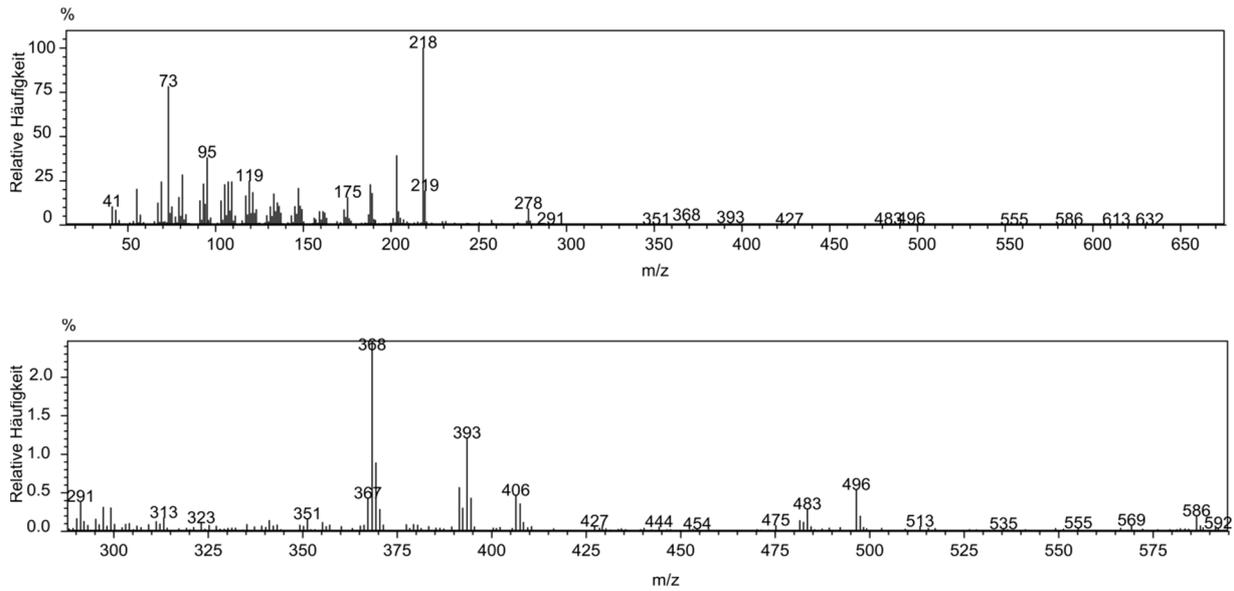


Abbildung 49. Massenspektrum des β -Amyrin-Oxidationsproduktes 1 (P1). Die untere Abbildung zeigt die Vergrößerung des Spektrums für eine höhere m/z-Region.

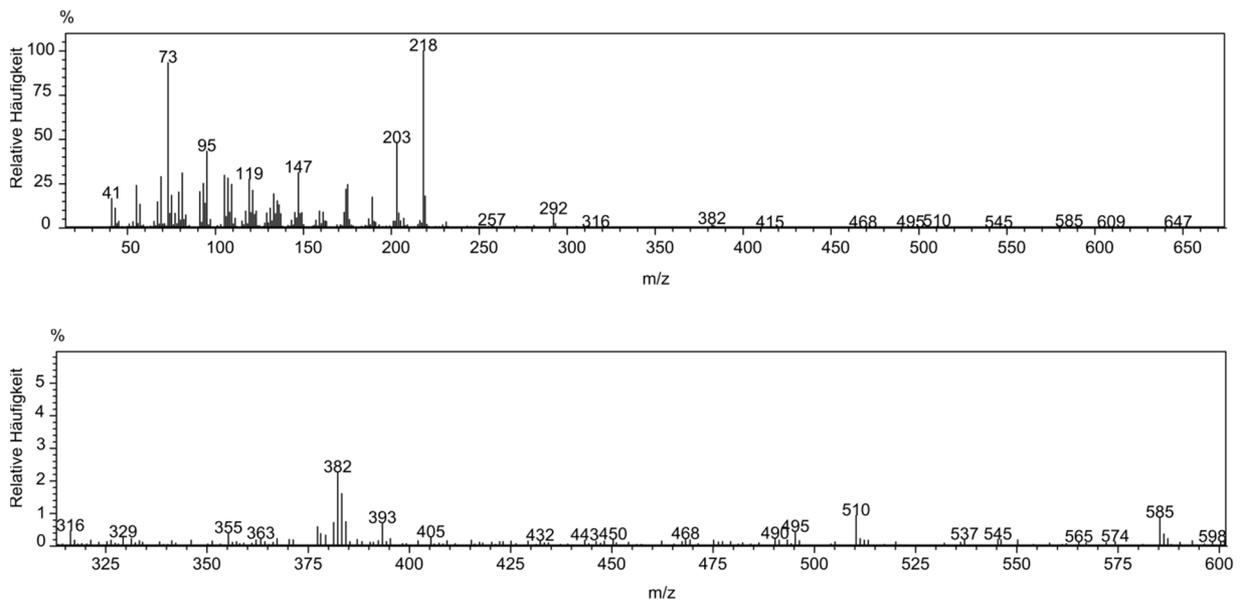


Abbildung 50. Massenspektrum des β -Amyrin-Oxidationsproduktes 2 (P2). Die untere Abbildung zeigt die Vergrößerung des Spektrums für eine höhere m/z-Region.

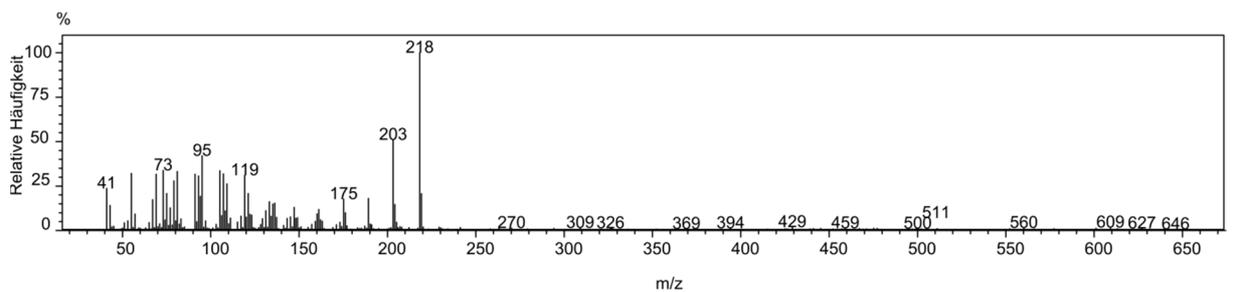


Abbildung 51. Massenspektrum des β -Amyrin-Oxidationsproduktes 3 (P3).

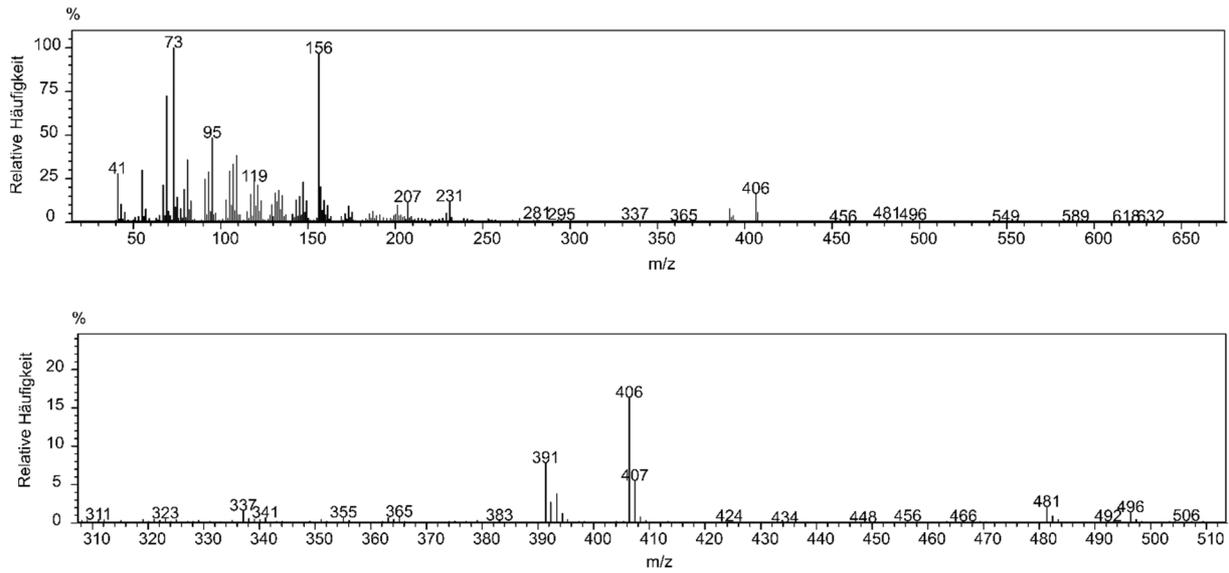


Abbildung 52. Massenspektrum des Cycloartenol-Oxidationsproduktes 1 (P1). Die untere Abbildung zeigt die Vergrößerung des Spektrums für eine höhere m/z-Region.

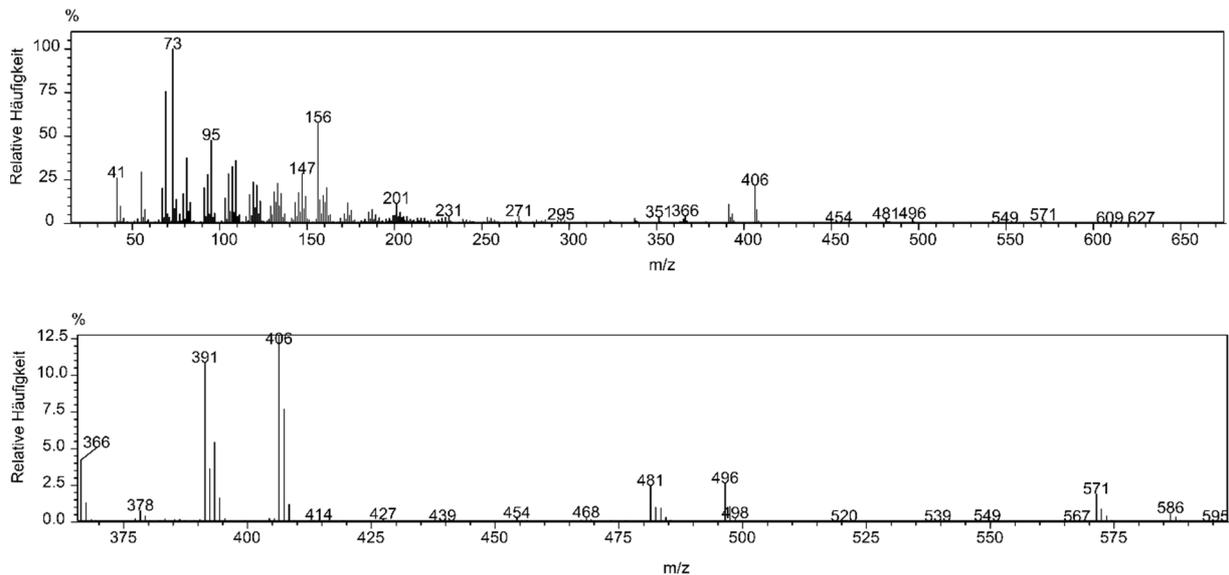


Abbildung 53. Massenspektrum des Cycloartenol-Oxidationsproduktes 2 (P2). Die untere Abbildung zeigt die Vergrößerung des Spektrums für eine höhere m/z-Region.

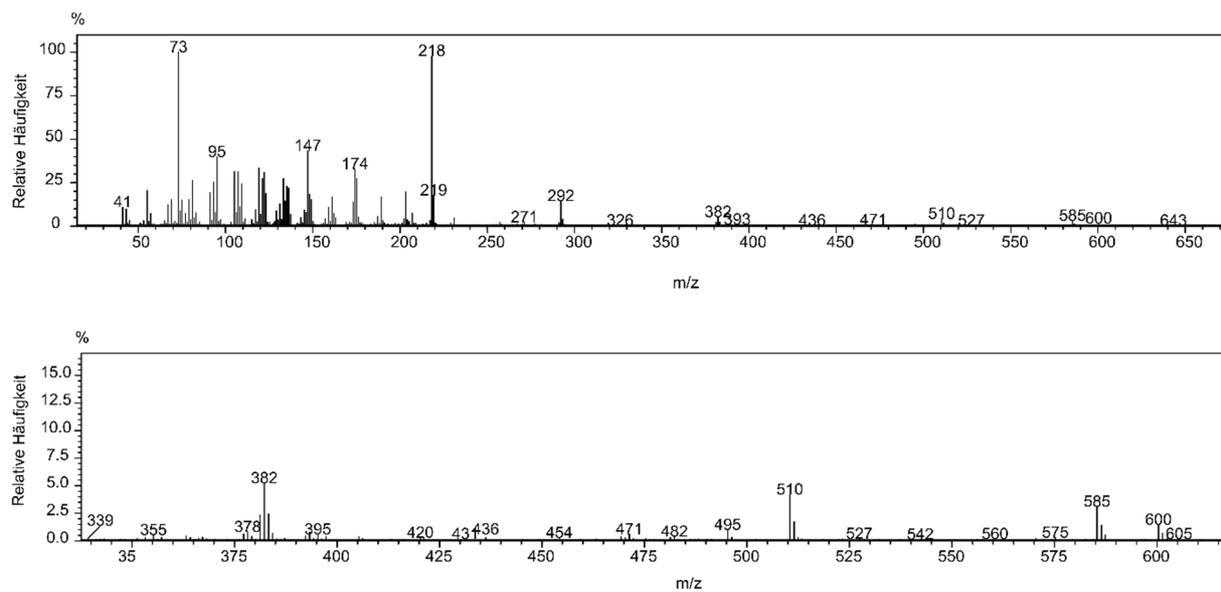
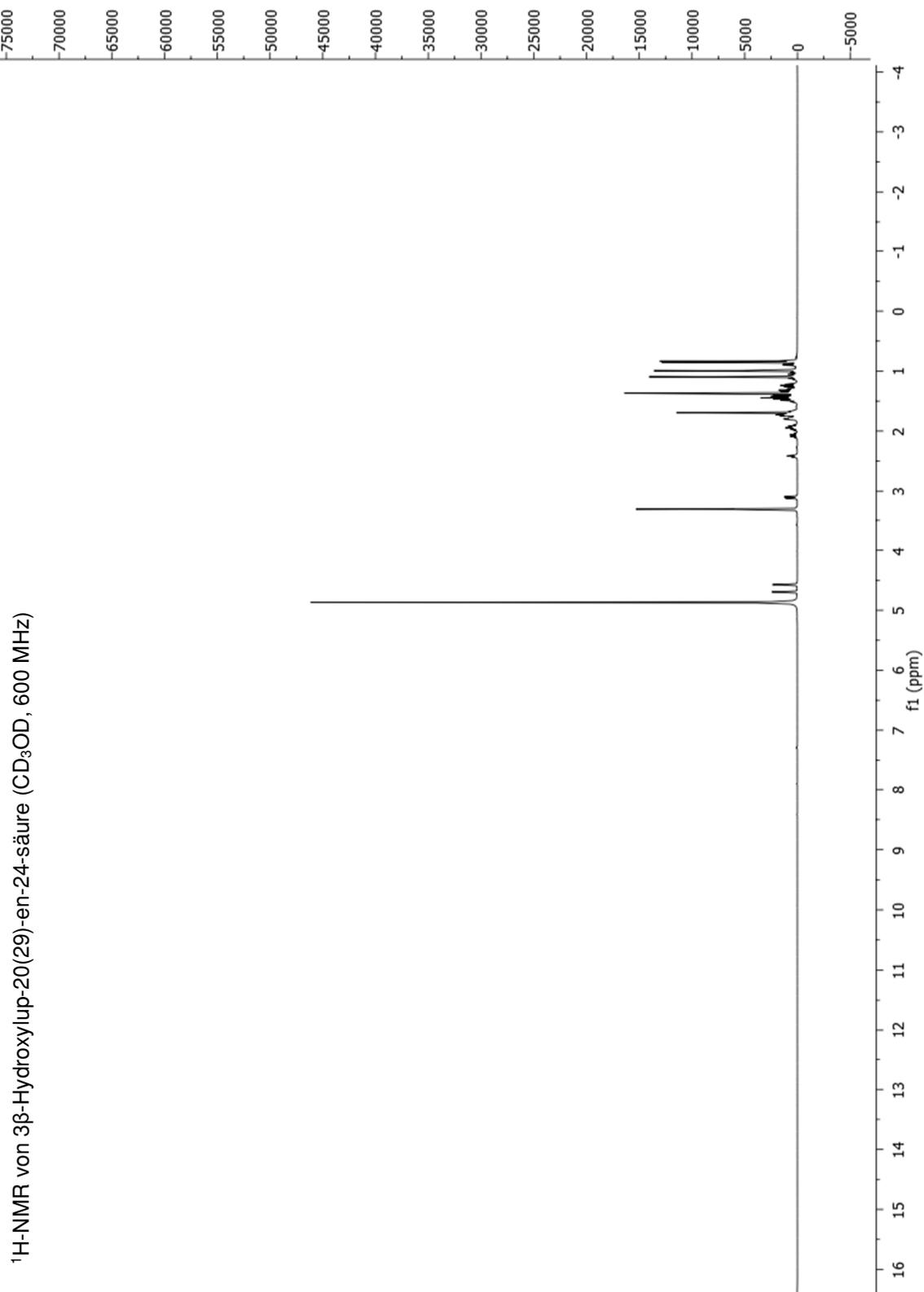
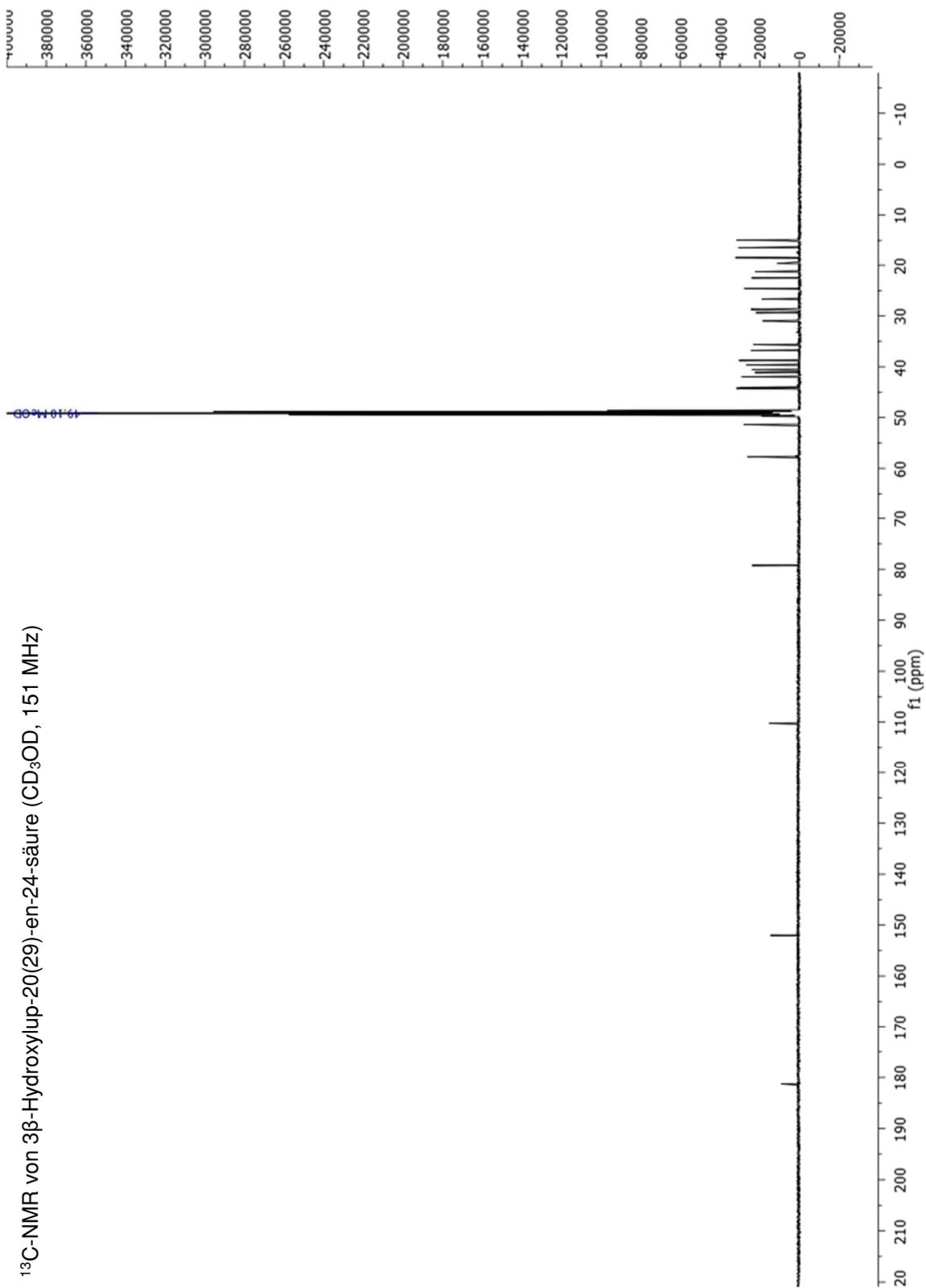
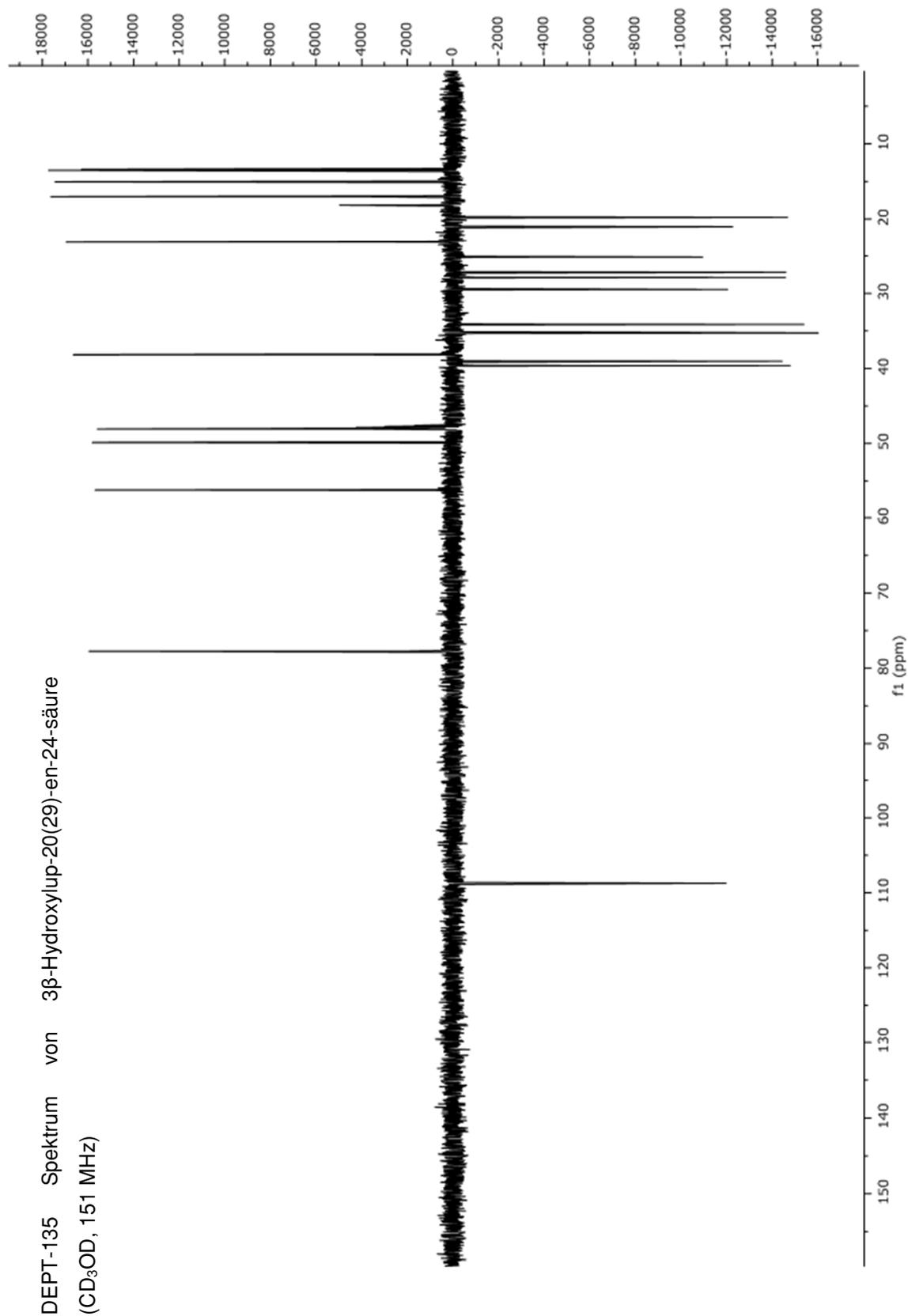


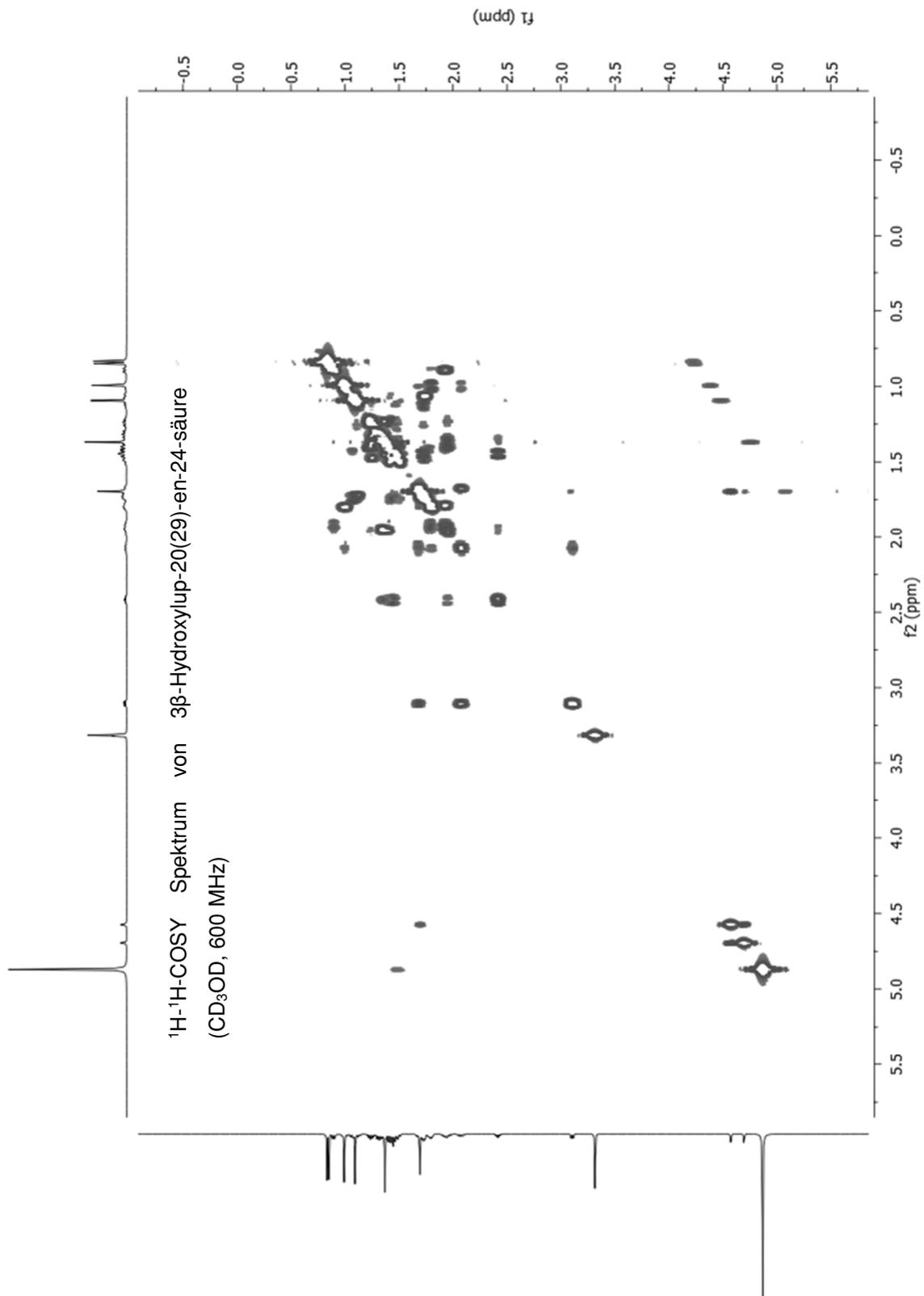
Abbildung 54. Massenspektrum des Cycloartenol-Oxidationsproduktes 3 (P3). Die untere Abbildung zeigt die Vergrößerung des Spektrums für eine höhere m/z-Region.

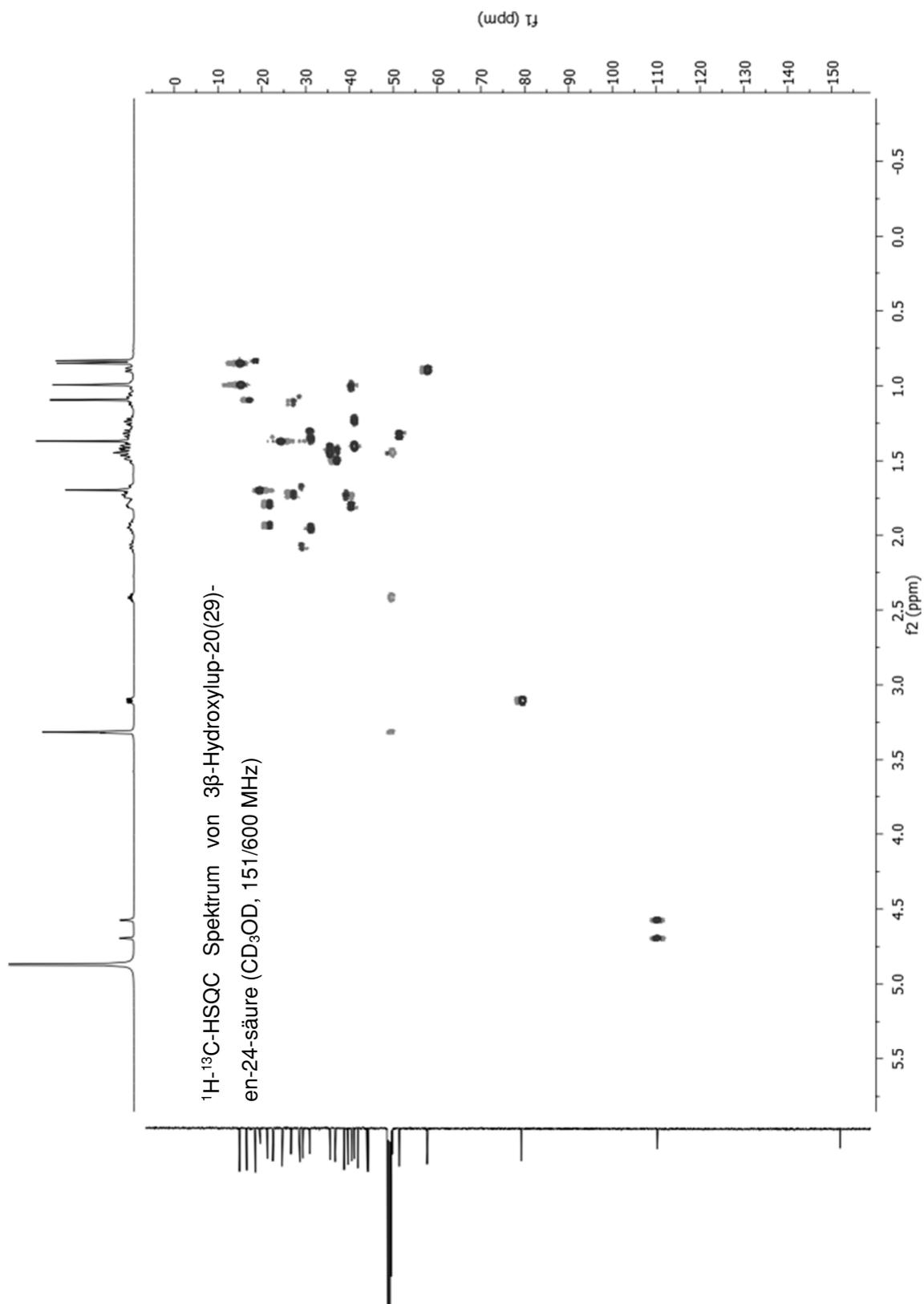
6.2 NMR-Analyse

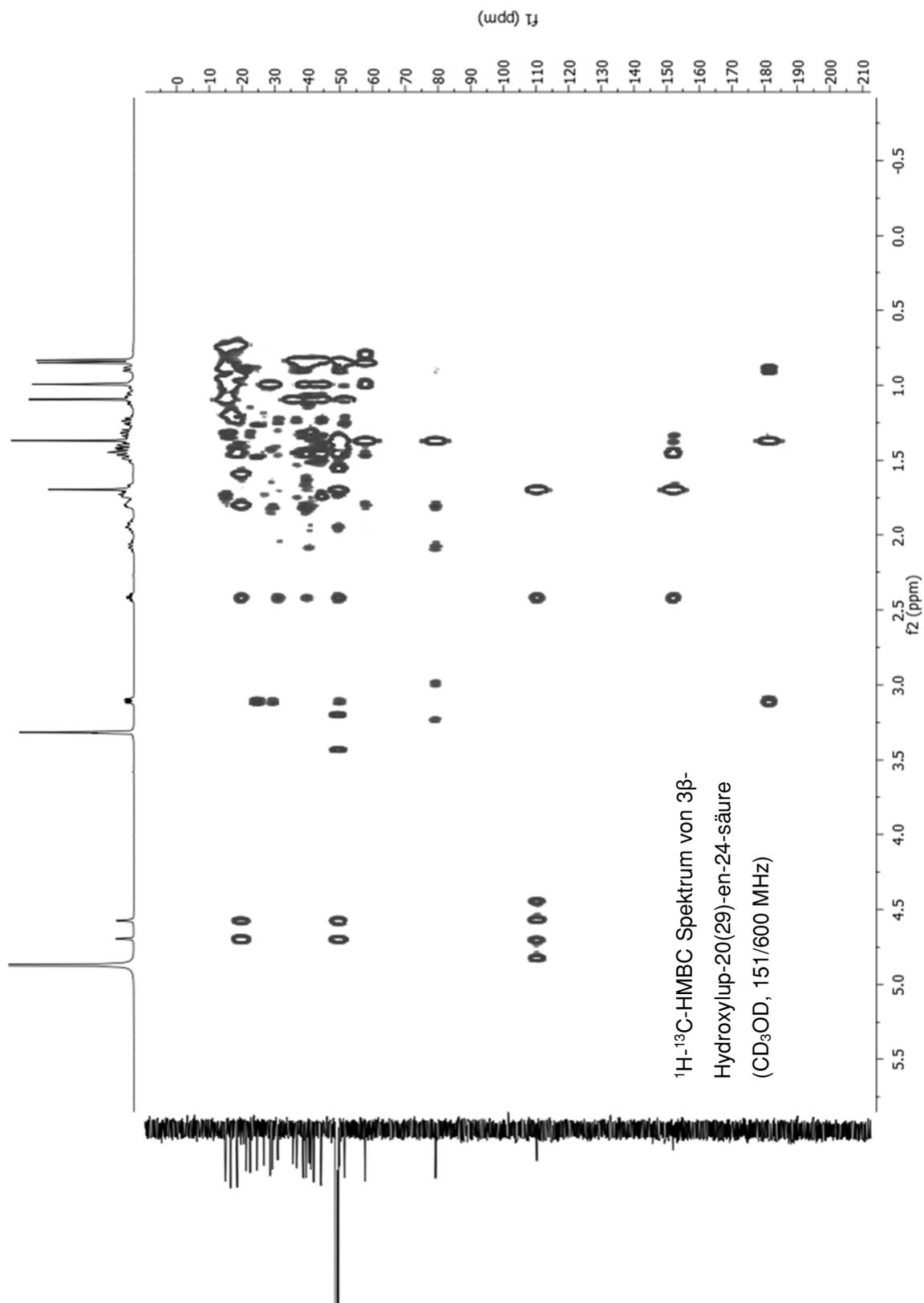
Abbildung 55. $^1\text{H-NMR}$ von 3 β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure in CD_3OD .

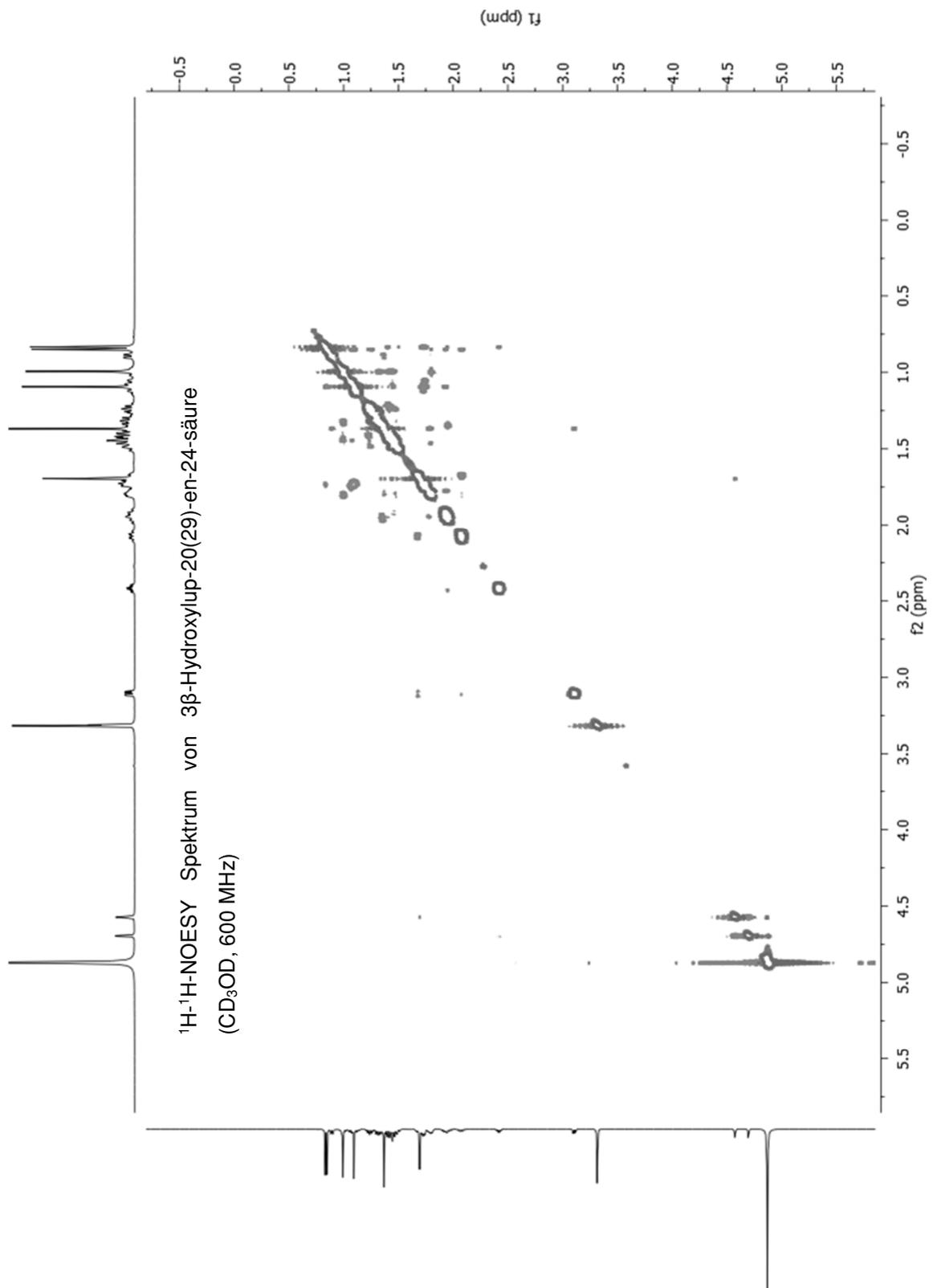
Abbildung 56. ^{13}C -NMR von 3 β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure in CD_3OD .

Abbildung 57. DEPT-135 Spektrum von 3 β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure in CD₃OD.

Abbildung 58. ^1H - ^1H -COSY Spektrum von 3β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure in CD_3OD .

Abbildung 59. ^1H - ^{13}C -HSQC Spektrum von 3 β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure in CD_3OD .

Abbildung 60. ^1H - ^{13}C -HMBC Spektrum von 3β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure in CD_3OD .

Abbildung 61. ^1H - ^1H -NOESY Spektrum von 3β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure in CD_3OD .

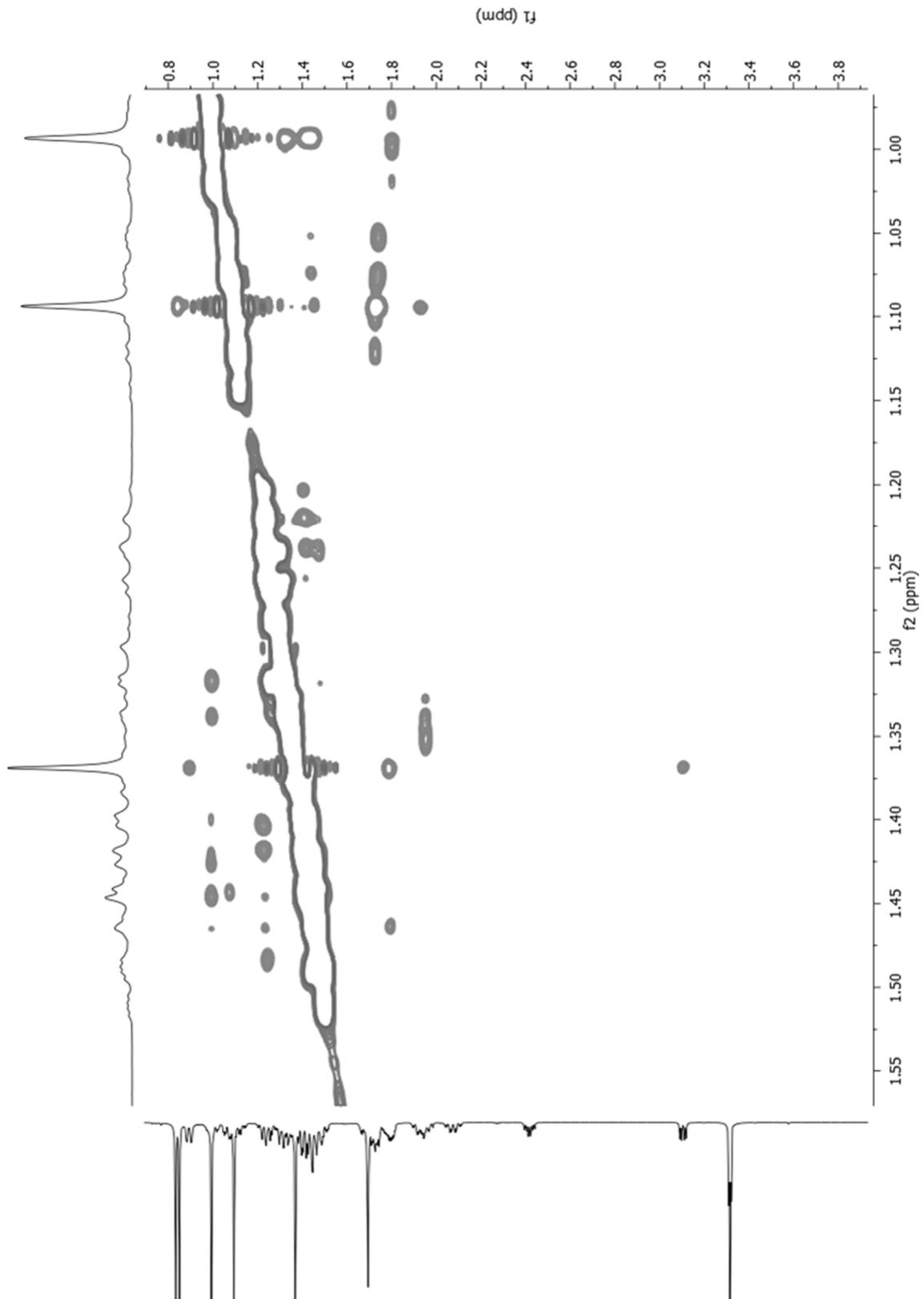


Abbildung 62. Vergrößerung des ^1H - ^1H -NOESY Spektrums von 3β -Hydroxylup-20(29)-en-24-säure in CD_3OD .

Tabelle 24. Durch NMR-Analysen zugeordnete C- und H-Atome des P3, das aus der Oxidation von Lupeol durch CYP102A1 V78G F87A I263G hervorgegangen ist.

Position	C	H
2	29,36	2,08; 1,67
3	79,25	3,11
4	49,76	
5	57,70	0,89
9	51,36	1,33
10	38,77	
19	49,48	2,42
20	152,01	
21	30,98	1,94; 1,34
23	24,61	1,37 (s)
24	181,28	
25	14,89	0,85 (s)
26	16,55	1,09 (s)
29	110,24	4,57; 4,70
30	19,66	1,69