Entwicklung einer enzymatischen Kaskade für die Synthese von Strictosidin *in vitro*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Christopher Weber
aus Bonn

Düsseldorf, September 2021

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. Jörg Pietruszka

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Mai 2022

Inhaltsverzeichnis

Abstract *1*

Kurzzusammenfassung *2*

1 Einleitung *3*

1.1 Biokatalyse 3

1.2 Kaskaden 5

1.3 Alkaloide und Indolalkaloide 9

1.4 Biosynthese von Strictosidin in *Catharanthus roseus* 12

1.4.1 Loganinsäure O-Methyltransferase 15

1.4.2 Secologanin-Synthase 16

1.4.3 Strictosidin-Synthase 17

1.5 Cytochrom-P450-Monooxygenasen 19

1.5.1 Eigenschaften Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus Pflanzen 20

1.5.2 Heterologe Expression von Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus Pflanzen 22

1.5.3 Katalysezyklus und Struktur von P450 23

1.5.4 Redoxpartner 28

1.6 Ziel der Arbeit 31

2 Ergebnisse *32*

2.1 Herstellung der P450 des späten Seco-Iridoid-Pfads in *E. coli* 32

2.1.1 Analyse der N-terminalen Sequenz der CYP72A1, CYP72A224 und CYP76A26 32

2.1.2 Heterologe Produktion der CYP72A1 aus *C. roseus* in *E. coli* als Fusionsprotein mit einer CPR aus *C. roseus* 35

2.1.3 Heterologe Produktion der CYP72A1 aus *C. roseus* durch Modifikation der Aminosäuresequenz am N-Terminus 37

2.1.4 Heterologe Produktion der 7-Deoxyloganinsäure-7-Hydroxylase (CYP72A224, U5NE19) aus *C. roseus* in *E. coli* 42

2.1.5 Heterologe Produktion der Iridoid Oxidase (CYP76A26, W8JIS5) aus *C. roseus* in *E. coli* 44

2.1.6 Heterologe Produktion Hexahistidin-markierter K_CYP72A1 in *E. coli* C43(DE3) und Reinigung 46

2.1.7 Einfluss von Detergenzien auf eine Reinigung der K_CYP72A1_C6His 49

2.1.8 Herstellung der Secologanin-Synthase in *E. coli* als Fusionsprotein mit Apolipoprotein I und Maltose Binding Protein 52

2.1.9 Einfluss der Ammoniumsulfat-Konzentration auf die Löslichkeit der K_CYP72A1 55

2.2 Biochemische Charakterisierung der K_CYP72A1 58

2.2.1 Rekonstitution der Aktivität der K_CYP72A1 58

2.2.2 Optimierung des Verhältnisses von K_CYP72A1, YkuN und FpR 61
2.2.3 Zusammenhang zwischen der Absorptionsdifferenz bei 450 nm und der katalytischen Aktivität der K_CYP72A1 zur Umwandlung von Loganin 63
2.2.4 Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 64
2.2.5 Einfluss von Loganin und Secologanin auf die Produktkonzentration bei der Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 67
2.2.6 Stabilität der K_CYP72A1 während der Umsetzung von Loganin 68
2.2.7 Einfluss des pH-Wertes auf die Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 70
2.2.8 Einfluss der K_CYP72A1-Konzentration auf die Umsetzung von Loganin 71
2.2.9 Kinetische Parameter der K_CYP72A1 73
2.2.10 Kopplungseffizienz mit nicht-physiologischen RP 74
2.3 Entwicklung und Optimierung einer Kaskadenreaktion zur biokatalytischen Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin 75
2.3.1 Etablierung Kaskadenreaktion zur Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin 75
2.3.2 Einfluss der Loganinsäure und LAMT-Konzentration auf die Synthese von Loganin 77
2.3.3 Einfluss der Secologanin und STR-Konzentration auf die Synthese von Strictosidin 79
2.3.4 Einfluss der LAMT-Konzentration auf die Kaskade 80
2.3.5 Einfluss der STR-Konzentration auf die mehrstufige Synthese von Strictosidin 81
2.3.6 Biokatalytische Synthese von Strictosidin 82
2.3.7 Optimierung der Reaktionsbedingungen der Kaskade 85
2.3.8 Mehrstufige Synthese von Strictosidin unter optimierten Bedingungen 88
3 Diskussion 90
3.1 Herstellung der P450 des späten Seco-Iridoid-Pfads in *E. coli* 90
3.2 Biochemische Charakterisierung der K_CYP72A1 95
3.3 Kaskade zur biokatalytischen Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin 101
4 Schlussfolgerung und Ausblick 107
5 Materialien 109
5.1 Puffer und Lösungen 109
5.2 Antibiotika und Nährmedien 112
5.2.1 Antibiotika 112
5.2.2 Nährmedien 112
5.3 Verwendete Enzyme, Kits und Geräte 113
5.3.1 Kits, Säulen und Zubehör 114
5.3.2 Verwendete Geräte und Apparaturen 114
5.4 Verwendete Plasmide, Primer und Stämme 115

5.4.1 Plasmide ... 115
5.4.2 Primer ... 117
5.4.3 Stämme ... 120

6 Methoden ... 121

6.1 Molekularbiologische Methoden ... 121
6.1.1 Auftrennung, Isolierung und Quantifizierung von DNA mittels Agarosegelektrophorese ... 121
6.1.2 Isolierung plasmidischer DNA mittels alkalischer Lyse ... 121
6.1.3 Polymerase-Kettenreaktion ... 121
6.1.4 Restriktionsverdau von DNA-Strängen mittels Restriktionsendonukleasen ... 122
6.1.5 Ligation von Nukleinsäuren ... 122
6.1.6 Ortsgerichtete Mutagenese ... 123
6.1.7 Isothermale Verknüpfung von DNA-Fragmenten mittels *Gibson Assembly®* ... 124
6.1.8 Sanger Sequenzierung ... 124
6.1.9 Konstruktion der rekombinanten Plasmide zur Herstellung der *C. roseus* CYP72A1, CYP72A224, LAMT und *R. serpentina* STR in *E. coli* ... 124

6.2 Mikrobiologische Methoden ... 126
6.2.1 Stammhaltung ... 126
6.2.2 Anzuchtkulturen ... 126
6.2.3 Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen ... 126
6.2.4 Transformation mittels Hitzeschock ... 127
6.2.5 Bestimmung der Optischen Dichte bei 600 nm ... 127
6.2.6 Zellernte ... 127
6.2.7 Zellhomogenisierung und Gewinnung von löslichem Zellextrakt ... 127
6.2.8 Heterologe Genexpression in *E. coli* ... 129
6.2.8.1 CYP72A1-CPR Fusion 17A1d25CYP72A1_ GST_d72CPR ... 129
6.2.8.2 CYP72A1-Varianten mit N-terminalen Modifikationen ... 130
6.2.8.3 K_CYP72A1, K_CYP72A1_C6His und K_CYP72A1_hiC6His ... 130
6.2.8.4 MBP-CYP72A1-ApoA1*-Fusionen ... 130
6.2.8.5 CYP76A26 ... 131
6.2.8.6 CYP72A224 ... 131
6.2.8.7 LAMT und STR ... 132
6.2.8.8 YkuN, FpR, ATR2 und YR-P5 ... 132

6.3 Proteinbiochemische Methoden ... 132
6.3.1 Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration. ... 132
6.3.2 SDS-PAGE ... 133
6.3.3 Western Blot und Immunodetektion ... 133
6.3.4 Reinigung von Proteinen ... 134

6.3.5 Reinigung von Proteinen im *Batch*-Verfahren ... 135
6.3.6 Konzentrationsbestimmung von LAMT und STR ... 135
6.3.7 Konzentrationsbestimmung von Cytochrom-P450-Monooxygenasen ... 136
6.3.8 Konzentrationsbestimmung von ATR2, YkuN und FpR ... 137
6.3.9 Einfluss der Ammoniumsulfat-Konzentration auf die Löslichkeit der K_CYP72A1 ... 137
6.4 Analytische Methoden ... 137
6.4.1 Derivatisierung von Secologanin mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin ... 137
6.4.2 Festphasenextraktion mit StageTips ... 138
6.4.3 Probenvorbereitung durch Gefriertrocknung ... 138
6.4.4 LC/MS-Analyse ... 139
6.4.5 Quantifizierung von Loganinsäure, Secologanin, Loganin und Strictosidin ... 139
6.5 *In vitro* Umsetzungen ... 140
6.5.1 Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 ... 140
6.5.2 Mehrstufige Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin ... 142
6.5.3 Umsetzungen von Loganinsäure mit LAMT ... 143
6.5.4 Umsetzungen von Secologanin durch STR ... 143
6.5.5 Biokatalytische Synthese von Strictosidin ... 144
7 Literaturverzeichnis ... 145
8 Anhang ... 175
8.1 Abkürzungsverzeichnis ... 175
8.2 Zusätzliche Informationen ... 177
9 Erklärungen zur Dissertation ... 182
10 Danksagungen ... 183

Abstract

Terpenoid indole alkaloids (TIA) are plant secondary metabolites with a high pharmacological relevance due to the large variety of substances and structures, but also because of their often interesting or even unique pharmacological properties. A special characteristic during the biosynthesis of almost all known terpenoid indole alkaloids is the role of strictosidine as a universal precursor. However, from a biocatalytic perspective, few details are known about the interaction of the enzymes that catalyse the steps immediately before strictosidine is generated. In particular, CYP72A1 from *Catharanthus roseus,* which catalyses an unusual opening of the loganin five-membered ring, has not been biochemically characterised so far. A main reason is the fact that plant cytochromes P450 and their redox partners are transmembrane proteins and therefore handling and heterologous production in an active and soluble state can be challenging. CYP72A1 is of special relevance as it is a potential bottleneck for the TIA-biosynthesis and the last P450 before TIA-biosynthesis is initiated by the deglycosylation of strictosidine. In the steps following strictosidine, TIA-biosynthesis diverges into different reaction branches and vast structural diversity is introduced.

In the present work, a part of the strictosidine biosynthesis from *C. roseus* starting from loganic acid was reconstituted *in vitro*. CYP72A1 was expressed in *Escherichia coli* after protein engineering of the membrane bound N-terminal region. Compatible redox partners, the flavodoxin YkuN from *Bacillus subtilis* and the flavodoxin reductase FpR from *E. coli*, were identified and the catalytic activity towards loganin was reconstituted *in vitro*. The P450 was subjected to biochemical characterization.

From the catalytic activity of loganic acid O-methyltransferase, CYP72A1, strictosidine synthase and three additional enzymes an *in vitro* cascade was established for the conversion of loganic acid to strictosidine. Various reaction parameters were screened to optimize the yield of the reaction sequence. It was demonstrated that the activity of CYP72A1 is an important limiting factor for the strictosidine yield from this sequence of reactions.

The presented work and the resulting findings offer a significant contribution for future work on the biocatalytical synthesis of TIA. The cascade can be utilized as a tool to research and optimize existing strictosidine syntheses and to develop alternative or new synthetic routes.

Kurzzusammenfassung

Terpenindolalkaloide (TIA) sind pflanzliche Sekundärmetaboliten, die aufgrund ihrer ausgesprochen hohen Substanz- und Strukturvielfalt und durch ihre nicht selten interessanten oder gar einzigartigen Wirkungseigenschaften große phamakologische Relevanz besitzen. Eine Besonderheit bei der Biosynthese fast aller bekannten TIA ist die Rolle von Strictosidin als universelle Vorstufe.

Aus biokatalytischer Sicht sind nur wenige Details über die Interaktion der Enzyme bekannt, welche die Schritte unmittelbar vor Strictosidin katalysieren. Insbesondere CYP72A1 aus *Catharanthus roseus,* die eine ungewöhnliche Öffnung des Loganin-Fünfrings katalysiert, wurde bisher nicht biochemisch charakterisiert. Das liegt vorwiegend daran, dass pflanzliche Cytochrom-P450-Monooxygenasen (P450) und ihre Redoxpartner (RP) Transmembranproteine sind. Dadurch stellt eine heterologe Produktion der Enzyme in einer aktiven und löslichen Form – neben der Handhabung – eine Herausforderung dar.

Auch aufgrund der Schlüsselstellung der CYP72A1 ist eine biokatalytische Charakterisierung der P450 von besonderer Relevanz. Die katalysierte Umwandlung von Loganin ist ein wahrscheinlicher Engpass (*Bottleneck*) der TIA-Biosynthese und CYP72A1 ist die letzte P450, bevor die TIA-Biosynthese durch Deglycosylierung von Strictosidin in verschiedene Reaktionszweige divergiert und dabei eine außerordentlich große Strukturvielfalt erzeugt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die CYP72A1 durch *Protein-Engineering* in *Escherichia coli* in löslicher Form hergestellt und isoliert. Anschließend wurden kompatible RP identifiziert und die katalytische Aktivität gegenüber Loganin *in vitro* rekonstituiert. CYP72A1 wurde mit bakteriellen RP, einem Flavodoxin YkuN aus *Bacillus subtilis* und einer Flavoxodin-Reduktase FpR aus *E. coli*, einer biochemischen Charakterisierung unterzogen.

Aus der katalytischen Aktivität der LAMT, CYP72A1, STR und drei weiteren Enzymen wurde eine *in vitro* Kaskade zur Umwandlung von Loganinsäure zu Strictosidin etabliert. Es wurden verschiedene Reaktionsparameter einer Durchmusterung unterzogen, um die Ausbeute der Reaktionsfolge zu optimieren. Im Zuge dieser Untersuchung wurde demonstriert, dass die Aktivität der CYP72A1 ein wichtiger limitierender Faktor für die Strictosidin-Ausbeute aus der Reaktionsfolge ist.

Die vorliegende Arbeit und die resultierenden Erkenntnisse leisten einen wichtigen Beitrag für zukünftige Arbeiten an der pharmakologisch relevanten biokatalytischen Synthese von TIA. Die etablierte Kaskade bietet ein wertvolles Werkzeug zur Erforschung und Optimierung biokatalytischer TIA-Synthesen und kann als Basis zur Erschließung alternativer Syntheserouten herangezogen werden.

1 Einleitung

Das Funktionieren unserer Gesellschaft und unsere Lebensqualität sind eng mit der medizinischen Versorgung verknüpft. Naturstoffe und ihre Derivate sind aufgrund einer großen Zahl essenzieller aber auch jedes Jahr neu zugelassener Wirkstoffe ein wichtiger Eckpfeiler des pharmakologischen Repertoires.[1–4]

Terpenindolalkaloide (TIA) nehmen unter den Naturstoffen eine Sonderstellung ein, die durch ihre nicht selten interessanten oder gar einzigartigen pharmakologischen Wirkungseigenschaften gerechtfertigt ist. Aufgrund der häufig komplexen chemischen Struktur wird zur Gewinnung eine Extraktion aus Pflanzenmaterial oft bereits aus ökonomischen Gründen gegenüber einer chemischen Synthese bevorzugt.[5,6] Daraus ergibt sich eine Abhängigkeit der Versorgung von potenziellen Unsicherheiten wie der ökologischen Integrität des Lebensraums, geopolitischen Faktoren und dem Klimawandel. Alternative Methoden zur Gewinnung sind deshalb von großer gesellschaftlicher Bedeutung. Diese genannten Gründe machen TIA zu einem attraktiven Ziel für die Biokatalyse.

1.1 Biokatalyse

Enzyme spielen in allen biochemischen Prozessen in der Natur, sowohl in Flora als auch Fauna, eine essenzielle Rolle. Die äußerst effizienten Biokatalysatoren tragen in der Natur zu Abläufen wie Katabolismus, Anabolismus, Abwehr und Fortpflanzung bei. Biokatalysatoren sind nicht nur bei der Aufrechterhaltung biologischer Prozesse für den Menschen elementar, sondern sie sind seit der Antike Bestandteil unserer Kultur. Ihre Rolle bei Prozessen der Lebensmittelherstellung wie beispielsweise beim Brauen oder bei der Käserei hebt ihre historische Bedeutung hervor.[7] Biokatalysatoren finden in der Industrie beispielsweise bei der Synthese von Pharmazeutika zunehmend Anwendung und ihnen wird hier besonders großes Potential beigemessen.[8,9]

Viele industrielle Prozesse basieren auf nichterneuerbaren Ressourcen, deren Gewinnung auf umweltschädlichen Abbauprozessen beruht.[10] Weiterhin benötigen industrielle Synthesen häufig extreme Reaktionsbedingungen, toxische Chemikalien und besitzen eine geringe Atomökonomie.[10–12] Bewertet man die Effizienz einer Reaktion nicht nur unter dem Gesichtspunkt der Produktausbeute sondern mit Blick auf den ökologischen Fußabdruck (z. B.: Bildung von Abfall, Energiebedarf, CO_2-Ausstoß) und die Nachhaltigkeit (Nutzung fossiler Rohstoffe), können viele klassische industrielle Synthesen als ineffizient betrachtet werden.[13] Die Biokatalyse bietet zahlreiche Lösungsansätze, um bestehende und neue Prozesse unter dem Konzept der *Green Chemistry*[14] nachhaltiger zu gestalten. Die ökologischen Vorteile beginnen

bereits bei der Herstellung der Katalysatoren. Biokatalysatoren werden häufig durch Fermentation von Mikroorganismen hergestellt und sind deshalb sowohl biologisch abbaubar als auch erneuerbar. Bei der Produktion von Metallkatalysatoren werden im Vergleich dazu, erschöpfliche Rohstoffe abgebaut und teilweise besonders energieintensive Darstellungsverfahren wie die Schmelzflusselektrolyse angewendet.[15] Wegen einer Vielzahl ökologischer Vorteile, die im Folgenden näher erläutert werden, haben Biokatalysatoren Einzug in verschiedene Bereiche der Industrie Einzug gehalten; wie in die Waschmittelindustrie, Lebensmittel und Futterindustrie, Textil und Papierindustrie, Pharmaindustrie und bei der Synthese von Feinchemikalien und Biokraftstoffen.[8,16–20]

Bei der chemischen Synthese kann die neuste Generation der Biokatalysatoren – Enzyme mit gezielt angepassten Eigenschaften – als Alternative zu klassischen organischen oder metallorganischen Katalysatoren dienen.[21] Klassische Katalysatoren können durch den Einsatz von Enzymen ersetzt und die betroffenen Prozesse durch Verbesserung der Ausbeute bei gleichzeitiger Verringerung von Abfallprodukten umweltverträglicher gestaltet werden.[22,23] Nichterneuerbare Kohlenwasserstoffe aus der Petroindustrie können als Rohstoff durch biosynthetisch gewonnene Synthesebausteine ersetzt werden.[24] So können durch Verwendung von Biokatalysatoren toxische Chemikalien[25,18,26] vermieden werden, oder die Reaktionen unter milden[27], energiesparenderen[28,29] Bedingungen durchgeführt werden. Biokatalysatoren besitzen nicht nur aus ökologischer Sicht großes Potential, sondern ihre Stereo-, Regio- und Enantioselektivität ist ein weiteres Alleinstellungsmerkmal.[19,30,31] Enzyme können Reaktionspfade ermöglichen, für die es innerhalb der klassischen organischen Chemie noch keine vergleichbaren Lösungen gibt.[32] Weiterhin können durch Einsparung von Schützungs-, Entzschützungs- und Reinigungschritten Prozesse ökologischer gestaltet werden.[33–35] Die industrielle Nutzbarkeit scheitert jedoch häufig an der Stabilität der Biokatalysatoren unter den geforderten Prozessbedingungen.[36]

Der Einzug von Biokatalysatoren in die verschiedenen Bereiche der modernen Industrie kann in großem Maß dem *Protein Engineering* zugeschrieben werden.[37–39] Deshalb ist eine Beschreibung der Biokatalyse ohne *Protein Engineering* unvollständig. Beim *Protein Engineering* werden durch Mutationen erwünschte Veränderungen der Proteineigenschaften herbeigeführt. Häufige Ziele beim *Protein Engineering* sind eine Verbesserung der Prozessstabilität, Temperatur-, pH-Wert oder Lösemittel-Beständigkeit, Steigerung der katalytischen Effizienz, Verbesserungen kinetischer Parameter oder Änderungen des Substrat- und Produktspektrums sowie der Stereo- und Regioselektivität.[40] Die natürliche Evolution von Proteinen und deren Eigenschaften geschieht durch vergleichsweise langsame Prozesse, wie

Fehlern bei der Synthese von Proteinen oder Schäden an der DNA. Im Labor existieren Strategien, die grob in zwei unterschiedliche Herangehensweisen eingeordnet werden.[41] Beim rationalen Design von Proteinen werden gezielte Mutationen auf Basis von Strukturdaten und Struktur/Funktions-Zusammenhängen sowie Vorhersagen eingeführt.[42]

Die gerichtete Evolution[43,44] verfolgt eine Strategie, welche eine beschleunigte natürliche Evolution nachahmt. In einem iterativen Prozess wird durch teilweise kontrollierte aber weitestgehend zufällige Einführung von Mutationen eine Bibliothek von Mutanten generiert. Diese wird mittels Hochdurchsatzverfahren auf die gewünschten Eigenschaften durchgemustert.[45] Die Effektivität der beschriebenen künstlichen Strategien, um die natürliche Evolution der Proteine zu beschleunigen, wächst direkt dem technologischen Fortschritt. Zufallsbasierte Ansätze wie gerichtete Evolution profitieren dabei unmitellbar von verbesserten Automatisierungen und Hochdurchsatzmethoden.[46]

Zu weiteren Schlüsseltechnologien gehören *in silico* Werkzeuge wie Datenbanken, Modelle, Simulationen und Algorithmen für maschinelles Lernen. Semi-rationale Ansätze wie neben vielen anderen die iterative Sättigungsmutagenese[47,48], *combinatorial active-site saturation testing*[49], kombinieren in unterschiedlichem Maße die Techniken aus den zwei oben genannten Grundgedanken des *Protein Engineering*. Bessere Datenbanken und präzisere Strukturvorhersagen erlauben gezieltere Veränderungen. Dadurch kann der effektiv zu durchkämmende, zufällige Sequenzraum verkleinert werden.[50]

Steigende verfügbare Rechenleistung und *Cloud-Computing*-Projekte wie *Rosetta@home*[51] ermöglichen Fortschritte auf dem Gebiet des *de novo* Designs von Proteinen und der Strukturvorhersage.[52] Durch die Entwicklung im Bereich der kommerziellen DNA-Synthese sinken die Kosten und computerbasierte Designs können dadurch im Labor getestet werden.[53,52] Weil Proteineigenschaften immer genauer verändert oder gar maßgeschneidert werden können, wird eine neue Welle an Biokatalysatoren[21] in der Industrie vorhergesagt.

1.2 Kaskaden

Als Teil des Stoffwechsels und bei der Biokatalyse spielen aufeinanderfolgende oder parallel ablaufende Reaktionsfolgen eine wichtige Rolle. Eintopf-, Domino-, Tandem-, Zipper-, oder auch Kaskadenreaktionen gehören zu unterschiedlichen Kategorien mehrstufiger konsekutiver Reaktionsfolgen, die gegebenenfalls unter Beteiligung von Enzymen in einem Reaktionsgefäß ablaufen können.[54] Nach einer klassischen Definition (von mehreren) unterscheiden sich Kaskaden- und Dominoreaktionen von Tandemreaktionen dadurch, dass keine stabilen, isolierbaren Zwischenprodukte gebildet werden. Die unterschiedlichen Stufen der Tandemreaktionen könnten in der Theorie getrennt in unterschiedlichen Reaktionsgefäßen

durchgeführt werden.[55] Eine strikte Unterscheidung wird in der Literatur jedoch häufig nicht befolgt und eine Zahl von Begriffen wird praktisch synonym verwendet.[56] Hier wird Kaskadenreaktion oder Kasakde als der Begriff für gegebenenfalls unter Beteiligung von Biokatalysatoren ablaufende Reaktionsfolge von mindestens zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen verwendet. Diese kann entweder in einem Reaktionsgefäß ohne Änderung der initialen Reaktionsbedingungen oder im sequenziellen Modus ablaufen, bei dem Reaktanden und Katalysatoren nach dem ersten Reaktionsschritt zugefügt werden.[57]

Mit Ausnahme von Dominoreaktionen und Reaktionssequenzen sind üblicherweise immer mindestens zwei Katalysatoren an einer Kaskadenreaktion beteiligt. Bei Dominoreaktionen wird die initiale Reaktion durch einen Katalysator in Gang gebracht und Folgeschritte laufen spontan ab. Für Kaskaden unter Beteiligung von mindestens zwei Katalysatoren gibt es neben linearen Kaskadenreaktionen verschiedene weitere Konfigurationen (Abbildung 1.1). Kaskaden können konvergieren oder divergieren. Dabei wandelt ein Katalysator ein oder mehrere Substrate – zum Beispiel Enantiomere – in mehrere oder ein einzelnes Produkt um. Bei orthogonalen Kaskaden entsteht ein Nebenprodukt, welches weiter umgewandelt wird und eine Abzweigung darstellt. Parallele Kaskaden beschreiben zwei unterschiedliche Reaktionen, die durch die gegenläufige Umwandlung eines Kofaktors oder Kosubstrats miteinander verknüpft sind. Parallele Kaskaden sind in der Natur besonders häufig Teil von Stoffwechselwegen. P450 katalysierte Reaktionen können als parallele Kaskaden betrachtet werden, denn der oxidierte Kofaktor wird im Metabolismus durch eine parallel ablaufende Reaktion reduziert.

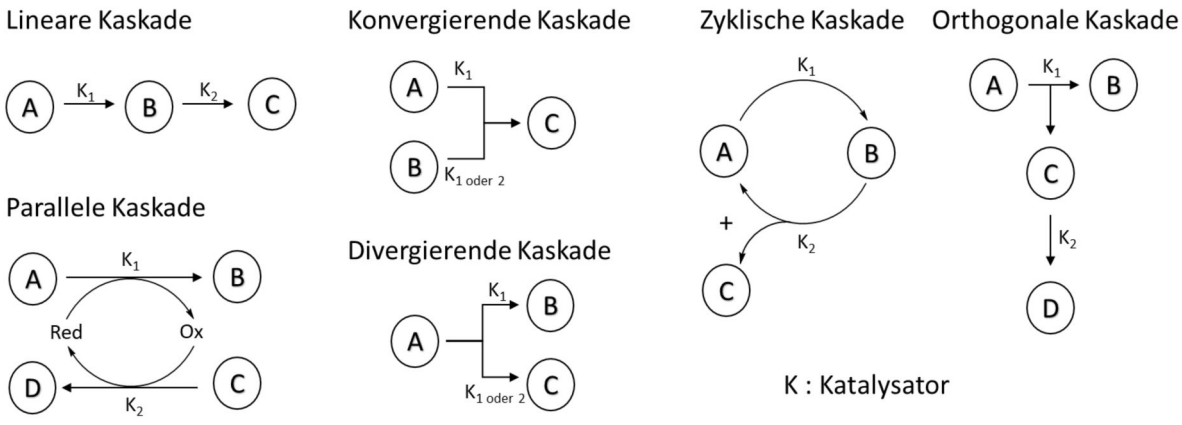

Abbildung 1.1 – Konfigurationen von Kaskadenreaktionen. Abgewandelt nach Schrittwieser 2018 [58].

Ein aus ökonomischer Sicht entscheidendes Charakteristikum von Kaskadenreaktionen ist die Verwendung des jeweiligen Produkts der Vorreaktion – in Konsequenz der in der Vorreaktion aufgebauten Funktionalität – als Edukt des Folgeschritts ohne Isolierung von Zwischenprodukten.[59,58] Unter Anderem aufgrund der bedarfssynchronen Produktion – das

Substrat der zweiten und aller folgenden Reaktionen wird *in situ* generiert – kann als Ergebnis der konsekutiven Reaktionsfolge ein Wegfall der Reinigungsschritte und Schutzgruppenchemie realisiert werden. Weil Zwischenprodukte nur in niedrigen Konzentrationen *in situ* generiert werden, geht diesem Effekt eine Reduktion von Nebenreaktionen, Abfallprodukten und als Folge eine Erhöhung der Ausbeute einher.[60,61] Das Konzept mehrstufiger Reaktionsfolgen stammt aus der Natur, in der physiologische Prozesse häufig in Form von Reaktionsfolgen oder Stoffwechselwegen ablaufen. Diese Reaktionsfolgen besitzen – durch den Einfluss evolutionären Drucks – eine moderate Effizienz innerhalb der Grenzbedingungen des Organismus.[62] Stoffwechselwege sind folglich rein biokatalytische Kaskadenreaktionen und sie können als synthetische Blaupausen für Naturstoffe und molekulare Grundgerüste angesehen werden.[63,64]

Die biomimetische Synthese von Tropinon gilt als die erste dokumentierte Kaskadenreaktion. Die zu jenem Zeitpunkt bekannte chemische Synthese von Tropinon verlief über 18 einzelne Stufen. Dabei wurde ausgehend von Cycloheptanon[65], Tropinon mit einer Gesamtausbeute von weniger als 1 %[66] gewonnen. Die Synthese von Tropinon ausgehend von Succinaldehyd und β-Ketoglutarsäure aus einer Kaskadenreaktion mit 42 % Ausbeute ist deshalb ein Beispiel für die Effizienz dieses Reaktionstyps im Vergleich zu einer schrittweisen Reaktion.[67]

Relevante Beispiele für Kaskaden unter der Beteiligung von Biokatalysatoren existieren als chemo-enzymatische Reaktionskaskaden, rein enzymatische, artifizielle und natürliche Reaktionskaskaden *in vitro* sowie *in vivo* und hybride Systeme.[68,69]

Einen vollständig biokatalytischen Ansatz liefert die synthetische Biologie mit *in vivo* Kaskaden. In der synthetischen Biologie wird häufig mit dem Ziel einer *de novo* Synthese ein vollständiger oder auch Teile verschiedener Stoffwechselwege in einen heterologen Wirt – z. B. *E. coli* oder *S. cerevisiae* – eingebracht und an den Wirtsmetabolismus angekoppelt. Durch *Metabolic Engineering* kann der Stoffwechsel der artifiziellen Kaskadenreaktion dann so angepasst werden, dass die Ausbeute des Zielprodukts maximiert wird.[70] Der Organismus wird dadurch selbst zum Reaktor und synthetisiert im Fall einer *de novo* Synthese nicht nur *in situ* das Produkt, sondern auch die benötigten Reaktanden und Katalysatoren. Die Herausforderungen bei der Etablierung von *in vivo* Kaskaden liegen bei möglichen Wechselwirkungen von Intermediaten mit dem Wirtsmetabolismus, Zelltoxizität, Regulierung der Expressionsniveaus der rekombinanten Proteine, Kompartimentalisierung und Kompatibilität der Proteine mit dem Zielwirt.[71]

Eine etablierte, artifizielle *de novo* Synthese ist die Synthese von Artemisininsäure einer Vorstufe von Artimisinin, einem Sesquiterpen mit sieben chiralen Zentren und einer

Endoperoxidgruppe. Limitierend für die Gesamtreaktion ist vor allem die dreistufige Oxidation von Amorphadien zu Artemisininsäure durch CYP72AV1 und die Feineinstellung der dazugehörigen Redoxkette.[72,73] Es wird geschätzt, dass etwa 150 Arbeitsjahre[74] in die Synthese von Artemisininsäure in *S. cerevisiae* investiert wurden bis industriell relevante Produktkonzentrationen[73] erreicht wurden.

Ein weiteres Beispiel ist die von Brown *et al.* etablierte *de novo* Produktion von Strictosidin in *S. cerevisiae.*[75] Hier wurde zunächst der Metabolismus von *S. cerevisiae* durch Einführung von Geranyl-Pyrophosphat-Synthasen aus *Abies grandis* und *Gallus gallus* so angepasst, dass eine benötigte Vorstufe, Geranylpyrophospat, synthetisiert wird. Weiteres Pathwaydesign umfasst Ergänzungen und Deletionen, die entweder auf die Steuerung der Terpen-Biosynthese oder eine Erhöhung der Konzentration von Kofaktoren wie NADP(H) und S-Adenosylmethionin zielen. Es wurden vorwiegend durch homologe Rekombination 14 pflanzliche Biokatalysatoren eingebracht, von denen 11 direkt an der stufenweisen Umwandlung von Geranyl-Pyrophosphat zu Strictosidin beteiligt sind und drei eine unterstützende Rolle ausfüllen.[75] Weitere Optimierungen und möglicherweise auch die Identifikation weiterer limitierender Reaktionsschritte neben CYP76B6 sind erforderlich, um die erreichte Strictosidin-Konzentration von 0,5 mg/L auf relevante Produktkonzentrationen zu steigern.

Eine Zahl weiterer Beispiele für derartige *de novo* Synthesen sind bekannt, wie die Bildung natürlicher und nicht-natürlicher Cannabinoide[76], Vanillin[77] und Sesquiterpenen[78] in *S. cerevisiae.*

Eine Alternative zu *in vivo* Ansätzen stellen Strategien dar, die natürliche und artifizielle Synthesen, oder Teile davon, als biokatalytische *in vitro* Kaskaden nachbilden. Die synthetische Biochemie ist eng mit artifiziellen biokatalytischen Kaskaden verwandt und strebt ähnlich zur synthetischen Biologie eine *de novo* Synthese *in vitro* an. Es werden Stoffwechselwege bestehend aus *Build Modules* (z. B. Terpen-Biosynthese) und *Breakdown Modules* (z. B. Glykolyse) nachgebildet.[79–81] Zur Produktion eines Zielprodukts werden Biokatalysatoren als Mischung unterschiedlicher Proteinpräparate – unter anderem als gereinigte Proteine und/oder in Form von Zellextrakten und Lysaten – *in vitro* eingesetzt.

Das *in vitro Metabolic Engineering* in Form artifizieller Kaskaden als Optimierungswerkzeug, mit der Absicht die Reaktionsfolge abschließend *in vivo* durchzuführen, gewinnt zunehmend an Bedeutung.[82–84] Durch eine *in vitro* Reaktion wird die Komplexität des Systems – hier durch Wegfall des Wirtsorganismus – reduziert und eine gezieltere Evaluation und Optimierung der Stoffwechselwege und Limitierungen ermöglicht.[85]

In vitro ist eine bessere Kontrolle der Reaktionsparameter und Flexibilität bei Optimierungen möglich. Konzentrationen können bestimmt und neue Biokatalysatoren gegebenenfalls einfach zum Reaktionsansatz zugegeben werden.[86] Außerdem können einzelne Abschnitte der Reaktionsfolge gesondert von der Gesamtreaktion evaluiert werden. Durch die erreichte Unabhängigkeit von lebenden Zellen spielt zudem weder Zelltoxizität oder Wechselwirkungen mit dem Wirtsmetabolismus eine Rolle, noch müssen lebensnotwendige Stoffwechelpfade belassen werden, welche durch ihre Aufrechterhaltung die Ausbeute des Zielprodukts reduzieren.[87] Die Nachteile von *in vitro* Systemen haben ihren Ursprung, wie auch die Vorteile, im Fehlen eines Wirtsmetabolismus. Die Katalysatoren werden nicht *in situ* gebildet und müssen gegebenenfalls in hohen Konzentrationen in aktiver Form präpariert und im Reaktionsansatz vorgelegt werden. Ohne intakte Zellen kann zudem weder die natürliche Kompartmentalisierung ausgenutzt, noch der Energiehaushalt des Wirts zur Bereitstellung der benötigten Kofaktoren angezapft werden. Von Reduktionsäquivalenten abhängige Biokatalysatoren, wie P450 Monooxygenasen, benötigen gegebenenfalls zusätzliche Systeme zur Kofaktor-Regenerierung. Alternativen zur nicht-produktiven Kofaktor-Regenerierung können durch die Wahl einer geeigneten Syntheseroute erreicht werden, bei der die Gesamtreaktion in der Summe redoxneutral ist. Dies wird beispielsweise bei der „*borrowing hydrogen*“-Strategie[88,89] erreicht. Ein Beispiel einer *in vitro* Kaskade ist die biokatalytische Synthese von Islatravir, ein Nukleotid welches zur Behandlung von HIV eingesetzt wird. Insgesamt neun Biokatalysatoren – fünf davon durch Protein-Engineering den Anforderungen angepasst – treiben die Umwandlung von 2-Ethynylpropan-1,2,3-triol zu Islatravir mit einer Gesamtausbeute von 51 % voran.[90] Eine klassische, chemische Synthese erreicht das Zielprodukt nach 16 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 17 %.[91]

Die Anwendung von Biokatalysatoren in Reaktionskaskaden stellt somit einen vielversprechenden Lösungsansatz für Problemstellungen bei der Synthese von Chemikalien und Pharmazeutika mit komplexen Strukturen dar.

1.3 Alkaloide und Indolalkaloide

Ein großer Teil der bekannten und neu zugelassenen Medikamente basiert auf Naturstoffen.[1,4,2,3] Alkaloide sind Naturstoffe und eine ausgedehnte Gruppe von sekundären Stoffwechselprodukten, die geschätzt etwa eine Anzahl von mehr als 12000 bekannten Substanzen umfasst.[92] Es ist schwierig eine allgemein gültige Definition für Alkaloide zu treffen, da die Substanzklasse auf Basis ihrer Struktur und Wirkungsvielfalt immer wieder neu definiert wurde.[93] Nach einer streng ausgelegten Definition werden Alkaloide als Naturstoffe klassifiziert, die ein charakteristisches, basisches, heterozyklisches N-Atom besitzen, das für

die oft vorhandene pharmakologische Potenz dieser Substanzen verantwortlich ist.[94,95] Andere Definitionen fassen auch Protoalkaloide – stickstoffhaltige, nicht heterozyklische Substanzen pflanzlicher Herkunft – unter dem Begriff der Alkaloide zusammen oder klassifizieren Substanzen nur basierend auf ihrer pharmakologischen Wirksamkeit.[96]

Die physiologische Rolle von Alkaloiden in Pflanzen kommt hauptsächlich bei der Adaption an Umweltfaktoren zu tragen. Sie wirken unter anderem als Toxine zur Verteidigung gegen Mikroorganismen, als Fraßschutz oder als Botenstoffe.[97] Die kommerzielle und humanitäre Relevanz von Alkaloiden liegt in ihrer Anwendung in Pharmazie und Medizin. Etwa ein Drittel der neu zugelassenen Medikamente im Zeitraum von 1981 bis 2014 sind Naturstoffe und Derivate von Alkaloiden.[3] Die meisten Alkaloide wirken auf verschiedene Rezeptoren des Nervensystems.[98] Substanzen wie Ephedrin, Norephedrin, Dopamin, γ-Aminobutansäure, Acetylcholin und Serotonin besitzen deshalb eine pharmakologische Relevanz (Abbildung 1.2).

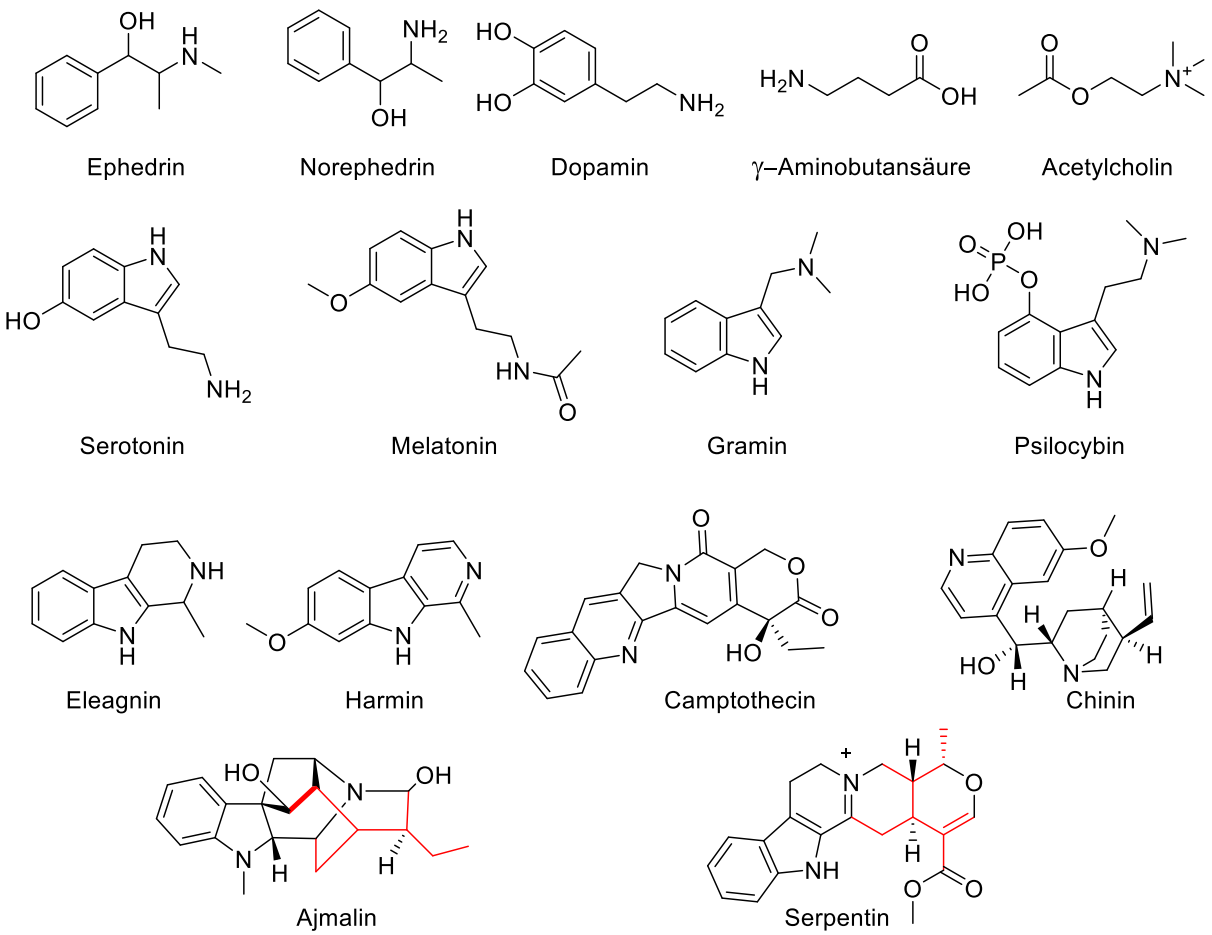

Abbildung 1.2 – Auswahl von Strukturformeln verschiedener Alkaloide und Protoalkaloide mit unterschiedlicher struktureller Komplexität. Das Monoterpen-Grundgerüst ist jeweils rot markiert.

In der Natur können Alkaloide unterschiedlicher Komplexität auf zahlreiche, unterschiedliche Metabolite, wie Aminosäuren, Nicotinsäure oder Purine zurückgeführt werden. Anhand dieser

Ursprungsbeziehung kann eine Klassifizierung vorgenommen werden. Eine große Untergruppe der Alkaloide basiert auf dem Baustein L-Tryptophan. Die einfachsten Vertreter sind Indolalkaloide wie Serotonin, Melatonin, Gramin und Psilocybin (Abbildung 1.2), die sich direkt von Tryptophan ableiten.

Alkaloide, welche die charakteristische Tetrahydro-β-Carbolin-Struktur oder Tryptolin-Struktur enthalten, werden in einer Pictet-Spengler-Reaktion gebildet. Hierbei wird die Tetrahydro-β-Carbolingruppe jeweils durch eine Mannich-artige Kondensationsreaktion[99] aus Tryptamin und einer Carboxy-funktionalisierten Vorstufe aufgebaut. Die strukturelle Komplexität des Produkts leitet sich vom reagierenden Aldehyd oder Keton ab. Die Kondensationsreaktion von Tryptamin und Ketosäuren erzeugt vergleichsweise einfache von β-Carbolin abgeleitete Alkaloide wie Eleagnin oder Harmin.

TIA, zu denen auch die Monoterpen Indolalkaloide (MIA) gehören, werden durch Kondensationsreaktion von Tryptamin und dem aus der Terpen-Biosynthese stammenden Iridoid Secologanin gebildet. TIA können als pflanzliche Sekundärstoffwechselprodukte hauptsächlich in den Pflanzenfamilien der *Apocynaceae, Loganiaceae, Nyssacea und Rubiaceae* aufgefunden werden.[100] *Catharanthus roseus* aus der Pflanzenfamilie der Hundsgiftgewächse (*Apocynaceae)* und der Ordnung der *Gentianales* nimmt innerhalb der TIA-produzierenden Pflanzen – aufgrund der Anzahl pharmakologisch aktiver TIA – eine Sonderstellung ein.[101] Strictosidin ist die universelle Vorstufe für fast alle rund 3000 bekannten TIA.[102–104] Diese Schlüsselstellung ist auch ein Grund für das große wissenschaftliche Interesse, welches die Biosynthese von Strictosidin auf sich zieht.[75] Durch die Spaltung der glycosidischen Bindung am Strictosidin durchläuft das resultierende Aglykon aufgrund seiner Reaktivität eine Reihe unterschiedlicher Umlagerungen der Terpen- oder Tetrahydro-β-Carbolin-Einheit. Aus dieser Reaktivität erschließt sich die strukturelle Vielfalt (Abbildung 1.3) der TIA.[105–107] Im Vergleich zu den zuvor aufgeführten einfachen, von Tryptophan abgeleiteten Alkaloiden, entfernen sich TIA strukturell immer weiter bis zur Unkenntlichkeit von Tryptophan und Secologanin (vgl. Abbildung 1.3 und Abbildung 1.4: 7 & 8): Umlagerungen an der Terpen-Untereinheit können verschiedene charakteristische Grundgerüsttypen wie den *Corynanthe*-Typ (Strictosidin, Ajmalicin und Akuammicin) in den *Aspidosperma*-Typ (Tabersonin und Vindolin) oder *Iboga*-Typ (Catharanthin und Ibogain) hervorbringen. Umlagerungen an der Tetrahydro-β-Carbolingruppe und Dimerisierungen können die Strukturvielfalt dieser Naturstoffgruppe nochmals erweitern. Vinblastin oder

Vincristin[108] sind unter anderem dank ihrer hohen Wirksamkeit und Hochpreisigkeit[a] die bekanntesten Vertreter der TIA. Diese Bisindolalkaloide und einige Derivate werden auf der WHO Liste essentieller Medikamente[110] geführt.

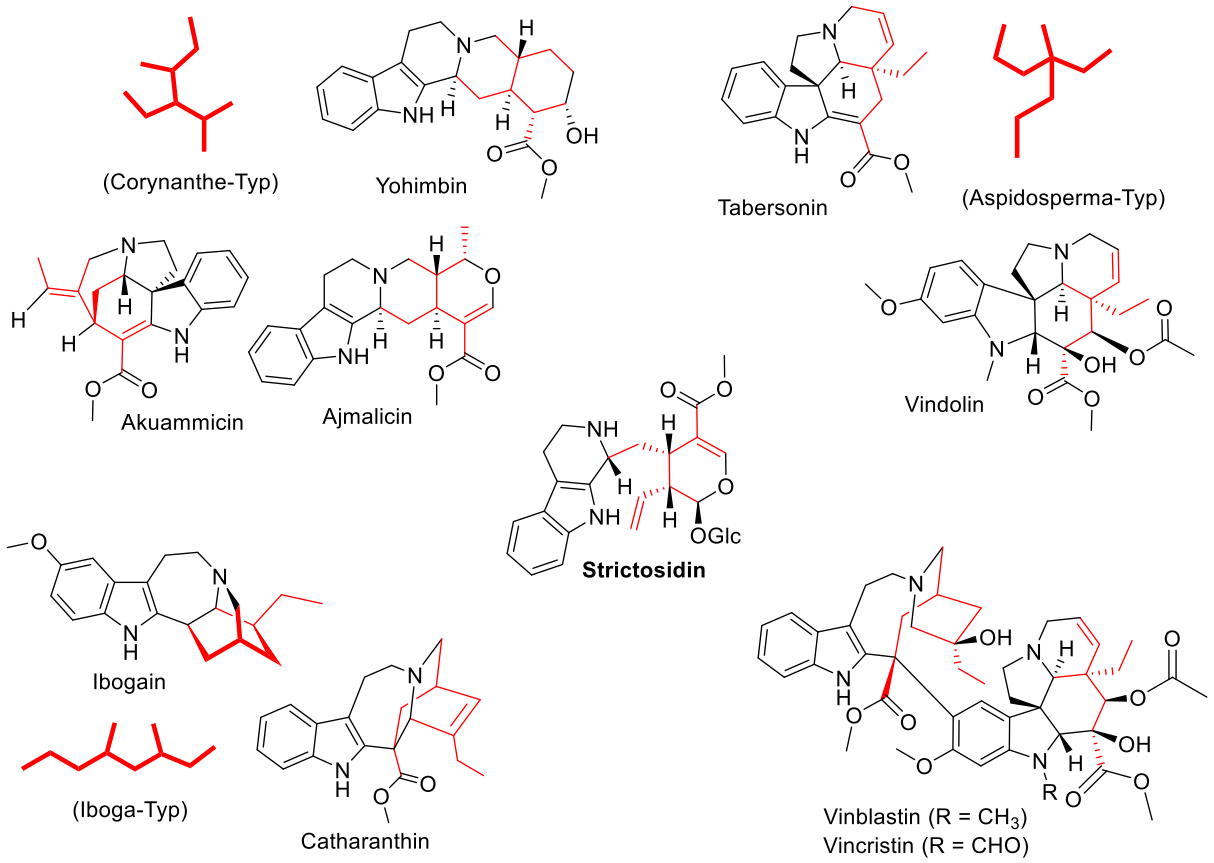

Abbildung 1.3 – Aufbau der unterschiedlichen TIA-Grundstrukturen, die von Strictosidin abgeleitet werden. Aus Strictosidin (*Corynanthe*-Strukturtyp) werden während der TIA-Biosynthese die *Aspidosperma*- und *Iboga*-Strukturtypen aufgebaut.

Der hohe Preis begründet sich auf einer hohen Nachfrage und dem Umstand, dass die Subtanzen aus getrockneten Blättern isoliert werden und dort nur in Spuren (0,0002 %) vorliegen.[5] Etwa 14 Tonnen Blätter werden benötigt um 28 g Vinblastin zu gewinnen.[6] Eine chemische Totalsynthese von Vinblastin[111–113] involviert 12 Stufen, obwohl die komplexe Vorstufe Catharanthin als Substrat eingesetzt wird.

1.4 Biosynthese von Strictosidin in *Catharanthus roseus*

Ein wichtiger Schritt zur enzymatischen Synthese von Naturstoffen ist die Aufklärung des entsprechenden Biosynthesepfads. Die Aufklärung pflanzlicher Stoffwechselwege aus dem Sekundärmetabolismus ist im Vergleich zu Stoffwechselpfaden mikrobieller Organismen eine

[a] Der Kaufpreis eines Kilogramms lag im Jahr 2007 zwischen 1 Millionen (Vinblastin) und 3,5 Millionen Dollar (Vincristin)[109]..

große Herausforderung, da die beteiligten Gene nicht als Cluster vorliegen.[114,115] Deshalb muss üblicherweise jedes Gen einzeln identifiziert und funktionell charakterisiert werden.[116–118] Ein weiterer erschwerender Faktor der Enzymidentifikation und Charakterisierung der TIA Biosynthese ist der komplexe Aufbau, der sich innerhalb der Pflanze über verschiedene Zelltypen und Zellkompartimente erstreckt.[119,120] An der TIA Biosynthese in *C. roseus* sind stark vereinfacht alle Organe der Pflanze beteiligt, sowohl oberirdische als auch unterirdische. Es liegt ein komplexes Netzwerk an strikt regulierten Reaktionen vor, die über verschiedene Transportmechanismen miteinander verknüpft sind. Die Expression der einzelnen Gene und die Akkumulation der Zwischenprodukte, sowie deren Transport sind stark von Ontogenese und ökophysiologischen Aspekten abhängig.[121–123] Allein an der Biosynthese von Strictosidin sind vier verschiedene Zelltypen – interne Phloem assoziierte Parenchymzellen (IPAP), Epidermiszellen, Milchsaftzellen, und Idioblasten – und vier unterschiedliche Kompartimente – Plastid, endoplasmatisches Retikulum (ER), Cytosol und Vakuole – beteiligt.[124] Zur Biosynthese von Strictosidin in *C. roseus* konvergieren Synthone aus verschiedenen Teilen des Anabolismus der Pflanze. Die Monoterpen-Grundeinheit stammt aus der Terpen-Biosynthese (Abbildung 1.4), die aus dem Methylerythritolphosphatweg gespeist wird.[125,126] Geraniol (1) wird in den Plastiden des IPAP in insgesamt 16 Schritten aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aufgebaut.[127–130] Im letzten Schritt katalysiert die Geraniol-Synthase aus Plastiden die Umwandlung von Geranyldiphosphat zu Geraniol.[131] Die Terpenbiosynthese zur Bildung des Iridoid Grundgerüsts aus Geraniol wird durch CYP76B6 (Geraniol-8-Hydroxylase) eingeleitet.[132,133] Das Enzym ist wie alle pflanzlichen P450 ER-ständig und hydroxyliert Geraniol zu 8-Hydroxygeraniol. Dieses wird anschließend im Cytosol durch die 8-Hydroxygeraniol-Oxidoreduktase zu 8-Oxogeranial oxidiert.[134]

Das charakteristische, bicyclische Iridoid-Skelett wird im Cytosol durch eine Terpenzyklase (Iridoid-Synthase) aus 8-Oxogeranial generiert.[135–137] Bei dieser Umsetzung entsteht *cis-trans*-Iridodial, welches spontan zu *cis-trans*-Nepetalactol umlagern kann.[136,137] Dieses wird durch die Iridoid-Oxidase (CYP76A26) in mehreren aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten zu 7-Deoxyloganetinsäure oxidiert.[134,138] Eine UDP-Glucose abhängige Glycosyltransferase (7-Deoxyloganetinsäure-Glycosyltransferase, 7DLGT) produziert im Cytosol 7-Deoxyloganinsäure.[134,139] 7-Deoxyloganinsäure wird im nächsten Schritt durch die 7-Deoxyloganinsäure-Hydroxylase (CYP72A224) unter Bildung von Loganinsäure hydroxyliert.[140,134]

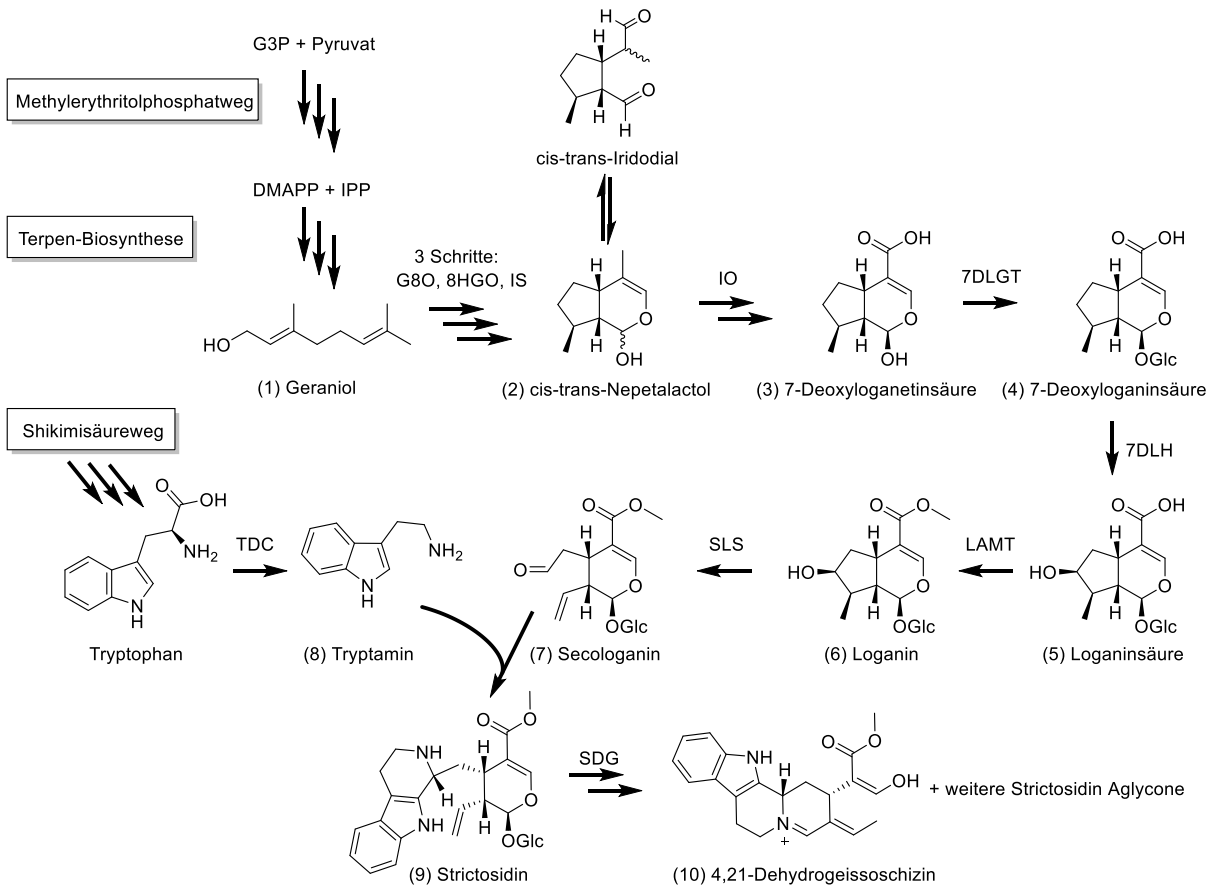

Abbildung 1.4 – Schematische Darstellung der Biosynthese von Strictosidin in *C. roeus*. G3P Glycerinaldehyd-3-Phosphat; DMAPP, Dimethylallyldiphosphat; IPP Isopentenyldiphosphat; G8O Geraniol 8-Oxidase, CYP76B6; 8HGO Hydroxygeraniol-Oxidoreduktase; IS Iridoid-Synthase; IO Iridoid-Oxidase, CYP76A26; 7DLGT 7-Deoxyloganetinsäure-Glycosyltransferase; 7DLH 7-Deoxyloganinsäure-Hydroxylase, CYP72A224; LAMT Loganinsäure O-Methyltransferase; SLS Secologanin-Synthase, CYP72A1; TDC Tryptophan-Decarboxylase; STR Strictosidin-Synthase; SDG Strictosidin-Deglycosylase.

Ein noch unbekannter Transportmechanismus überführt Loganinsäure in das Cytosol der Epidermis. Die Carbonsäuregruppe der Loganinsäure wird unter Verbrauch von S-Adenosylmethionin durch die Loganinsäure O-Methyltransferase (LAMT) methyliert und zum Ester umgewandelt.[141,142] Die folgende Spaltung des Loganin-5-Ringes wird durch die Secologanin-Synthase (CYP72A1) vermutlich über einen für P450 ungewöhnlichen Reaktionsmechanismus (vergleiche Abbildung 1.5) katalysiert.[143,144] Tryptamin wird zum Aufbau der Tetrahydro-β-Carbolingruppe am Strictosidin in der Folgereaktion benötigt und stammt aus dem Shikimisäureweg.[145] Tryptamin wird im Cytosol[146] durch die Tryptophan-Decarboxylase (TDC) aus Tryptophan gebildet.[147] Die Kondensationsreaktion von Secologanin und Tryptamin durch die Strictosidin-Synthase (STR) verläuft nach einer Pictet-Spengler-artigen Reaktion[99] innerhalb der Vakuole.[148–150] Beide Edukte müssen dazu durch bisher unbekannte Mechanismen in die Vakuole transportiert werden. Nach der Produktion von Strictosidin wird dieses im Folgeschritt deglycosyliert. Aufgrund der reaktiven Natur der

Strictosidin-Aglykone ist diese Reaktion praktisch irreversibel. Die Aktivierung von Strictosidin durch Entfernen der Glycosylgruppe findet in Epidermiszellen statt und wird durch die Strictosidin β-D-Glucosidase (SGD) katalysiert.[106,151] Strictosidin-Aglykon wurden protein-vernetzende Eigenschaften nachgewiesen. Um Selbstschädigung zu vermeiden, ist eine strikte Regulation der Reaktion notwendig und außerdem wird eine physiologische Rolle als Abwehrmechanismus gegen Fressfeinde suggeriert.[107] Die Stufen, die im Anschluss der Deglycosylierung von Strictosidin zur strukturellen Vielfalt der über 3000 bekannten TIA führen, sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.4.1 Loganinsäure O-Methyltransferase

Die Loganinsäure O-Methyltransferase (LAMT, EC 2.1.1.50, Uniprot: B2KPR3) ist ein cytosolisches, 42 kDa schweres Protein mit 371 Aminosäuren, das hauptsächlich in der Epidermis junger Blätter als Homodimer vorliegt.[141,152] Das Enzym aus *C. roseus* katalysiert die Methylierung von Loganinsäure unter Verbrauch von S-Adenosylmethionin (SAM).[142] LAMT ist dabei hochspezifisch gegenüber Loganinsäure. Es wurde eine Vielzahl unterschiedlicher potentieller Substrate getestet (unter anderem 7-Deoxyloganinsäure, 7-Epiloganinsäure, Loganin und Secologanin), ohne das Aktivität beobachtet werden konnte.[142,141] LAMT gehört vermutlich zur Familie der SABATH-Methyltransferasen, da eine Sequenzidentität von etwa 35 % zu bestimmten Methyltransferasen dieser Familie wie der Salicylsäure-Methyltransferase (SAMT) aus *Clarkia breweri* und weiteren Beispielen aus *A. thaliana* besteht.[141] Auf Basis der Kristallstruktur[153] der LAMT wurde demonstriert, dass das Enzym – wie auch andere SABATH-Methyltransferasen – aus zwei Domänen besteht. Die SAM-Bindedomäne weist eine Rossmann-artige Faltung auf. Loganinsäure wird durch eine α-helikale Domäne koordiniert. Der im Vergleich zu anderen Methyltransferasen dieser Proteinfamilie hydrophile Charakter des aktiven Zentrums steht im Einklang mit der Hydrophilizität des Substrats.[153] Es sind unterschiedliche kinetische Parameter zur LAMT in der Literatur dokumentiert. Insbesondere in Bezug auf die Michaelis-Menten-Konstante existieren widersprüchliche Angaben. So werden stark unterschiedliche Werte für K_M im zweistelligen millimolaren Bereich (K_M = 12,5 mM[142]; K_M = 14,76 ± 1,7 mM[141]) bis hin zum mikromolaren Bereich (K_M = 0,315 ± 0,035 mM[153]) für Loganinsäure dokumentiert. Als mögliche Ursachen für die Unterschiede werden – ebenfalls im Widerspruch – Produktinhibition durch entweder Loganin, Inhibition durch S-Adenosylhomocystein sowie variierende Reinheit der Enzympräparate angegeben. Bei der Wechselzahl und dem pH-Optimum finden sich hingegen vergleichbare Werte (k_{cat} = 0,327[141] , pH 7,5; k_{cat} = 0,31 ± 0,01[153]).

1.4.2 Secologanin-Synthase

Die Secologanin-Synthase (CYP72A1, *Accession number* L10081, in der Literatur auch SLS) aus *C. roseus* ist eine NADPH abhängige Cytochrom-P450-Monooxygenase (EC 1.14.19.62 vormals EC 1.3.3.9), welche die oxidative Spaltung des Cyclopentan-Rings an Loganin katalysiert. CYP72A1 wird in der Epidermis junger Blätter produziert und folgt dabei einem basipetalen Gradienten.[143] Die 60,5 kDa schwere CYP72A1 besitzt eine N-terminalen Transmembrandomäne einschließlich einer kurzen vorgeschalteten polaren Signalsequenz. Letztere dirigiert das Protein zur Insertion in die Membran des ER. Eine Besonderheit in Bezug auf den Aufbau des N-Terminus stellt das Fehlen der häufig bei pflanzlichen P450 beobachteten prolinreichen Sequenz auf der C-terminalen Seite des Membrandomäne dar. Die Umwandlung von Loganin zu Secologanin findet auf der cytosolischen Seite des ER statt.[152]

In *C. roseus* wurde eine weitere Isoform des Enzyms identifiziert. Die SLS2 (*Accession number* KF415117) hat eine hohe Sequenzidentität zur SLS (>97 %). Beide SLS-Isoformen zeigen bei Überexpression in *S. cerevisiae* in Kombination mit einer CPR aus *A. thaliana* die Fähigkeit, Loganin in Secologanin und weiter zu Secoxyloganin umzuwandeln.[154]

In der Natur kommen Homologe der CYP72A1 in unterschiedlichen TIA-produzierenden Pflanzen vor, wie beispielsweise *Lonicera japonica*.[155] Anhand von Experimenten mit *L. japonica* Zellsuspensionen wurde demonstriert, dass die homologe CYP72A1 eine vergleichsweise geringe Aktivität (maximal 1,12 pkat/mg Protein), jedoch hohe Spezifität gegenüber Loganin besitzt. Aus einer Auswahl getesteter Substrate werden unter anderem Loganinsäure, 7- oder 8-Epiloganin nicht umgesetzt.[144] In der Literatur wurde ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, der mit der P450 katalysierten Bildung des Furanrings bei der Synthese von Psoralen verglichen werden kann (Abbildung 1.5).[156] Dabei wird zunächst von einer aktiven Eisen-Peroxo-Spezies vom Loganin ein Wasserstoffradikal am C-10 Kohlenstoff abstrahiert (1➔2). Unterschiedliche Routen wurden für den weiteren Verlauf der Reaktion vorgeschlagen. Durch Radikalumlagerung kommt es zur C-C-Bindungsspaltung und Übertragung des Radikals auf den C-7 Kohlenstoff (2➔3). Die Bildung des Aldehyds kann durch Entsättigung (3➔6, grün) oder Hydroxylierung über ein Diol (3➔4➔6, orange) zum Aldehyd (**6**) führen. Alternativ verläuft die Reaktion über Abstraktion eines weiteren Elektrons über ein Carbokation zum Aldehyd (3➔5➔6, blau).[144]

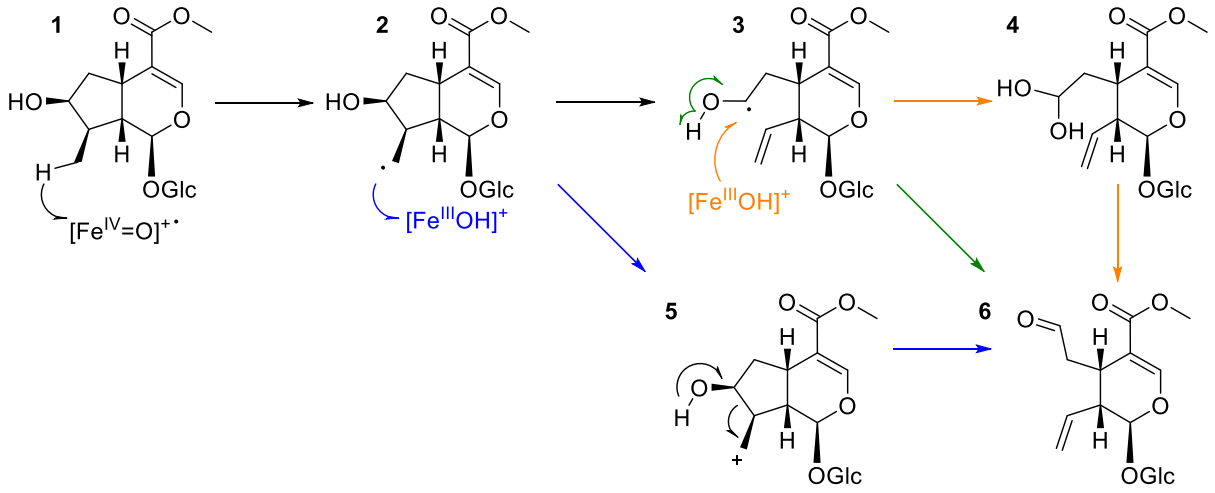

Abbildung 1.5 – Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus zur oxidativen Ringöffnung am Loganin.
Es wurden mehrere Reaktionsmechanismen zur Umwandlung von Loganin zu Secologanin vorgeschlagen. Die C-C-Spaltung kann über eine Radikalumlagerung mit anschließender Entsättigung (grün) oder Hydroxylierung (gelb) oder über Bildung eines Carbokations (blau) verlaufen. Abgewandelt nach Yamamoto 2000.[144]

Der genaue Reaktionsmechanismus ist bisher unbekannt. Insgesamt sind nur wenige Informationen zur CYP72A1 aus *C. roseus* und ihre Reaktionsparameter bekannt. Das liegt möglicherweise daran, dass der Umgang mit pflanzlichen P450 besonders anspruchsvoll ist und das Produkt Secologanin zudem anfällig gegenüber saurer oder basischer Hydrolyse sowie der Bildung von Schiffbasen ist.

1.4.3 Strictosidin-Synthase

Die Strictosidin-Synthase (STR, EC.4.3.3.2, Uniprot: P68175; GenBank:Y00756.1) aus *Rauvolfia serpentina* ist ein Glykoprotein bestehend aus 344 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 38,2 kDa.[157] STR katalysiert die Pictet-Spengler-artige stereospezifische Kondensationsreaktion von Secologanin und Tryptamin zu 3α(S)-Strictosidin.[148,158,103]

Das Vorkommen von STR korreliert mit der Fähigkeit TIA zu produzieren. Strictosidin-Synthasen sind bei einigen Pflanzengattungen der *Rubiaceae* und *Apocynaceae* bekannt.[159–161] Pflanzen der *Rauvolfia* Gattung wie *R. serpentina*, *Rauvolfia mannii*, und *Rauvolfia verticillata* codieren für jeweils eine einzelne STR, die jeweils untereinander vollständige Sequenzidentität besitzen.[162] Im Vergleich dazu wurde in *C. roseus* über mehrere Isoformen des Proteins berichtet. Diese besitzen unterschiedliche Massen und isoelektrische Punkte sind aber kinetisch und in Bezug auf ihre Lokalisierung nicht unterscheidbar.[163,164] Außerhalb der genannten Pflanzengattungen sind Beispiele von Pictet-Spenglerasen mit bis zu 36 % Sequenzidentität in Pflanzen und Tieren dokumentiert, die nicht mit der Alkaloid-Biosynthese in Verbindung gebracht werden.[165]

Der Erforschung der STR wird besondere Aufmerksamkeit beigemessen, da neben ihrer Fähigkeit C-C-Bindungen zu knüpfen, das Reaktionsprodukt Strictosidin die Vorstufe[102–104,166] für fast alle TIA darstellt.[101,167–169]

Eine STR wurde erstmals aus *C. roseus* Zellsuspensionen isoliert und charakterisiert.[170] Das Protein wurde in *C. roseus* innerhalb der Vakuole lokalisiert und besitzt ein entsprechendes Signalpeptid, welches dem N-Terminus vorgeschaltet ist.[150,171,107] Auch die Variante aus *R. serpentina* besitzt ein Signalpeptid mit einer Länge von 27 Aminosäuren am N-Terminus.[165] Fast ein Jahrzehnt nach der ersten beschriebenen Präparation der STR[172] aus *C. roseus* Zellsuspensionen wurde die cDNA der STR aus *R. serpentina* isoliert und das Gen heterolog exprimiert.[157,173]

Bezugnehmend auf kinetische Parameter liefert die Literatur stark variierende Angaben. Jüngste Daten zur *R. serpentina* STR dokumentieren einen k_{cat}-Wert von 78200 min^{-1} und K_m-Werte von 6,2 µM[174] und 7,2 µM für Tryptamin[175,176] und 39 µM[174] für Secologanin. Die Werte für den optimalen pH und Temperaturbereich werden zwischen pH 6.5–7.0 und 45-55 °C angegeben.[177,178] Zum Vergleich liegen die berichteten Optima für Temperatur und pH-Wert für die *C. roseus* STR übereinstimmend im Bereich von bei pH 6.8 und 45 °C[170,159,163,164]. Ursache für die Unterschiede sind wahrscheinlich die Vielzahl verschiedener Expressionssysteme und Präparationen. Bei der Temperaturstabilität der STR aus *C. roseus* und *R. serpentina* gibt es Unterschiede. Während die STR aus *C. roseus* eine Halbwertszeit von fünf Stunden bei 37 °C[179] besitzt, beträgt die Halbwertszeit der *R. serpentina* STR unter vergleichbaren Bedingungen 36 Tage[177].

Die Kristallstruktur der *R. serpentina* STR wurde 2006 durch Ma *et al.*[174] aufgeklärt: Das Protein weist eine charakteristische Tertiärstruktur auf, die sich am besten als Propellerprotein mit sechs Flügeln beschreiben lässt. Die Flügel sind orthogonal um eine sechszählige Pseudosymmetrieachse angeordnet und bestehen aus jeweils vier β-Faltblättern.

Zwei α-helikale Domänen liegen außerhalb der Propellerebene des Proteins. Das aktive Zentrum befindet sich in einer hydrophoben Tasche oberhalb der Flügelebene, in der auch die Substrate Secologanin und Tryptamin koordiniert werden.[174,176]

Die STR aus *R. serpentina* ist grundsätzlich spezifisch für die Tryptamin- und Secologanin-Grundgerüste, jedoch werden im Vergleich zu anderen Proteinen des Seco-Iridoid-Pfads, eine Zahl von Derivaten akzeptiert, die beispielsweise Substitutionen am aromatischen Ring des Tryptamins besitzen können. Die STR aus *R. serpentina* setzt Derivate basierend auf Hydroxylierungen, Fluorierungen und Methylierungen um.[174] Homologe STR, beispielsweise STR1 aus *C. roseus* (79 % Sequenzidentität) sind kompatibel mit vergleichbaren Substitutionen

an C-4, C-5, C-6 oder C-7. Mit der Homologen aus *C. roseus* wurden auch für 3-Benzothiophenethanamin oder 3-Benzofuranethanamine Reaktionsprodukte detektiert.[180] Angesichts der Flexibilität des Substratspektrums, gibt es Ansätze durch rationales Design Varianten der STR zu erzeugen, welche neue Substratderivate verstoffwechseln.[181,182,175] Auf diesem Weg könnten die Strictosidin-Derivate unter anderem in den spezialisierten Metabolismus von Pflanzen zur Produktion von TIA Derivaten eingeschleust werden.[183]

1.5 Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Cytochrom-P450-Monooxygenasen (P450) sind Hämoproteine, die allen Organismen vorkommen und vielfältige Aufgaben sowohl im Anabolismus als auch im Katabolismus erfüllen.[184] Unter Verbrauch von NADH oder NADP(H) wird atmosphärischer Sauerstoff reduktiv gespalten und unter Umwandlung zu Wasser ein organisches Zielmolekül oxyfunktionalisiert (Abbildung 1.6).[185]

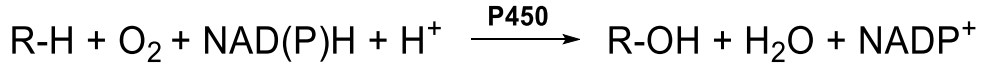

Abbildung 1.6 – Allgemeine Reaktionsgleichung einer durch eine Cytochrom-P450-Monooxygenase katalysierten Hydroxy-Funktionalisierung.

P450 gehören zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen (EC 1.14.-.-). Die Reduktionsäquivalente werden durch verschiedenartige RP auf die P450 übertragen und es gibt unterschiedliche RP-Systeme.[186] In reduzierter Form vermag das Häm-gebundene Eisenatom Kohlenmonoxid zu binden, was zu einer charakteristischen Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 450 nm führt.[187]

Die prosthetische Häm-b-Gruppe ist für dieses Absorptionsmaximum verantwortlich und über einen Thiolatrest durch Cystein axial koordiniert, der in allen P450 konserviert ist. Diese Spektralverschiebung hat zur Namensgebung dieser Enzym-Superfamilie geführt – ***P****igment absorbing at* ***450*** *nm* (P450).

Bei der systematischen Namensgebung von P450 werden Informationen über den Herkunftsorganismus und evolutionäre Beziehungen verschlüsselt. Auskunft über Familie und Herkunft gibt die – in Leserichtung – neben CYP stehende arabische Zahl. P450 der Familie 71 bis 99 (sowie CYP701 bis CYP999 und CYP7001 bis CYP9999) stammen beispielsweise aus Pflanzen. Für Tiere (CYP1-49, CYP301-499, CYP3001-4999), niedere Eukaryoten (CYP51-69, CYP501-699, CYP5001-6999) und Bakterien (CYP101-299, CYP1001-2999) sind ebenfalls Zahlenräume reserviert. Ist die Sequenzidentität größer als 40 % so wird die Sequenz derselben Familie zugeordnet. Bei einer Sequenzidentität von mehr als 55 % wird das Enzym derselben Subfamilie zugeordnet und trägt denselben Buchstaben.[188]

Ein Alleinstellungsmerkmal dieser Enzymklasse ist die Vielseitigkeit, die sich in einer Vielzahl katalysierter Reaktionstypen und umgesetzter Substrate widerspiegelt. Dazu gehören Hydroxylierungen, N- und S- Oxidationen, Epoxidierungen, Decarboxylierungen, Desaminierungen, N-, O-, S-Dealkylierungen, Dehalogenierungen, Isomerisierungen, Dimerisierungen und ungewöhnliche Reaktionen wie Bayer-Villiger-Oxidationen oder abiologische Reaktionen wie intramolekulare C-H Aminierungen.[189–192]

P450 besitzen als Biokatalysatoren großes Potential für die industrielle Anwendung, da sie unter milden Bedingungen bei hoher Regio-, Chemo- oder Stereoselektivität Reaktionen katalysieren, die mit klassischen chemischen Ansätzen schwierig durchführbar sind.[193] Nur ein Bruchteil der hohen, stetig steigenden Anzahl (>300.000 Sequenzen) der bekannten P450 Sequenzen ist klassifiziert und benannt (~40000, Stand 2018).[194] P450 besitzen folglich ein großes ungenutztes katalytisches Potential. Dieses Potential wird durch die unverzichtbare Rolle der Enzyme in vielen entscheidenden biologischen Prozessen unterstrichen. Die akzeptierten Zielmoleküle sind häufig medizinisch relevante Naturstoffe oder Vorstufen.[195] Im menschlichen Körper sind zum Beispiel CYPA1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 essentielle P450-Enzyme, die maßgeblich an der Verstoffwechslung von Xenobiotika in der Leber beteiligt sind.[196,197] Ein wichtiges kommerzielles Anwendungsgebiet von P450 liegt daher bei der Beurteilung neuer Arzneimittel. Für deren Zulassung sind auch die Toxizität ihrer Metabolite und deren Neben- und Wechselwirkungen zu berücksichtigen.[198] In der Praxis werden dazu Pharmazeutika *in vitro* oder *in vivo* durch rekombinant produzierte, humane P450 verstoffwechselt, um die Struktur der Metabolite zu entschlüsseln und die Toxizität zu untersuchen.[199]

Die Substrate, die von P450 umgewandelt werden, haben mehrheitlich einen hydrophoben Charakter. P450 besitzen deshalb Relevanz bei der selektiven Oxyfunktionalisierung hydrophober Substrate wie Steroide.[200–202] An der *de novo* Synthese von Hydrocortison aus Glucose in *S. cerevisiae* sind beispielsweise insgesamt vier P450 aus Säugetieren beteiligt (CYP11A1 CYP11B1 CYP17A1 und CYP21A1).[203] P450 besitzen aufgrund ihrer reaktiven Vielseitigkeit, der Fähigkeit zur C-H-Aktivierung in Verbindung mit teilweise hoher Enantio-, Regio-, Chemoselektivität und Spezifität ein großes, theoretisches Potential für industrielle Anwendungen. Mögliche Hindernisse für eine industrielle Anwendung sind Eigenschaften wie die verhältnismäßig niedrige Stabilität und Aktivität sowie die Abhängigkeit von Kofaktoren.[204]

1.5.1 Eigenschaften Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus Pflanzen

Pflanzliche P450 sind mit wenigen Ausnahmen membrangebunden.[205] Pflanzliche P450 kommen hauptsächlich als Klasse II Redoxsysteme vor und ihre natürlichen RP sind ebenfalls

membranständige Cytochrom-P450-Reduktasen (CPR).[206,186] Die physiologische Bedeutung in Pflanzen wird anhand der Anzahl in verschiedenen Pflanzen vorkommender P450 deutlich. So wurden beispielsweise in *A. thaliana* 245 und in *Oryza sativa* 332 P450 identifiziert.[205] Grundsätzlich können pflanzliche P450 nach A-Typ und Nicht-A-Typ klassifiziert werden. Während A-Typ Monooxygenasen im Sekundärstoffwechsel verankert sind und spezialisierte Reaktionen katalysieren, sind Nicht-A-Typ Monooxygenasen an der Synthese von lebenswichtigen Substanzen wie Fettsäuren und Hormonen beteiligt.[207–210] Aus genetischer Perspektive sind die in Pflanzen vorkommenden Familien an Monooxygenasen überschaubar. Die konservierten Positionen verschiedener Introns sind ein guter Indikatior für die evolutionäre Verwandtschaft.[208,211] Ein Großteil, der in Pflanzen sequenzierten P450 entfällt auf die CYP71-Familie (60 %). Einen weiteren großen Anteil stellen P450 aus den Familien CYP85 (13 %) CYP86 (9 %) und CYP72 (10 %) dar.[212] Mit wenigen Ausnahmen[213] sind pflanzliche P450 als integrale Membranproteine des ER in Richtung des Zytosols orientiert und der N-Terminus folgt jeweils einem ähnlichen Aufbau[214]: Zu Beginn der Sequenz steht ein Sekretionssignal, an welches die hydrophobe Membrandomäne grenzt. Darauf folgt ein Abschnitt, der einen basischen Charakter besitzt und häufig auch eine prolinreiche Region ([P/I]PX[P/G]XP). [211,215–219]

Durch die steigende Bedeutung der synthetischen Biologie bei der Synthese hochpreisiger Substanzen gewinnen pflanzliche P450 zunehmend Bedeutung für die pharmazeutische Industrie bei der Synthese hochpreisiger pflanzlicher Substanzen und pharmazeutischer Erzeugnisse.[220] In einer multienzymatischen *de novo* Synthese von Artemisinin katalysiert die CYP71AV1 aus *A. annua* die Oxidation von Amorpha-4,11-dien zu Artemisininsäure.[221] Auf dem Weg zur *de novo* Synthese von Taxol wird eine Taxol-Vorstufe aus der 5α-Oxidation von Taxadien durch CYP725A4 katalysiert.[222,223]

Der synthetische Wert pflanzlicher P450 liegt auch in ihrer Fähigkeit hochspezialisierte oder ungewöhnliche Reaktionen wie Phenolkupplungen oder C-C-Spaltungen zu katalysieren.[224] Häufig ist diese Spezialisierung, möglicherweise bedingt durch geringen evolutionären Druck, von geringer katalytischer Aktivität begleitet. Für diese Arbeit ist ein Beispiel aus der TIA Biosynthese – die Umwandlung der Iridoid-Struktur in die Seco-Iridoid-Struktur – von besonderer Relevanz. Durch die CYP72A224 wird zunächst eine Hydroxylierung von 7-Deoxyloganinsäure katalysiert, der nach einem weiteren Zwischenschritt eine Öffnung des Fünfrings zur Seco-Iridoid-Struktur durch die CYP72A1 folgt (Siehe Kapitel 1.4). Nicht nur stellt diese Ringöffnung eine für P450 sehr ungewöhnliche Reaktion dar, sondern

darüberhinaus wird eine Aldehydgruppe erzeugt, welche die Kondensationsreaktion mit Tryptamin und damit die Biosynthese der TIA überhaupt erst ermöglicht.

1.5.2 Heterologe Expression von Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus Pflanzen

Die im Vergleich zu P450 aus anderen Domänen des Lebens oft komplexe Handhabbarkeit pflanzlicher P450 resultiert aus ihrer Mebranständigkeit und gleichzeitigen Abhängigkeit von RP. Dennoch ziehen diese Enzyme großes akademisches aber auch wirtschaftliches Interesse auf sich.[225] Pflanzliche P450 können in Bakterien, Hefen, Insektenzellen und Säugerzellen exprimiert werden.[210] Die Auswahl des Wirtes ist je nach Zielprotein abhängig von Faktoren wie experimentellem Aufwand, Kosten zur Zellkultivierung, Kodonhäufigkeit, der Befähigung zur Durchführung posttranslationaler Modifikationen sowie den wirtseigenen Mechanismen zur Membraninsertion integraler Membranproteine. Die Herstellung pflanzlicher P450 in einem prokaryotischen Wirt wie *E. coli* ist aufgrund ihres Vorkommens als bitopische Transmembranproteine und der gravierenden physiologischen Unterschiede zu Pflanzen eine Herausforderung: Das Fehlen innerer Membranen – wie der ER-Membran – bewirkt, dass die hydrophoben Membrananker in *E. coli* nicht in eine Lipiddoppelschicht inkorporiert werden können. Im Resultat wird durch die hydrophobe Natur der Membrananker eine Bildung von Proteinaggregaten in Form von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) begünstigt.[226–228] *E. coli* besitzt im Vergleich zu eukaryotischen Organismen eine eingeschränkte Befähigung für posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Glycosylierungen oder die Ausbildung von Disulfidbrücken.[229] Die abweichende Kodonpräferenz von *E. coli* kann des Weiteren eine Kodonoptimierung zur Notwendigkeit werden lassen.

Das Vorhandensein eines Häm-Anabolismus[230] erfüllt die Grundvoraussetung für eine Herstellung dieser Zielproteine in *E. coli*. Es existieren unterschiedliche Strategien, um eine lösliche und funktionale, heterologe Produktion von membranständigen P450 in unterschiedlichen Mikroorganismen zu ermöglichen.[231]

Für die Herstellung pflanzlicher P450 in *E. coli* gibt es derzeit keinen allgemeingültigen Ansatz, sondern eine Zahl unterschiedlicher Herangehensweisen[232]. Diese können bei unterschiedlichen Proteinen zum Erfolg, Misserfolg oder unterschiedlichen Titern bei der heterologen Expression führen. Deshalb wird nach aktuellem Wissensstand ein Spektrum verschiedener Strategien für jede P450 auf empirische Weise evaluiert. Ansätze zur erfolgreichen heterologen Herstellung eukaryotischer P450 in Bakterien umfassen Fusionen mit Löslichkeitshelfern wie beispielsweise *Maltose-binding protein* (MBP)[233,234], *green fluorescent protein*[235,236], Einführung amphipathischer Helices[237], Fusion mit MBP in Kombination mit ApoA1*[238],

Koexpression von Chaperonen[239], Einkapselung in Nanodisks[240] oder Einlagerung in die Membran durch Fusion mit *OmpA*[241].

In Bezug auf pflanzliche P450 sind Literaturbeispiele der oben genannten Strategien eher eine Seltenheit. Es existieren einige Berichte über Fusionen mit einer CPR, die zu funktionalem Enzym führen können. Beispiele sind CYP73A1 aus *A. thaliana*[242], CYP93C1V2 aus *Glycine max*[243] oder CYP72A1 aus *C. roseus*[143]. Die Anpassung der natürlichen Membransequenz des Proteins an die Membran des heterologen Wirts durch Modifikationen am N-Terminus ist die in der Literatur am häufigsten als erfolgreich dokumentierte Strategie zur heterologen Produktion pflanzlicher P450 in *E. coli*. Üblicherweise umfassen diese Anpassungen der Aminosäuresequenz des Membranankers eine Kombination aus Deletionen und Substitutionen mit variierendem Ausmaß. Obwohl Ausnahmen dokumentiert sind (z.B.: CYP53A13 oder CYP53A17 aus *C. tropicalis)*[244], dienen üblicherweise kurze Sequenzen, die entweder auf der Sequenz der mikrosomalen CYP17A1 aus *B. taurus* (ALLLAVFL)[245] oder auf einer trunkierten Sequenz der mikrosomalen CYP2C3 aus *O. cuniculus* (AKKTSSKGK)[246,247] basieren, als Vorlage für Substitutionen. Eine Auswahl aus zahlreichen literaturbekannten Beispielen auf Basis der CYP2C3 ist die Expression der CYP701A1 aus *A. thaliana*[248] oder der CYP76M7 aus *O. stativa*[249]. Ausgewählte Beispiele für pflanzliche P450, die mittels einer derartigen hydrophoben Modifikation der N-terminalen Aminosäuresequenz funktional in *E. coli* exprimiert wurden, sind die CYP71D18 aus *Mentha spicata*[250] oder die CYP725A4 aus *Taxus cuspidata*[251,223]. Eine große Zahl von Faktoren – wie die Wahl des Expressionsvektors oder Nähe der kodierenden Sequenz zur ribosomalen Bindestelle – können auch nach einer N-terminalen Modifikation einen großen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Enzym ausüben.[252] Weiterhin hat die Wahl des Expressionsstamms einen großen Einfluss auf die Expression. Die für die Produktion von Membranproteinen optimierten Stämme *E. coli* C41(DE3) und C43(DE3)[253] zeigen häufig höhere Ausbeuten des Zielproteins als gängige Alternativen wie JM109[254]. Weitere wichtige Expressionsparameter sind Expressionsdauer, Temperatur, pH-Wert, Medium und Zusätze (5-ALA, IPTG, Spurenelemente).

1.5.3 Katalysezyklus und Struktur von P450

Obwohl teilweise signifikante Sequenzunterschiede zwischen verschiedenen P450 vorliegen, besitzen alle Enzyme der P450 Superfamilie prinzipiell dieselbe zugrundeliegende Tertiärstruktur und Topologie.[255,209] Sequenziell gibt es nur drei absolut konservierte Aminosäuren, das EXXR-Motif und ein Cystein, welches über den Thiolatrest das Häm-Eisen-Zentralatom axial koordiniert. Die prosthetische Häm-b-Gruppe mitsamt sechsfach koordinierten Eisen-Zentralatom ist von zentraler Wichtigkeit für die katalytischen

Eigenschaften von Cytochrom-P450-Monooxygenasen. Das in der *Cys-pocket* gelegene Cystein erfüllt als axialer Ligand des Häm-Eisens eine entscheidende mechanistische Funktion für die katalytische Aktivität von P450.[256–259]

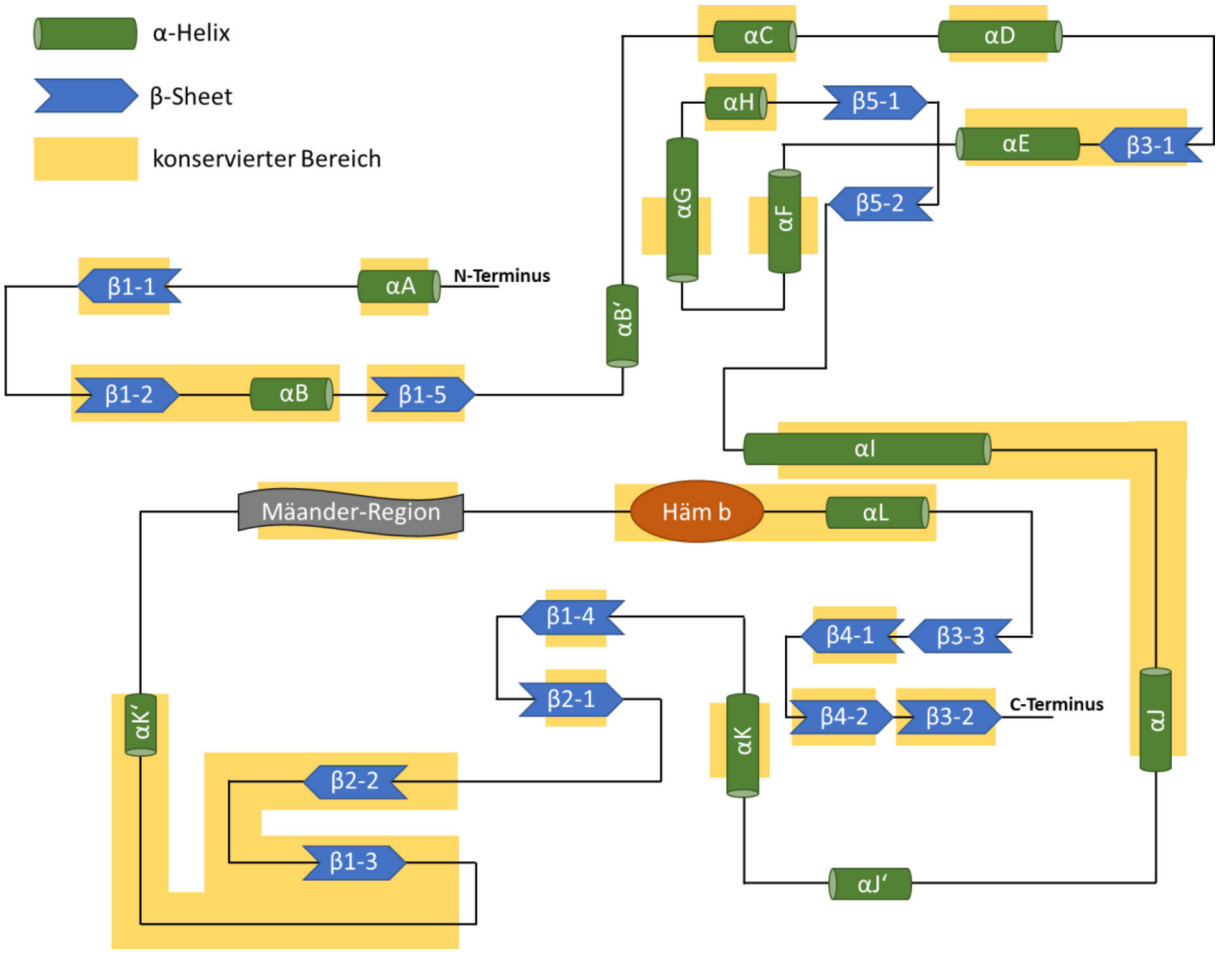

Abbildung 1.7 – Topologische Darstellung konservierter Bereiche bei Cytochrom-P450-Monooxygenasen basierend auf Struktur-*Alignments*. α-Helices sind grün und β-Faltblätter blau gekennzeichnet. Strukturbereiche, welche durch Superposition von 31 Strukturen eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen, sind gelb hinterlegt. Abgewandelt nach Sirim *et. al* 2010[260].

Die Tertiärstruktur von Cytochrom-P450-Monooxygenasen ähnelt in der Form entfernt einem trigonalen Prisma. Die prosthetische Häm-b-Gruppe ist etwa parallel zu einer der trigonalen Flächen ausgerichtet.[261–263] Die strukturelle Ähnlichkeit von unterschiedlichen P450 nimmt mit der Nähe zur Häm-Gruppe zu. Die am höchsten konservierten Regionen erstrecken sich auf das Gebiet zwischen αI und αL-Helix und sind an der Bindung von Häm und der Stabilisierung des aktiven Zentrums beteiligt.[264]

Nennenswerte wiederkehrende Strukturmotive sind das Vier-Helix-Bundle, welches aus αD, αE, αI und αL besteht und zudem die Helices αJ und αK, die zusammen den Kern des Proteins bilden (Abbildung 1.7).[261,260] Die Mäanderregion zwischen αK‘ und αL besitzt keine klassische Sekundärstruktur, jedoch sorgen eine Reihe von elektrostatischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken für eine hochkonservierte Struktur, die funktionell der Häm-Bindung

zugeordnet werden kann [264]. Die I-Helix besitzt ein Strukturmotiv (A/G G X D/E T T/S), das mit der Bindung und Aktivierung molekularen Sauerstoffs in Verbindung gebracht wird.[207,265] Die β-Faltblätter β1 und β5 bilden den Substratkanal.[266] Distale Strukturelemente wie die α-Helices αB‘, αC und αG, sowie Abschnitte der α-Helices αI und αF besitzen eine höhere strukturelle Variabilität zur Protein-Substratinteraktion. Ebenfalls variabel sind die sechs *substrate recognition sites*.

Diese sind in den α-Helices αB‘, αF, αG und αI, sowie den β-Faltblättern β1-4 und β4-1 gelegen.[267] Eine Substratinteraktion oder Aufnahme bewirkt eine Konformationsänderung[261], die bei $P450_{cam}$ Bereiche der αF und αG sowie die F/G-Loop-Region betrifft und bei Substrateintritt eine Öffnungs- und Schließbewegung durchführen. Es wurden außerdem Veränderungen in der αB‘-Helix verzeichnet.[268,269]

Alle P450 folgen praktisch demselben katalytischen Zyklus zur reduktiven Spaltung molekularen Sauerstoffs. Reaktionsphysikalische Parameter und Reaktionsprodukte können jedoch stark variieren.[270] Die Tatsache, dass so viele verschiedenartige Reaktionen katalysiert werden, obwohl die Sauerstoffaktivierung einem festen Ablauf folgt, beruht auf der Reaktivität der nach der Spaltung von Sauerstoff erzeugten Eisen-Oxo-Komplexe. Diese hohe Reaktivität bedeutet zugleich eine große potenzielle Promiskuität gegenüber vielen möglichen Reaktionspartnern. Diese Anfälligkeit der gebildeten reaktiven Sauerstoff-Spezies gegenüber Nebenreaktionen wird durch den Aufbau des aktiven Zentrums durch Selektion der Substrate, Substratbindestellen, und Koordination im aktiven Zentrum moduliert.[271]

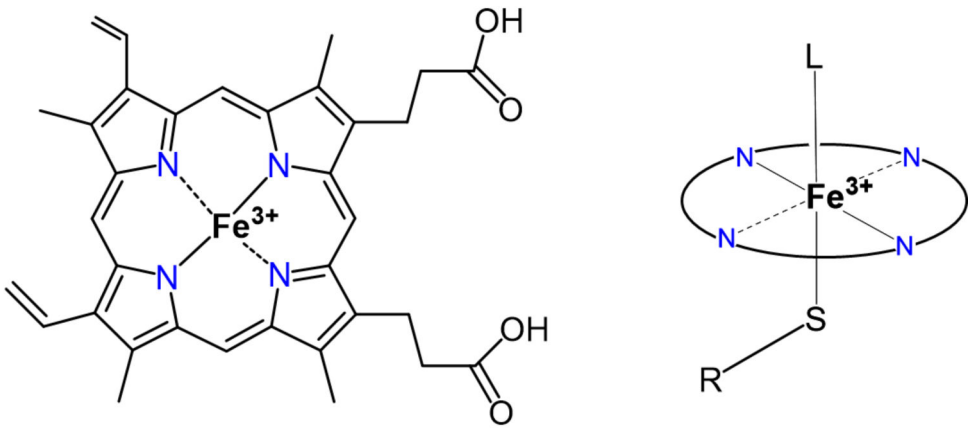

Abbildung 1.8 – Häm-b prosthetische Gruppe.
Auf der linken Seite ist der Häm-b-Ligand mit koordiniertem Eisen Zentralatom abgebildet. Rechts ist die Koordinationssphäre des Eisen-Zentralatoms abgebildet. Diese besteht aus vier äquatorialen Porphyrin-Stickstoff-Atomen (N), dem axialen Thiolatliganden (**S**) sowie der variablen Koordinationsstelle L, die während der Katalyse Disauerstoff koordiniert.

Im Zentrum des Porphyrinliganden ist das Eisen-Metallion von vier Stickstoffatomen der Häm-b-Gruppe äquatorial koordiniert (Abbildung 1.8). Eine der axialen Koordinationsstellen

wird durch den Thiolatliganden eingenommen. In Abhängigkeit von der Oxidationszahl des Eisenatoms ist die zweite axiale Koordinationsstelle unterschiedlich belegt (Abbildung 1.9).

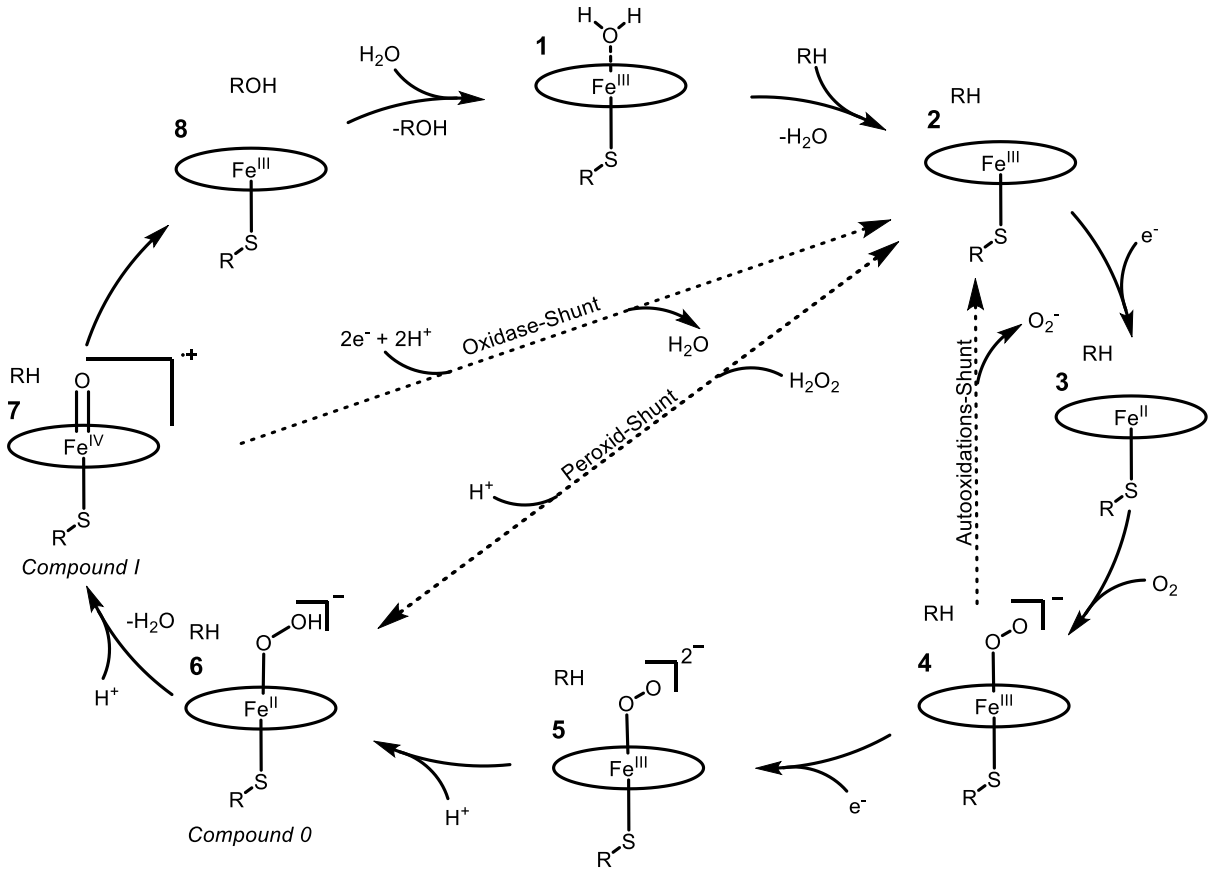

Abbildung 1.9 – Katalytischer Zyklus von Cytochrom-P450-Monooxygenasen bei einer Hydroxylierungsreaktion in schematischer Darstellung. Der eingezeichnete Kreis steht für den Porphyrin-Liganden. Abgewandelt nach Krest *et. al.* 2013[272].

Im Ruhezustand (1) ist das Eisen- Zentralatom dreiwertig und besitzt einen distalen H_2O-Liganden. Dieser wird im ersten Schritt vom Substrat verdrängt (2). Die Substitution des H_2O-Liganden und die Protein-Substrat-Wechselwirkung bewirkt eine Veränderung der Ligandenfeldaufspaltung der d-Orbitale des Eisens und begünstigt einen Übergang vom *Low-Spin*-Zustand in den *High-Spin*-Zustand.[273] Dies geht mit einer Erhöhung des Redoxpotentials einher, die im Folgeschritt die Aufnahme eines Elektrons begünstigt.[274] An das resultierende zweiwertige Eisen (3) lagert sich zuerst molekularer Sauerstoff unter Bildung eines *end-on* Eisen(III)-Hyperoxid-Komplexes (4) an. Dabei wird Elektronendichte teilweise vom Eisen auf Disauerstoff übertragen.[270] Durch Aufnahme eines zweiten Elektrons wird dieser zu einer Eisen-III-Peroxid Spezies (5) umgewandelt. Der Peroxo-Komplex nimmt ein Proton unter Bildung eines Eisen(III)-Hydroperoxo-Komplexes auf, der auch als *Compound 0* (6) bekannt ist. Auch nach Aufnahme des Protons liegt der distale Sauerstoff-Ligand in *end-on* Stellung.[275] Spektroskopische Untersuchungen der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung deuten auf eine

Schwächung der Bindung durch Aufnahme des ersten Protons hin.[276] Im Folgeschritt wird ein weiteres Proton aufgenommen und dadurch die reduktive heterolytische Spaltung des Disauerstoffs eingeleitet. Der Eisen(III)-Hydroperoxo-Komplex bildet unter Abspaltung von Wasser ein Eisen(IV)-Oxo-Porphyrin-Radikalkation (7). Bei diesem Vorgang bewirkt der proximale Cysteinat-Ligand einen *Push*-Effekt und ermöglicht die Spaltung des molekularen Sauerstoffs.[277]

Die negative Ladung des Liganden in Kombination mit σ- und π-Donor-Effekten begünstigt zusätzlich die Aufnahme des für die Abspaltung von Wasser benötigten zweiten Protons um etwa 81 kcal/mol.[278] Der Radikalcharakter des hochreaktiven Zwischenprodukts wird dabei durch Beteiligung des Porphyrin- und Cysteinat-Liganden stabilisiert.[279] Das Eisen(IV)-Oxo-Porphyrin-Radikalkation (*Compound I)* ist üblicherweise die katalytisch aktive Spezies, die sogar C-H-Bindungen zu oxyfunktionalisieren vermag.[280,272] Bei dem von Groves vorgeschlagenen *Rebound*-Mechanismus für die aliphatische Hydroxylierung wird im ersten Schritt durch das Radikalkation (*compound I*) ein Wasserstoff-Radikal vom Substrat abstrahiert (7a, Abbildung 1.10). Der resultierende Eisen-IV-Hydroxyl-Radikalkomplex (7b), ist auch als *Compound II* bekannt. Aus röntgenabsorptionsspektroskopischen Untersuchungen geht hervor, dass die Fe-O-Bindungslänge (Fe^{IV}-OH: 1,82 Å) einer protonierten Spezies entspricht.

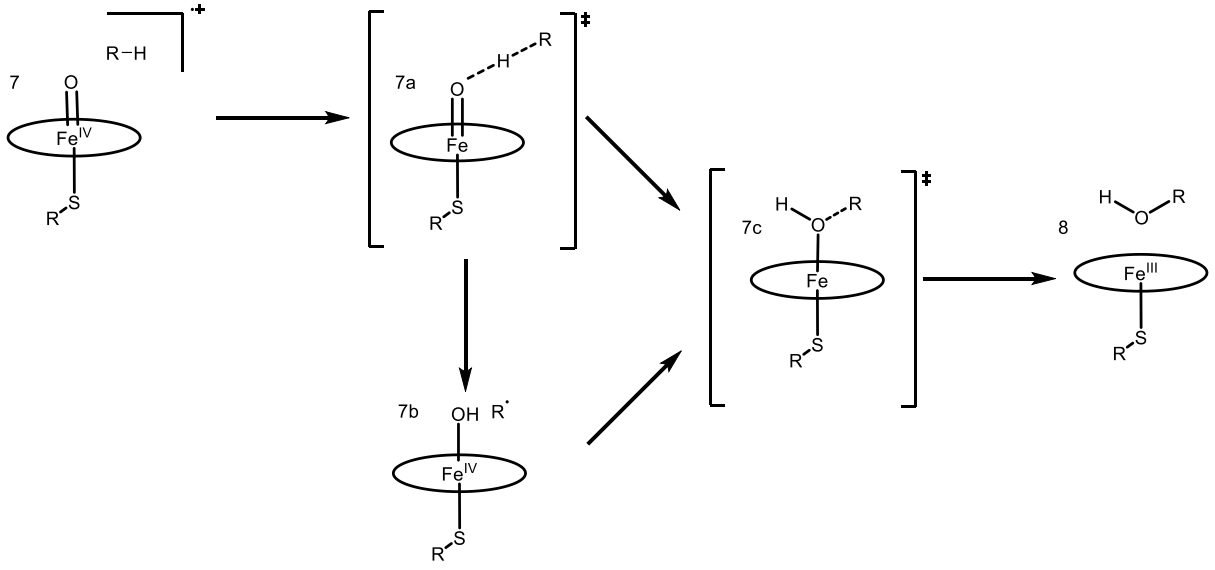

Abbildung 1.10 – Rebound-Mechanismus bei der Hydroxylierung von Kampfer durch CYP101A1.
Der eingezeichnete Kreis steht für den Porphyrin-Liganden. Abgewandelt nach Groves 2006[281].

Die Eisen(IV)-Oxo-Komplexe sind von basischer Natur (pKa > 8,2) was auf die Wirkung des Thiolatliganden als Elektronendonor zurückzuführen ist und sowohl die Abstraktion des Protons ermöglicht, als auch die Ipso-Oxidation des Proteins verhindert.[282,283] Im Folgeschritt (*rebound*) wird *Compound* II wieder mit dem Substratradikal unter Bildung des hydroxylierten

Produkts und eines Eisen(III)-Komplexes (8) vereinigt. Die Übertragung von Sauerstoff verläuft unter Retention der Konfiguration. Der Eisen(III)-Komplex wird durch Ligation von Wasser wieder in den Grundzustand (Abbildung 1.9, 1) zurückversetzt.[284–286,281] Es gibt Ausnahmen, bei denen nicht *Compound I,* sondern eine der reaktiven Vorstufen wie unter anderem der Eisen-(III)-Hydroperoxid-Komplex katalytisch aktiv ist. Häufig führen diese Ausnahmen zu C-C-Spaltungen. So katalysiert die humane CYP1A2 eine C-C-Spaltung über einen nukleophilen Angriff des Eisen-(III)-Peroxid-Anions auf die Carbonylgruppe an Nabumeton.[287] Diese Umwandlung ist auch mit der Umsetzung von Progesteron zu Androstendion vergleichbar, bei der die CYP17A1 eine C-C-Spaltung katalysiert.[288] Diese verläuft ebenfalls über einen nukleophilen Angriff des Eisen-(III)-Peroxid-Anions auf die Carbonylgruppe am Progesteron.[289,290] Als Konsequenz der hohen Reaktivität der Intermediate gibt es unproduktive Nebenreaktionen, die in Konkurrenz zum produktiven Zweig der Sauerstoff-Aktivierung stehen. Die Dissoziation von Dioxygen(-1), Hyperoxid vom Eisen-III-Hyperoxid-Komplex(4) (Autooxidations-*Shunt*) wird begünstigt, wenn die folgende Reduktion nicht schnell oder effizient genug verläuft. Für den Fall, dass die zweite Protonierung des kurzlebigen Hydroperoxo-Komplexes nicht stattfindet, kann ein Hydroperoxo-Anion in Form von Wasserstoff-Peroxid abgespalten werden (Peroxid-*Shunt*). Letztlich ist auch der hochreaktive *Compound I* anfällig für eine unproduktive Nebenreaktion, indem der aktivierte Sauerstoff unter Verbrauch von NAD(P)H als Wasser abgespalten wird (Oxidase-*Shunt*). Dieser in der Summe als Entkopplung bezeichnete unproduktive Reaktionsfluss kann besonders beim Einsatz nicht-physiologischer RP relevant sein. Eine veränderte Geometrie der RP-P450-Interaktion und die damit verbundene Störung des Protonentransports sind naheliegende Ursachen.

1.5.4 Redoxpartner

Der Elektronenbedarf zur heterolytischen Spaltung von Sauerstoff durch P450 wird unter Beteiligung einer enzymatischen Redoxkette aus der Oxidation von NAD(P)H gedeckt. Trotz der genetischen Verwandtschaft innerhalb der P450-Superfamilie gibt es eine Vielzahl verschiedener RP-Systeme, die in einer möglichen Kategorisierung nach Hannemann *et al.* in zehn unterschiedliche Klassen gruppiert werden können.[186]

Sie unterscheiden sich anhand der beteiligten Kofaktoren, prosthetischen Gruppen und ihrer Konfiguration. Grob lassen sich die NAD(P)H-abhängigen Redoxsysteme der verschiedenen Klassen auch anhand der Anzahl der am Elektronenübertrag beteiligten Enzyme in Ein-, Zwei- oder Drei-Komponenten-Systeme (Abbildung 1.11) unterteilen.[291] Das Grundprinzip des Elektronenübertrags ist bei den meisten Systemen sehr ähnlich. Unter Oxidation von

Kofaktoren, überwiegend NADPH oder NADH, werden Elektronen auf die Flavinadenindinukleotid-Domäne (FAD) einer Reduktase übertragen.

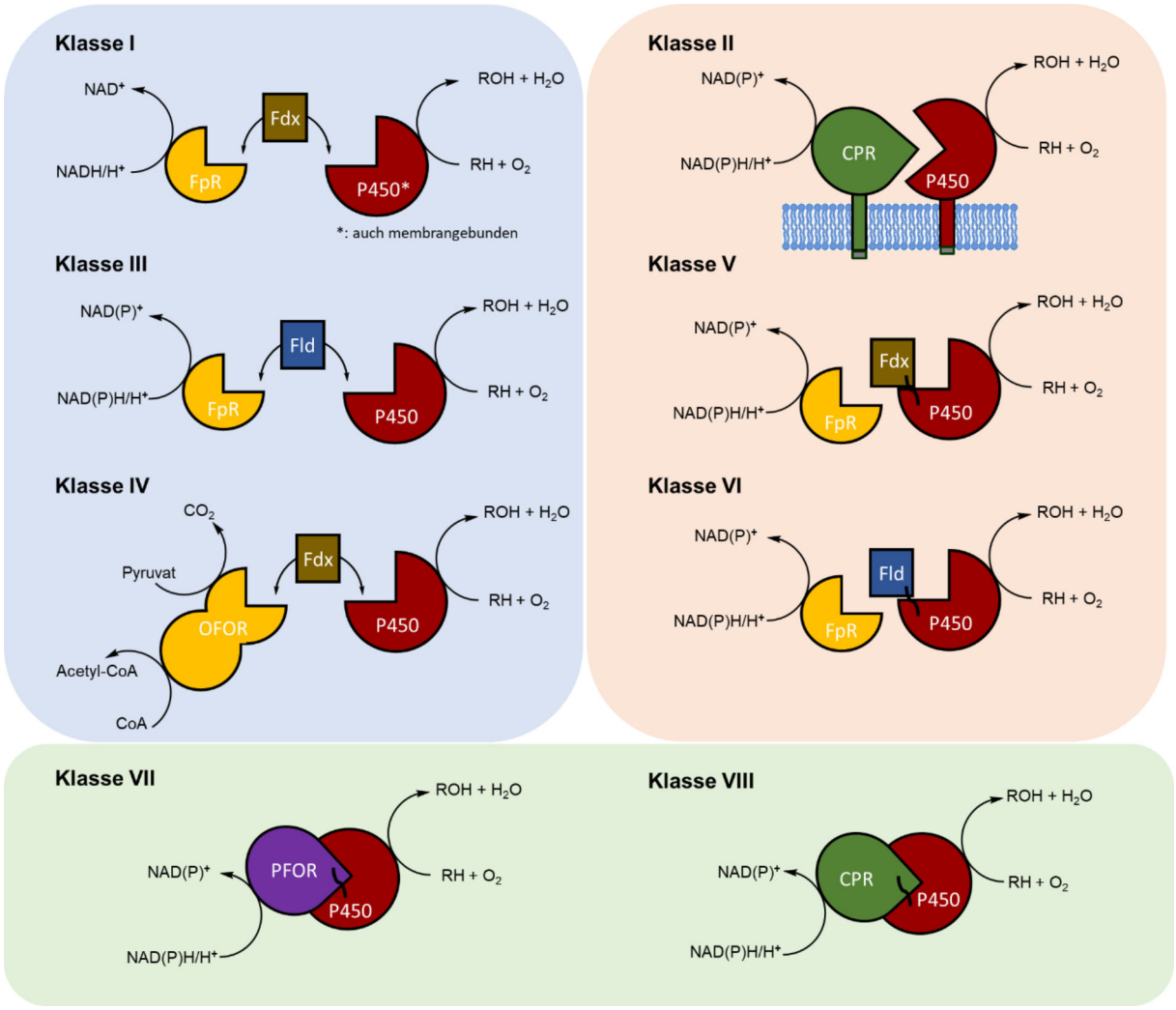

Abbildung 1.11 – Schematische Darstellung der nicht-autonomen Ein-, Zwei- oder Drei-Komponenten P450-Redoxsysteme. RP-Systeme der Klassen I III und IV (blau hinterlegt) bestehen inklusive der P450 aus drei Enzymen. Eine Reduktase (FpR, PFOR) überträgt Elektronen auf ein flavinhaltiges Flavodoxin (Fld) oder den Eisen-Schwefel Cluster eines Ferredoxins (Fdx), welches als Elektronenshuttle zur Deckung des Elektronenbedarfs der P450 Katalyse dient. In Systemen der Klasse II, V und VI (rot hinterlegt) kommen Fusionen in unterschiedlicher Konfiguration vor. CPR enthalten sowohl eine FAD als auch eine FMN Domäne und erfüllen eine Doppelfunktion als Reduktase und Elektronenshuttle. Innerhalb der bimolekularen Redoxketten gibt es außerdem Fusionen von P450 und Flavodoxin/Ferredoxin. In Klasse VII und VIII (grün hinterlegt) fallen autonome Systeme, die eine Fusion aus P450 und der vollständigen Redoxkette darstellen. Modifiziert nach Hanneman *et. al* 2007[186].

Diese reduziert im Folgeschritt einen Elektronenakzeptor, der die Elektronen an das Häm-gebundene Eisenatom der P450 überträgt. Drei-Komponenten-Systeme der Klasse I, III und IV kommen – mit Ausnahmen innerhalb der Klasse I, der mitochondriale Beispiele zugeordnet sind – vorwiegend in Bakterien vor. Die Redoxkette besteht neben der P450 aus einer FAD abhängigen Ferredoxin/Flavodoxin-Reduktase (FpR) und einem Elektronenakzeptor, entweder eisen-schwefelcluster-haltiges Ferredoxin (Fdx, Klasse I & IV) oder flavinmononukleotid-haltiges Flavodoxin (Fld, Klasse III). Zwei-Komponenten-Systeme

der Klasse II, V und VI treten in Eukaryoten und Prokaryoten auf. Besondere Relevanz besitzen Klasse II Systeme, die fast ausschließlich in Eukaryoten vorzufinden sind. Sie bestehen aus einer P450 sowie einer NAD(P)H abhängigen Cytochrom-P450-Reduktase (E.C.1.6.2.4). Die CPR, die sowohl eine FAD- als auch eine FMN-Bindedomäne besitzt, kann vereinfacht als eine Fusion aus einer FAD-abhängigen Reduktase und Flavodoxin verstanden werden. Der Weg des Elektronentransports verläuft intramolekular von FAD zu FMN, bevor die Reduktion der P450 stattfindet. Klasse II Systeme sind fast immer Transmembranproteine des ER. Varianten der Klasse II beinhalten Redox-Transportwege, bei denen Cytochrom b5 ($Cytb_5$) am Elektronenübertrag auf die P450 beteiligt ist.[292]

Bekannt sind hier sowohl Reaktionen, bei denen eines der zwei zur Katalyse benötigten Elektronen durch $Cytb_5$ beigetragen wird, als auch beide ohne Beteiligung der CPR. Pflanzen besitzen im Gegensatz zu anderen Eukaryoten je nach Spezies ein bis drei homologe CPR.[293] Das *A. thaliana*-Genom enthält Sequenzen für drei homologe CPR (ATR1, ATR2 und ATR3).[294–296] In *C. roseus* wurden ebenfalls drei homologe CPR identifiziert.[297,298] Demgegenüber steht die große Zahl von P450-Sequenzen die in Pflanzen identifiziert wurden.[212] So ist naheliegend, dass die homologen CPR jeweils unterschiedliche Aufgaben im Primär- oder Sekundärmetabolismus erfüllen.[299]

Systeme in denen eine Tripelfusion aus Reduktase, Flavodoxin und P450 stattgefunden hat, werden in Klasse VII und VIII eingeteilt (grün hinterlegt). Die CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* (BM3) – ein Ein-Komponentensystem – umfasst eine Fusion einer CPR und einer P450 Domäne. Sie katalysiert die ω-Hydroxylierung langkettiger Fettsäuren.[300,301] Der gesamte Elektronentransportweg verläuft intramolekular und weist daher eine vergleichbar hohe Effizienz der Elektronenübertragung auf. Dies ist ein Grund für die im Vergleich zu anderen P450 sehr hohe Aktivität der BM3; beispielsweise von etwa 5000 min^{-1} bei der Umsetzung von Arachidonsäure.[302,303,274]

1.6 Ziele der Arbeit

Die Entwicklung neuer ortsflexibler Methoden zur Produktion von Medikamenten, die zugleich bedarfsgerecht skaliert werden können, ist von großer gesellschaftlicher Bedeutung. Die Synthetische Biologie bietet für die genannten Produktionsanforderungen einen vielversprechenden Lösungsansatz. Ein entscheidender Schritt zur Synthese von TIA in einem relevanten Maßstab ist die mikrobielle Synthese des Schlüsselintermediats Strictosidin.

Eine existierende Biosynthese des TIA Schlüsselintermediats Strictosidin in *S. cerevisiae* im Labormaßstab liefert niedrige Strictosidin-Ausbeuten, die sich auf dem Niveau einer Machbarkeitsstudie bewegen. Bisherige Unternehmungen, um die Strictosidin-Ausbeute der bis zu 17-Stufigen Reaktionsfolge zu verbessern, beschränken sich auf die frühen Reaktionsschritte. Es liegen nach derzeitigem Wissensstand keine Studien mit dem Ziel einer Optimierung der letzten Schritte bis Strictosidin vor. Eine Schlüsselumwandlung – die Ringöffnung der Iridoid-Struktur – wird durch CYP72A1 katalysiert, bevor das Reaktionsprodukt Loganin mit Tryptamin durch STR zu Strictosidin kondensiert. CYP72A1 steht im Verdacht, die Strictosidin-Ausbeute zu limitieren. Die lückenhafte Forschung an diesem Teil der Kaskade kann durch die Tatsache begründet werden, dass gleich zwei der letzten vier Schritte durch pflanzliche P450 katalysiert werden. Diese Enzyme und ihre nativen RP sind besonders anspruchsvoll in ihrer Handhabung. Des Weiteren ist die Analytik der Reaktanden eine Herausforderung, belegt durch die auffällig hohe Anzahl an Veröffentlichungen zu diesem Thema.

Um die beschriebene Lücke zu schließen, soll die CYP72A1 aus *C. roseus* in *E. coli* hergestellt werden. Es soll die Aktivität der CYP72A1 mit kompatiblen RP rekonstituiert und anschließend soll eine biochemische Charakterisierung durchgeführt werden. Auf Basis der rekonstituierten Aktivität der CYP72A1 soll unter Beteiligung von LAMT und STR eine biokatalytische *in vitro* Kaskade zur Umwandlung von Loganinsäure zu Strictosidin entwickelt werden. Die hohe Kontrolle über Reaktionsbedingungen und Verhältnisse der Reaktionskomponenten, die durch ein solches *in vitro* System erreicht wird, soll als Werkzeug zur Untersuchung und Optimierung der Kaskade ausgenutzt werden. Um eine Evaluation der Reaktionen zu ermöglichen, sollen geeignete analytische Methoden gefunden werden, die eine quantitative Analyse der Kaskaden erlauben.

2 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Enzyme aus einem Teil des pflanzlichen Seco-Iridoid Stoffwechselpfads in *E. coli* produziert werden. Mit dem Ziel die biokatalytische Umwandlung von Loganinsäure zu Strictosidin *in vitro* nachzubilden, sollte die katalytische Aktivität der isolierten Enzyme zunächst in einzelnen und dann aufeinanderfolgenden Reaktionen wiederhergestellt werden. Die Reaktionsfolge sollte auf Basis einer Quantifizierung der Produkte analysiert und im Hinblick auf die katalytische Effizienz optimiert werden.

Der erste Teil der Ergebnisse (Kapitel 2.1) beschreibt die heterologe Herstellung der CYP72A1 und weiterer P450 aus *C. roseus* in *E. coli*. Zudem werden unterschiedliche Ansätze beschrieben, die mit dem Ziel einer Isolation der CYP72A1 verfolgt wurden. Im zweiten Teil der Ergebnisse (Kapitel 2.2) wird die Rekonstitution der Aktivität der CYP72A1 *in vitro* und eine biochemische Charakterisierung der CYP72A1 beschrieben. Im letzten Abschnitt (Kapitel 2.3) ist die Etablierung und Optimierung einer *in vitro* Kaskade zur Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin beschrieben.

2.1 Herstellung der P450 des späten Seco-Iridoid-Pfads in *E. coli*

Um die Umwandlung von Loganinsäure zu Strictosidin *in vitro* nachzubilden, sollten die an der Reaktionsfolge beteiligten Enzyme in geeigneten Mengen in rekombinanten *E. coli* hergestellt werden. Obgleich die Expression pflanzlicher P450-Gene in *E. coli* anspruchsvoll ist (Kapitel 1.5.2), wurde dieser prokaryotische Wirt aufgrund entscheidender Merkmale ausgewählt: Neben allgemeingültigen Attributen von *E. coli*, welche die Handhabe im Labormaßstab vereinfachen – wie schnelles Wachstum unter vergleichsweise einfachen Bedingungen, leichte Modifizierbarkeit, hoher Grad der Erforschung – ist das Fehlen eigener P450[304–306] im Organismus der ausschlaggebende Grund. Aus dieser Eigenschaft ergeben sich im späteren Verlauf entscheidende Vorteile für die geplante Untersuchung der CYP72A1 wie die vereinfachte Quantifizierung geringer P450-Konzentrationen, mittels CO-Differenzspektrum. Eine definierte P450-Konzentration erlaubt die Verwendung von Zellextrakten anstatt gereinigter P450 für die biokatalytische Charakterisierung der CYP72A1. Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit verschiedene Ansätze zur heterologen Produktion von CYP72A1 in *E. coli* verfolgt.

2.1.1 Analyse der N-terminalen Sequenz der CYP72A1, CYP72A224 und CYP76A26

Um die Umwandlung von Loganin zu Secologanin und die Rolle der CYP72A1 auf die Umwandlung von Loganinsäure zu Strictosidin zu untersuchen, werden ausreichende Mengen

des Enzyms benötigt. Die Membranwechselwirkung spielt bei pflanzlichen P450 eine wichtige Rolle für die korrekte Proteinfaltung und katalytische Aktivität.[209,211,215]

Die Membranregion pflanzlicher P450, die üblicherweise am N-Terminus liegt, muss folglich an die Bedingungen in *E. coli* angepasst werden, um eine heterologe Produktion in biokatalytisch aktiver Form zu erreichen. Gezielte Modifikationen der Aminosäuresequenz am N-Terminus der CYP72A1 sollen die Produktion der P450 in *E. coli* zu ermöglichen. Dazu werden mehr Informationen, insbesondere zur Beschaffenheit des N-terminalen Bereichs, benötigt. Zu diesem Zweck wurde die Sequenz der CYP72A1, und vornehmlich der N-Terminus im Hinblick auf biophysikalische Eigenschaften wie Hydrophobizität analysiert und jeweils mit den benachbarten CYP72A224 und CYP76A26 aus *C. roseus* verglichen. Die aus der Analyse gewonnenen Erkenntnisse sollen im späteren Verlauf als Grundlage für die geplante Modifikation der N-terminalen Sequenz der CYP72A1 dienen.

Die berechneten isoelektrischen Punkte (pI_C) (https://web.expasy.org/compute_pi/, Zugriff am 07.09.2018)[307], weisen den Proteinen einen basischen Charakter zu, der analog zur Abfolge innerhalb des Seco-Iridoid-Pfades steigt (CYP76A26:pI_C = 8,64; CYP72A224: pI_C = 9,20; CYP72A1: pI_C = 9,22) und den Lysin-Gehalt der Proteine widerspiegelt. Die berechneten pI-Werte der CYP72A1 und CYP72A224 weisen insbesondere im Vergleich zu *C. roseus*-P450 aus dem späteren Verlauf der TIA-Biosynthese einen eher basischen Charakter auf. Mikrosomale P450 besitzen einen tendenziell basischen Charakter, der auf der erhöhten Frequenz positiv geladener Aminosäuren (Arginin und Lysin) am Carboxy-Terminus der TM-Domäne[308,309] beruht und auch bei den untersuchten P450 zu finden ist. Die N-terminalen Regionen wurden basierend auf der annotierten TM-Domäne *UniProt Knowledgebase* (UniProtKB)[310], einer genaueren Evaluation unterzogen. Beim Vergleich der Sequenzen wurde sichtbar, dass der grundlegende Aufbau der N-terminalen Region der CYP76A26, CYP72A224 und CYP72A1 ähnlich ist und mit Ausnahmen typisch für pflanzliche P450 (Abbildung 2.1, A). Zu Beginn steht ein Sekretionssignal (grün hinterlegt), an das ein hydrophober Sequenzabschnitt in Form einer Membrandomäne (violett hinterlegt), grenzt. Diesem folgt ein Sequenzabschnitt mit basischem Charakter (blaue Schrift) und häufig auch eine prolinreiche Region ([P/I]PX[P/G]XP). Innerhalb der ersten 50 Aminosäuren des N-Terminus stimmt die vorhergesagte Wahrscheinlichkeit für eine TM-Domäne nur grob mit dem berechneten Verlauf der Hydrophobizität[311] und Hydrophilie[312] (Abbildung 2.1, B, C und D) überein. Zwischen der Hydrophobizität und Hydrophilie der Sequenzen, zeichnet sich jeweils ein reziprokes Verhalten ab. Besonders im Kyte-Doolittle Plot wird deutlich, dass die hydrophoben Strecken der Sequenzen bei CYP72A1 und CYP72A224 kürzer sind als die vorhergesagten TM-Domänen.

Die beobachteten Unterschiede können durch die Vereinfachungen erklärt werden, die bei der Analyse von Proteinen anhand einer Hydrophobizitätsskala angewendet werden. Die Vorhersage der Transmembrandomäne mittels „*hidden Markov model*“[313] (Abbildung 2.1, B) ist in Position und Länge weitgehend mit oberen Einteilung deckungsgleich.

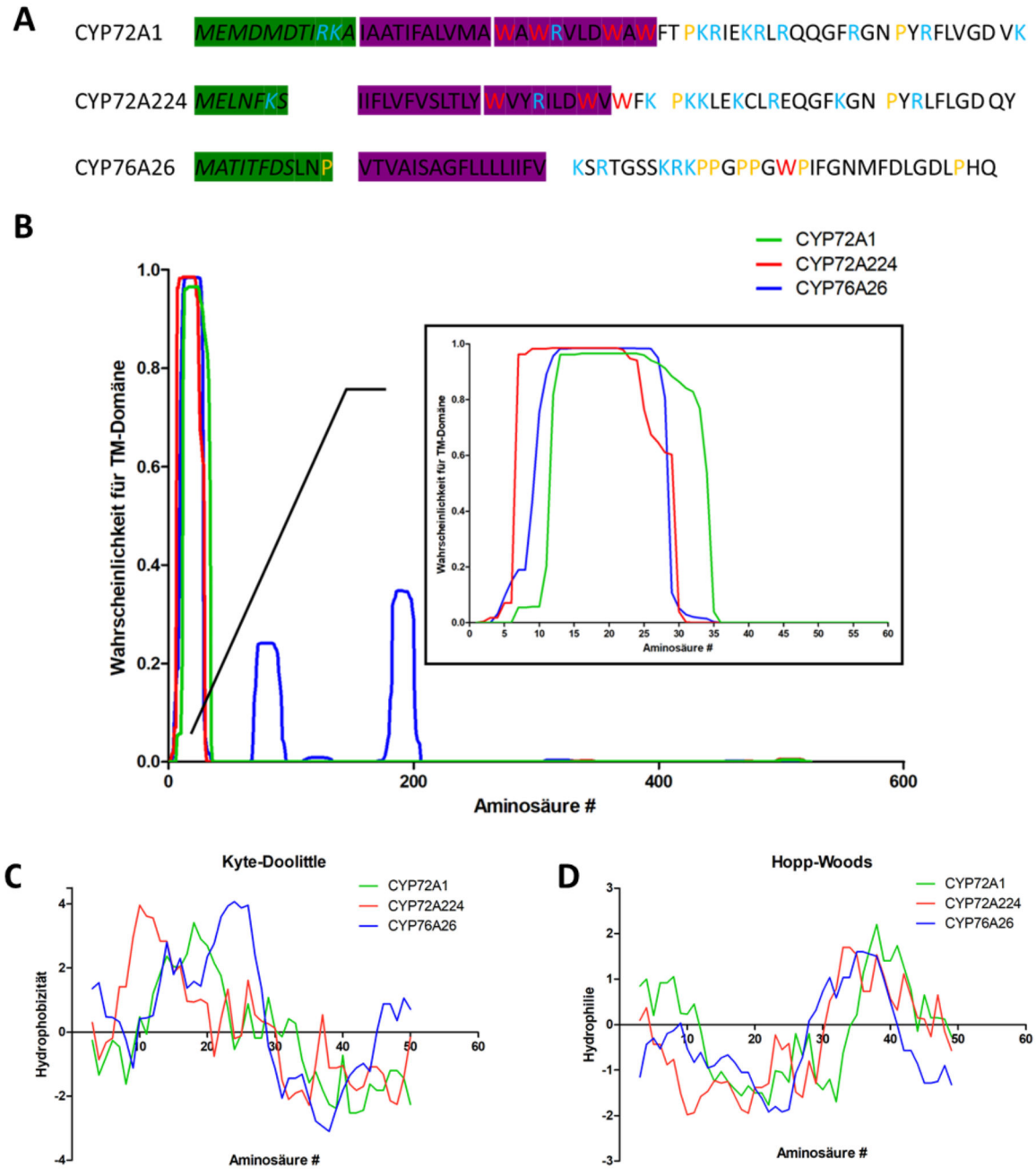

Abbildung 2.1 – Analyse und Vergleich der N-Termini der CYP76A26, CYP72A224 und CYP72A1. A) Gegenüberstellung der Wildtypsequenzen. Das Sekretionssignal ist grün und die Transmembrandomäne violett hinterlegt. Die häufig auftretenden Aminosäuren, Prolin (gelb), Tryptophan (rot), sowie Arginin und Lysin (hellblau) sind zur Verdeutlichung von Ähnlichkeiten und Unterschieden eingefärbt. Die Einteilung der TM-Domänen basiert auf den Einträgen (W8JIS5, *C. roseus* CYP76A26; U5NE19, *C. roseus* CYP72A224; Q05047, *C. roseus* CYP72A1) der Proteindatenbank Uniprot (https://www.uniprot.org, Zugriff am 06.09.2018). B) Vorhersage der Transmembrandomänen auf Basis eines *hidden Markov model* (TMHMM 2.0, http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/, Zugriff am 06.09.2018). C) und D) Analyse der Hydrophobizität und Hydrophilie der ersten 50 Aminosäuren mittels *Kyte-Doolittle scale* und *Hopp-Woods scale*.

Die Prognose deutet darauf hin, dass die TM-Domäne der CYP72A224 im Vergleich zur CYP72A1 früher beginnt. Ebenfalls wird eine kürzere TM-Domäne für die CYP76A26 vorhergesagt. Wie bei P450 innerhalb derselben Subfamilie zu erwarten ist, besitzen die N-Termini der CYP72A224 und CYP72A1 große Ähnlichkeiten (Sequenzidentität 47.6 %, Sequenzähnlichkeit 71,8 %[b]). Insbesondere der Bereich, welcher auf das Sekretionssignal folgt, ist in Bezug auf die chemischen Eigenschaften der Aminosäureseitenketten und dem generellen Aufbau vergleichbar. Es gibt hinter dem Sekretionssignal einen Bereich zum Großteil hydrophober Aminosäuren, der allen gezeigten P450 gemeinsam ist. Es ist ersichtlich, dass die Membransequenz in Abschnitte ähnlicher Länge unterteilt werden kann (Abbildung 2.1, A). Diese Betrachtungsweise hebt Unterschiede zwischen den P450 aus der CYP72A-Subfamilie (CYP72A1, CYP72A224) und CYP76A26 hervor. CYP72A1 und CYP72A224 haben einen Sequenzabschnitt innerhalb der Membrandomäne, der durch einen auffällig hohen Anteil der unpolaren Aminosäure Tryptophan (markiert in rot) in ähnlicher Position und Abfolge geprägt ist. CYP76A26 fehlt diese tryptophanreiche Region, dafür ist ein höherer Anteil der strukturbrechenden Aminosäure Prolin sichtbar. Anstatt der prolinreichen Region besitzen CYP72A1 und CYP72A224 einen Sequenzabschnitt polarer Aminosäuren (insbesondere Lysin oder Arginin). Tryptophan, die seltenste Aminosäure des *E. coli*-Proteoms,[315] wird dort nur durch ein einzelnes Codon kodiert. Dieses tritt mit deutlich größerer Häufigkeit in *C. roseus* als in *E. coli* auf (Quelle https://www.kazusa.or.jp/, letzter Zugriff am 16.07.2021). Die Verfügbarkeit von transfer-RNA kann die Translationsgeschwindigkeit[316] und dadurch die Faltung der entstehenden Polypeptidkette beeinflussen.[317] Mögliche Ursachen für Unterschiede und Ursachen bei der heterologen Herstellung der untersuchten P450-Gene sind also möglicherweise bereits durch Betrachtung der Sequenz zu erkennen.

2.1.2 Heterologe Produktion der CYP72A1 aus *C. roseus* in *E. coli* als Fusionsprotein

Die Expression von P450-Genen als Fusion mit einer CPR wurde als Methode beschrieben, um pflanzliche P450 wie die CYP73A4[242] aus *C. roseus* in *E. coli* zu produzieren. Eine Herstellung der CYP72A1 in *E. coli* als Fusion mit einer CPR aus *C. roseus* zur Bestimmung der Proteinfunktion ist literaturbekannt.[143] Es liegt jedoch kein CO-Differenzspektrum vor und ein Produktnachweis wurde lediglich durch radioisotopenmarkiertes Substrat erbracht. Die Ergebnisse aus der Publikation sollten mit den verfügbaren Mitteln reproduziert und wenn möglich so verbessert werden, dass biokatalytisch relevante Mengen des Zielproteins hergestellt werden können.

[b] Sequenzanalyse der ersten 60 Aminosäuren der CYP72A1 und CYP72A224 oder CYP76A26, https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/, Zugriff am 12.07.2020 [314].

Die hier erzeugte Sequenz (Kapitel 6.1.9) weicht von der publizierten Sequenz im Bereich der Linkersequenz (GST anstatt ST) zwischen P450 und Reduktase ab und die CPR (Q05001)[297] wurde auf Basis einer Analyse der Hydrophobizität um 72 anstatt 70 Aminosäuren trunkiert. Da der in der Literatur verwendete *E. coli*-Stamm und Vektor nicht verfügbar waren, wurde als Alternative der Stamm *E. coli* C43(DE3) und das Plasmid pCDFDuet-1 verwendet (Kapitel 6.1.9).

Um das Fusionsprotein der CYP72A1 und CPR (17A1d25CYP72A1_ GST_d72CPR) ausgehend vom Expressionsvektor pCDFDuet1_17A1d25CYP72A1_ GST_d72CPR (P35 in Tabelle 5.8) in *E. coli* herzustellen, wurde eine Optimierung der Expressionsbedingungen durchgeführt. Die Expressionsbedingungen können häufig einen Einfluss auf eine lösliche Herstellung des Zielproteins ausüben.[318] Unter keinen Bedingungen konnte ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 450 nm gefunden werden. Im Hinblick auf die Überschaubarkeit ist hier als Beispiel das Ergebnis der besten gefundenen Expressionsbedingungen beschrieben (Kapitel 6.2.8). Im Anschluss an die Expression und Homogenisierung der Zellen wurden die löslichen Zellextrakte analysiert.

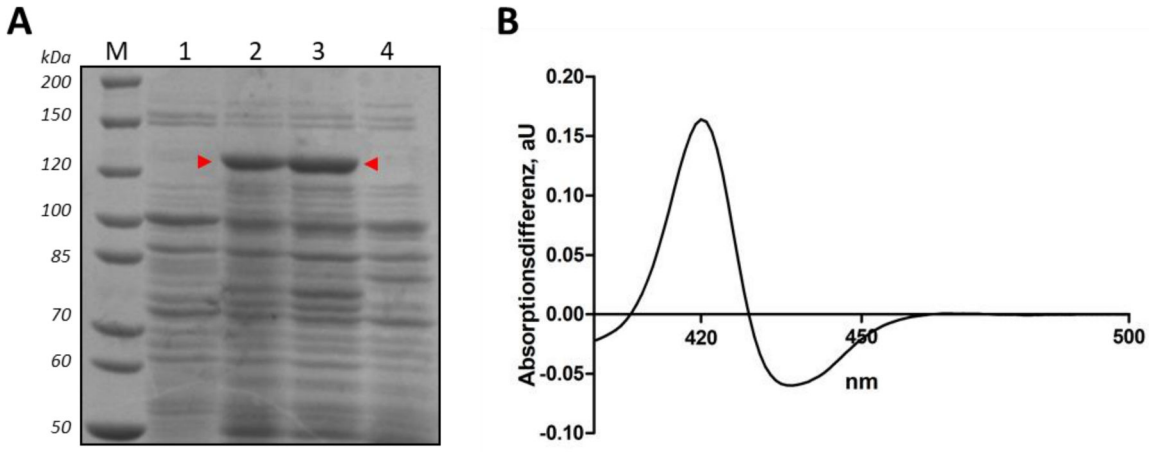

Abbildung 2.2 – Analyse der Expression E. coli C43(DE3) pCDFDuet1_17A1d25CYP72A1_ GST_d72CPR.
A) SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) zur Analyse der Expression *E. coli* C43(DE3) pCDFDuet1_17A1d25CYP72A1_ GST_d72CPR. Es wurden folgende Proben aufgetragen: Komigrationsstandard (M), Ganzzellprobe vor Induktion (1), Ganzzellprobe 72h nach Induktion (2), Lysat (3), Ganzzellprobe *E. coli* C43(DE3) pCDFDuet-1 nach 72 Stunden (4). B) repräsentatives CO-Differenzspektrum zur Analyse des Lysats nach 72-stündiger Expression. Die Position der Bande des Zielproteins ist durch rote Pfeile markiert.

Auf dem SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 2.2, A) ist bei den mit pCDFDuet1_17A1d25CYP72A1_ GST_d72CPR transformierten Zellen (2) nach 72 Stunden und in der löslichen Proteinfraktion (3) im Vergleich zum Leervektor pCDFDuet-1 (4) eine deutliche Proteinbande oberhalb von 120 kDa sichtbar. Die Position korreliert mit der Größe des Zielproteins von 130,9 kDa. Auf den CO-Differenzspektren des Lysats war (Abbildung 2.2, B) kein Absorptionsmaximum um 450 nm zu erkennen.

Stattdessen war ein deutliches Absorptionssignal im Spektralbereich um 420 nm sichtbar. Diese Soret-Bande wird durch porphyrinhaltige Proteinspezies erzeugt. Der korrekte Einbau der Häm b prosthetischen Gruppe ist von elementarer Bedeutung für die katalytische Funktionsfähigkeit von P450 (siehe Kapitel 1.5.3). Im Fall von P450 ist eine veränderte Koordination oder ein Verlust des axialen Thiolat-Liganden am Häm-Eisen wahrscheinliche Ursache für das 420 nm Signal. Raman-spektroskopische Analysen der *Pseusdomonas putida* CYP101 auf strukturelle Änderungen hin, die unter anderem von einer geschwächten Ligation des Eisen-Zentralatoms durch den Thiolat-Liganden begleitet wird.[319,320] Deshalb wird die Soret-Bande als Indikator für eine Inaktivität des Proteins angesehen. Auf Basis dieser Annahme wurde das Vorhandensein eines Absorptionsmaximum bei 450 nm jeweils hier und auch bei sämtlichen folgenden Expressionen von P450-Genen als Merkmal für korrekte Proteinfaltung und katalytische Aktivität herangezogen.[187]

Es ist allgemein bekannt, dass der Expressionsstamm ein wichtiger Faktor bei der heterologen Produktion von Proteinen ist.[318] Ein konkretes Beispiel aus *C. roseus* ist die heterologe Expression des CYP73A5-Gens als CPR-Fusion in *E. coli.*[242] Deshalb könnte der verwendete Expressionsstamm ursächlich für die von den Literaturdaten abweichenden Resultate sein. Aufgrund dieser Ergebnisse und den Einschränkungen bei der Variation der RP durch die Fusion wurde von weiteren Versuchen mit Secologanin-Synthase-CPR-Fusionen Abstand genommen.

2.1.3 Heterologe Produktion der CYP72A1 aus *C. roseus* durch Modifikation der Aminosäuresequenz am N-Terminus

Der Vorteil einer CPR-Fusion ist, dass eine Rekonstitution mit einem anderen geeigneten RP überflüssig wird. Eine nachteilige Eigenschaft ist, dass die resultierenden Fusionen für eine biokatalytische Charakterisierung wenig geeignet sind.[231] Eine Herstellung katalytisch aktiver CYP72A1 ohne Fusion ist folglich mit Blick auf die geplante Charakterisierung zielbringend.

Es entspricht der allgemeinen Auffassung, dass die Protein-Membranwechselwirkung dazu benötigt wird, eine korrekte Faltung und somit enzymatische Aktivität zu gewährleisten.[244]

Die Anpassung der natürlichen Aminosäuresequenz der Membranregion des Proteins an die Membran des heterologen Wirts durch Modifikationen am N-Terminus ist die in der Literatur am häufigsten als erfolgreich dokumentierte Strategie zur Herstellung pflanzlicher P450 in *E. coli*. Üblicherweise basieren die Anpassungen auf Modifikation der Aminosäuresequenz des Membranankers durch eine Kombination aus Deletionen und Substitutionen mit variierendem Ausmaß. Da eine Vorhersage über den Erfolg einzelner Sequenzmodifikationen unzuverlässig ist, wurden 18 verschiedene Varianten (Tabelle 2.1) der CYP72A1 generiert (Kapitel 6.1.9),

die sich in Eigenschaften und Ausmaß der Substitutionen und Trunkierungen unterscheiden. Hierzu wurde auch die zuvor beschriebene Analyse des Membranankers als Grundlage herangezogen. Die Varianten sollten durchgemustert werden, um aktives Enzym in *E. coli* zu produzieren. Pflanzliche P450 besitzen eine meist polare Signalsequenz, die bei der Sekretion wichtig ist. Dieser folgt eine Sequenz hauptsächlich ungeladener Aminosäuren, welche als Membrandomäne fungieren. Die eingeführten Trunkierungen umfassen meist das gesamte Sekretionssignal und erstrecken sich über Teile bis hin zur gesamten vorhergesagten Membrandomäne.

Tabelle 2.1 – N-terminale Aminosäuresequenzen der Varianten der CYP72A1 zur heterologen Produktion in *E. coli*. Die vorgenommenen Modifikationen der Aminosäuresequenzen der erzeugten CYP72A1-Varianten sind farbig markiert. Das Sekretionssignal ist grün und die vorhergesagte Transmembrandomäne violett hinterlegt. Substitutionen sind in blauer Schrift gekennzeichnet. Deletionen und die Anzahl der im Vergleich zur Wildtyp-CYP72A1 jeweils deletierten Aminosäuren, sind rot markiert.

Variante	Aminosäuresequenz
Wildtyp	MEMDMDTIRKAIAATIFALVMAWAWRVLDWAWFTPK
B_CYP72A1	MAMDMDTIRKAIAATIFALVMAWAWRVLDWAWFTPK
C_CYP72A1	MΔ32_____TPK
D_CYP72A1	MALLLAVFLTIRKAIAATIFALVMAWAWRVLDWAWFTPK
E_CYP72A1	MALLLAVFLΔ4__AATIFALVMAWAWRVLDWAWFTPK
F_CYP72A1	MALLLAVFLΔ8_____ALVMAWAWRVLDWAWFTPK
G_CYP72A1	MALLLAVFLΔ13_____WAWRVLDWAWFTPK
H_CYP72A1	MALLLAVFLΔ18_____LDWAWFTPK
I_CYP72A1	MALLLAVFLΔ21_____AWFTPK
J_CYP72A1	MALLLAVFLGLSCLLLLSLWΔ13_____TPK
K_CYP72A1	MALLLAVFLGAIAATIFALVMAWAWRVLDWAWFTPK
L_CYP72A1	MTVHDIIATYFTKWYVIVPLALIAYRVLDYFYΔ1__TPK
M_CYP72A1	MIEQLLEYWYVVVPVLYIIKQLLAYTKΔ8_____TPK
N_CYP72A1	MAKKTSSKGKΔ23_____TPK
O_CYP72A1	MAKKTSSKGKΔ20_____AWFTPK
P_CYP72A1	MAKKTSSKGKLPPGPΔ18_____TPK
Q_CYP72A1	MAKKTSSKGKLPPGPSΔ26_____LRQ
R_CYP72A1	MAKKTSSKGKLPPGPSΔ35_____PYR
T_CYP72A1	MAHHHHHHΔ2_AIAATIFALVMAWAWRVLDWAWFTPK

Die N-Termini der erzeugten Varianten sind zur Veranschaulichung auch schematisch dargestellt (Abbildung 2.3).

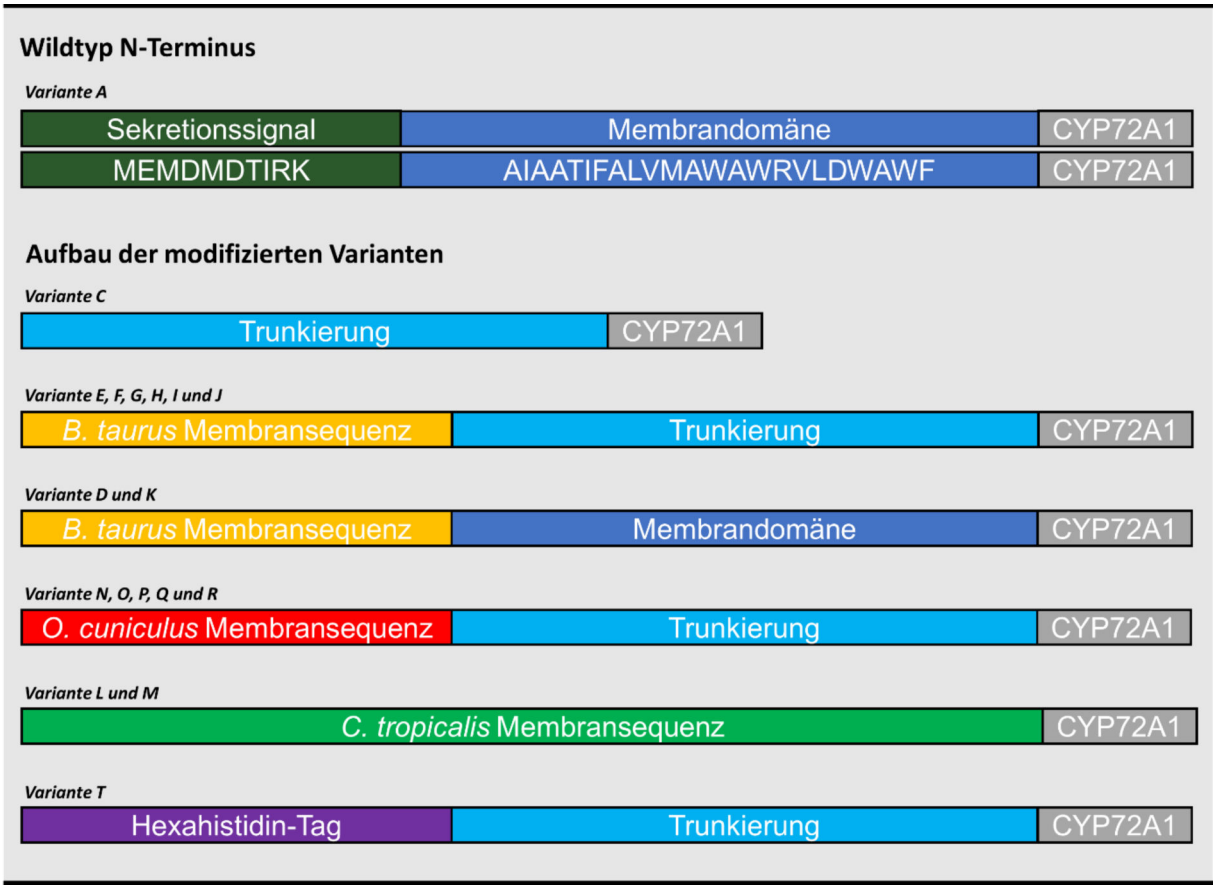

Abbildung 2.3 – Schematische Darstellung der N-Termini der CYP72A1-Varianten.

Für Substitutionen wurden Sequenzabschnitte, die vor dem Membrananker oder der Trunkierung liegen, gegen Sequenzen aus unterschiedlichen P450 ausgetauscht. Die eingeführten Substitutionen basieren zum Großteil auf Sequenzen, die in der Literatur erfolgreich zur Herstellung membranständiger P450 in *E. coli* verwendet wurden (gelb, rot, hellgrün und violett). Zu den P450-Genen, denen die artifiziellen N-terminalen Sequenzen nachempfunden wurden, gehören unter anderem die *B. taurus* CYP17A1 (ALLLAVFL)[245], die *O. cuniculus* CYP2C3d (AKKTSSKGK)[246] und CYP52A13 sowie CYP52A17[321] die jeweils aus *C. tropicalis* stammen.

Die auf der CYP2C3 basierende Sequenz hat einen im Vergleich zur CYP17A1-Sequenz hydrophilen, polaren Charakter. Dieser hydrophile Effekt wird durch eine in Kombination ausgeführte vollständige oder umfangreiche Trunkierung der hydrophoben Membrandomäne verstärkt. Die auf diese Weise angepasste P450 wird effektiv von einem Transmembranprotein in ein Membran-assoziiertes Protein umgewandelt.[213,247]

Die Sequenz der CYP17A1 aus *B. taurus* besitzt einen eher hydrophoben Charakter. Deshalb werden Deletionen der Transmembrandomäne, in geringerem Ausmaß durchgeführt. Der Substitution ALLLAVFL wird eine verbesserte Erkennung der resultierenden mRNA durch das *E. coli* Ribosom zugeschrieben.[232]

Die modifizierten Sequenzen der CYP72A1 wurden in den Expressionsvektor pET-28a(+) kloniert und die Gene in *E. coli* exprimiert (Kapitel 6.2.8). Die löslichen Zellextrakte wurden nach einer Expressionsdauer von 48 Stunden mit Hilfe von CO-Differenzspektren untersucht (Abbildung 2.4). Auf den CO-Differenzspektren ist zu sehen, dass alle verschiedenen Varianten unterschiedlich hohe Absorption bei 420 nm besaßen. Dieses Signal korreliert mit der in der Probe befindlichen Konzentration denaturierter P450.[187,322] Es ist plausibel, dass durch N-terminale Modifikation auf die Titer denaturierter P450 beeinflusst werden können.

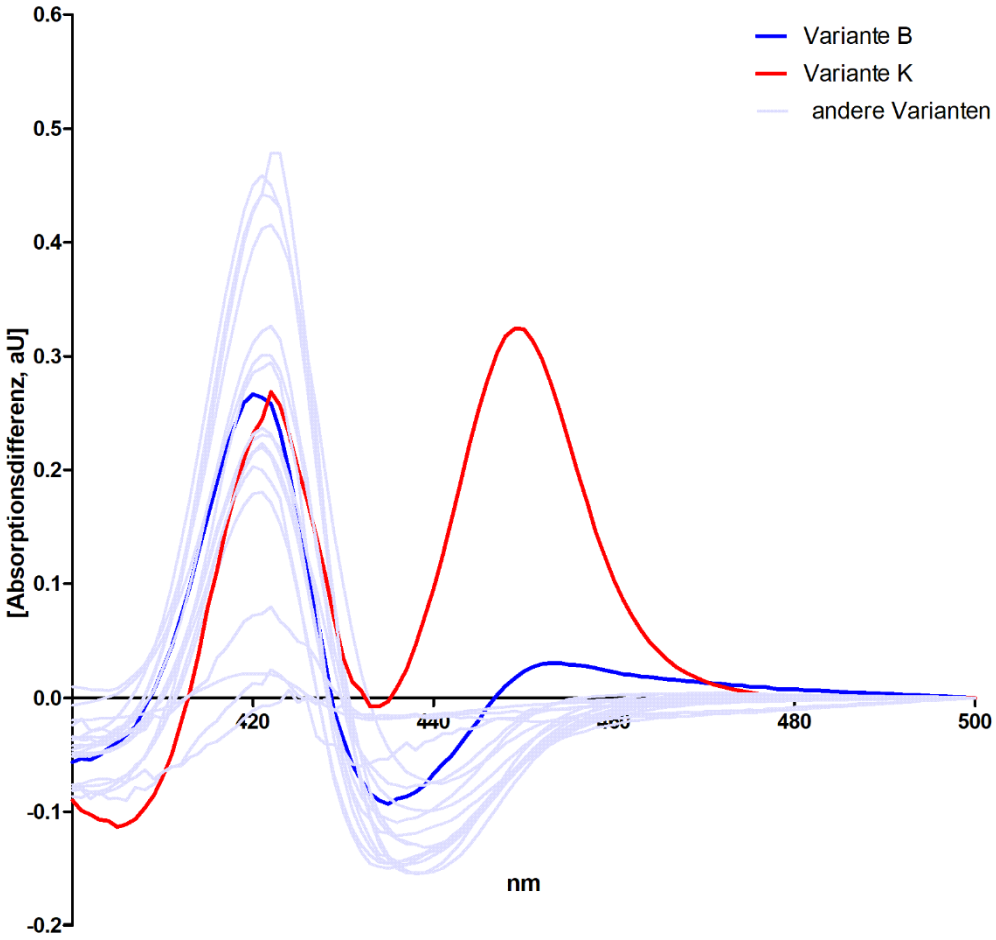

Abbildung 2.4 – Repräsentative CO-Differenzspektren der Lysate der CYP72A1-Varianten nach einer Expressionsdauer von 48 Stunden. Die Varianten K_CYP72A1 (rot) und B_CYP72A1 (dunkelblau) sind farbig hervorgehoben.

Nur Variante K, die im Folgenden als K_CYP72A1 bezeichnet wird, weist zusätzlich ein ausgeprägtes Signal bei 450 nm auf. Weiterhin zeigt Variante B ein im Vergleich geringeres, aber erkennbares Signal bei 450 nm. Bei stichprobenartigen Testumsetzungen von Loganin mit unterschiedlichen Varianten konnte nur mit K_CYP72A1 Secologanin detektiert werden. Das Vorhandensein des charakteristischen Signals bei 450 nm in der löslichen Fraktion des Zellextrakts ist ein deutliches Indiz für eine erfolgreiche Herstellung der CYP72A1 in löslicher und katalytisch aktiver Form.

Auf dem SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 2.5) zur Untersuchung der Expression der K_CYP72A1 ist besonders in der unlöslichen Proteinfraktion eine schwache Bande sichtbar, deren Höhe mit der Masse des Zielproteins von 59,3 kDa korreliert. Die Daten stimmen mit den literaturbekannten Daten aus der Analyse von *C. roseus* Zellen überein.[323] Es ist erkennbar, dass ein Teil des Proteins auch in der löslichen Fraktion befindlich ist. Unter Betrachtung der hydrophoben Natur der eingeführten Substitution erscheint diese Verteilung plausibel. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Protein in löslicher aber auch zu einem erheblichen Teil in unlöslicher Form vorlag. Üblicherweise lagen die mittels CO-Differenzspektrum ermittelten K_CYP72A1-Konzentrationen bei etwa 20 bis 30 mg K_CYP72A1/L Kultur.

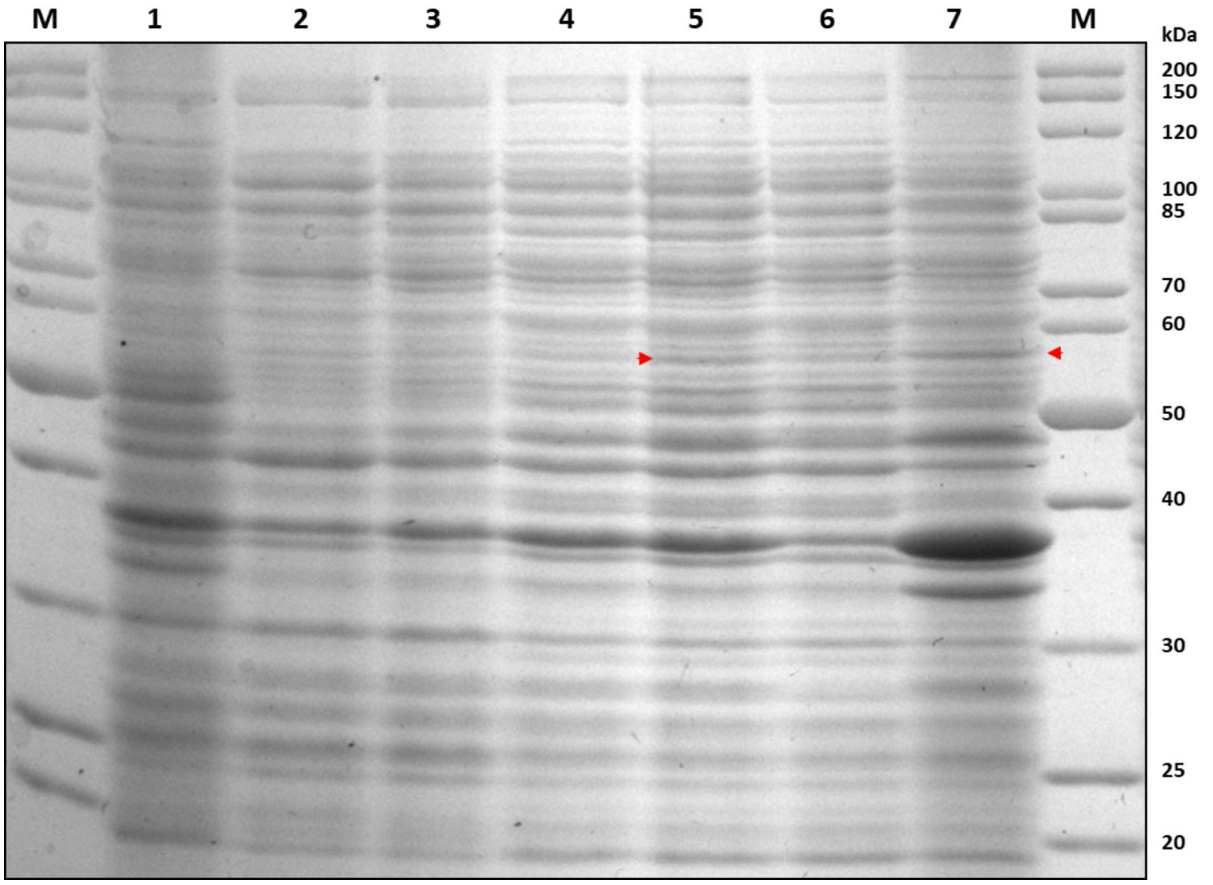

Abbildung 2.5 – SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) zur Analyse der Expression der Variante K_CYP72A1. Es wurden Ganzzellproben, vor der Induktion (2), 4 Stunden (3), 24 Stunden (4) und 40 Stunden (5) nach der Induktion der Expression *E. coli* C43(DE3) pET28a_K_CYP72A1 sowie eine Leervektorkontrolle *E. coli* C43(DE3) pET-28a(+) (1) aufgetragen. Außerdem wurde ein Komigrationsstandard (M), die lösliche Fraktion des Zellextraktes nach 40 Stunden (6) und die unlösliche Fraktion des Zellextraktes nach 40 Stunden (7) aufgetragen. Das Zielprotein mit einer Masse von 59,3 kDa ist durch rote Pfeile markiert.

Auf der Suche nach einer Erklärung, warum K_CYP72A1 aus den getesteten Varianten das gewünschte Verhalten zeigt, ist ein Blick auf die Aminosäuresequenz hilfreich. In Bezug auf die Modifikationen der Aminosäuresequenz zeichnet sich K_CYP72A1 gegenüber den 17 anderen Varianten aus, dass nur ein Eins-zu-Eins-Austausch des Sekretionssignals gegen eine

Zahl überwiegend hydrophober Aminosäuren basierend auf *B. taurus* CYP17A1 durchgeführt wurde. Der Sequenzabschnitt, der polare Aminosäuren trägt (AMDMDTIRK), wurde hierbei durch eine identische Anzahl unpolarer Aminosäuren ausgetauscht (ALLLAVFLG).
Als Resultat bleibt die vorhergesagte Membrandomäne aus sequenzieller Sicht intakt. An dieser Stelle ist auch anzumerken, dass Variante A_CYP72A1 – die Wildtypsequenz – die sich nur durch den Austausch einer Aminosäure (E1A) von B unterscheidet, kein Signal zeigt. Hier liegt die Ursache für die Unterschiede zwischen Variante A und B wahrscheinlich auf Translationsebene und ist ein in *E. coli* spezifischer Effekt. Eine Substitution der zweiten Aminosäure durch Alanin besitzt eine zuträgliche Wirkung auf heterologe Genexpressionen in *E. coli.*[324] Betrachtet man die Varianten D und E sind diese der K-Variante sehr ähnlich, zeigen jedoch auf den CO-Differenzspektren kein charakteristisches 450 nm Signal, sondern nur eine Absorptionsdifferenz bei 420nm. Bei D_CYP72A1 wurde eine fast identische Sequenz eingefügt, jedoch ist die Trunkierung im Vergleich zu K_CYP72A1 von geringerem Ausmaß. E_CYP72A1 unterscheidet sich nur durch drei Aminosäuren (GAI) von K_CYP72A1. Möglicherweise wurde Häm b zwar inkorporiert, aber die Koordination durch den axialen Thiolat-Liganden gestört. Zusammenfassend ist ersichtlich, dass geringe Veränderungen am N-Terminus den korrekten Einbau der Häm-b-Gruppe bei der Expression in *E. coli* empfindlich beeinflussen können.

2.1.4 Heterologe Produktion der 7-Deoxyloganinsäure-7-Hydroxylase (CYP72A224, U5NE19) aus *C. roseus* in *E. coli*

Der Aufbau der N-terminalen Sequenz der CYP72A224 weist Ähnlichkeiten zu CYP72A1 auf (siehe Abbildung 2.1, A). Bei CYP72A1 führte Variante K, die eine Substitution der polaren Aminosäuren am N-Terminus und eine unveränderte Membransequenz enthält, zu einem Enzym, welches das spezifische 450 nm Signal zeigte.
Um die Kaskade gegebenenfalls um einen Schritt erweitern zu können, sollte untersucht werden, ob CYP72A224 ebenfalls in *E. coli* produziert werden kann. Aufgrund der Ähnlichkeiten von CYP72A224 und CYP72A1 (Kapitel 2.1.1), wurden für CYP72A224 anhand derselben Grundgedanken Varianten entworfen. CYP72A224_V1 ist K_CYP72A1 direkt nachempfunden. Auf Basis der Analyse der N-terminalen Sequenz wurde ein Sequenzabschnitt mit sechs teilweise polaren Aminosäuren (ELNFKS) gegen sechs Aminosäuren (ALLLAV) der *B. taurus* CYP17A1-Sequenz ausgetauscht. CYP72A224_V2 weist starke Ähnlichkeit zu CYP72A224_V1 auf, jedoch wurden zwei zusätzliche Aminosäuren des Membranankers (ELNFKS**II** gegen ALLLAV**FL**) substituiert (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2 – N-terminale Aminosäuresequenzen der Varianten der CYP72A224 zur Produktion in *E. coli*. Substitutionen sind blau markiert. Deletionen sind rot markiert. Die Anzahl der Aminosäuren, um welche die resultierende Variante im Vergleich zur Wildtyp-CYP72A224 kürzer ist, wird durch die nachgestellte Zahl repräsentiert.

Variante	Resultierende Peptidsequenz am N-Terminus
WT	MELNFKSIIFLVFVSLTLYWVYRILDWVWFKPKKLEK
CYP72A224_V1	MALLLAVIIFLVFVSLTLYWVYRILDWVWFKPKKLEK
CYP72A224_V2	MALLLAVFLFLVFVSLTLYWVYRILDWVWFKPKKLEK
CYP72A224_V3	MAKKTSSKGKΔ15_____DWVWFKPKKLEK
CYP72A224_V4	MAKKTSSKGKΔ21_____PKKLEK

Die Modifikationen bei CYP72A224_V3 und V4 basieren auf der N-terminalen Sequenz der CYP2C3d[246] und wurden analog zu O_CYP72A1 und N_CYP72A1 konzipiert. Die Expressionsvektoren mit den Varianten CYP72A224_V1 bis CYP72A224_V4 wurden in *E. coli* C43(DE3) auf ihre Expressionsfähigkeit der CYP72A224 getestet (Kapitel 6.2.8) und die Evaluation der Expression anhand von CO-Differenzspektren (Abbildung 2.6, A) vorgenommen.

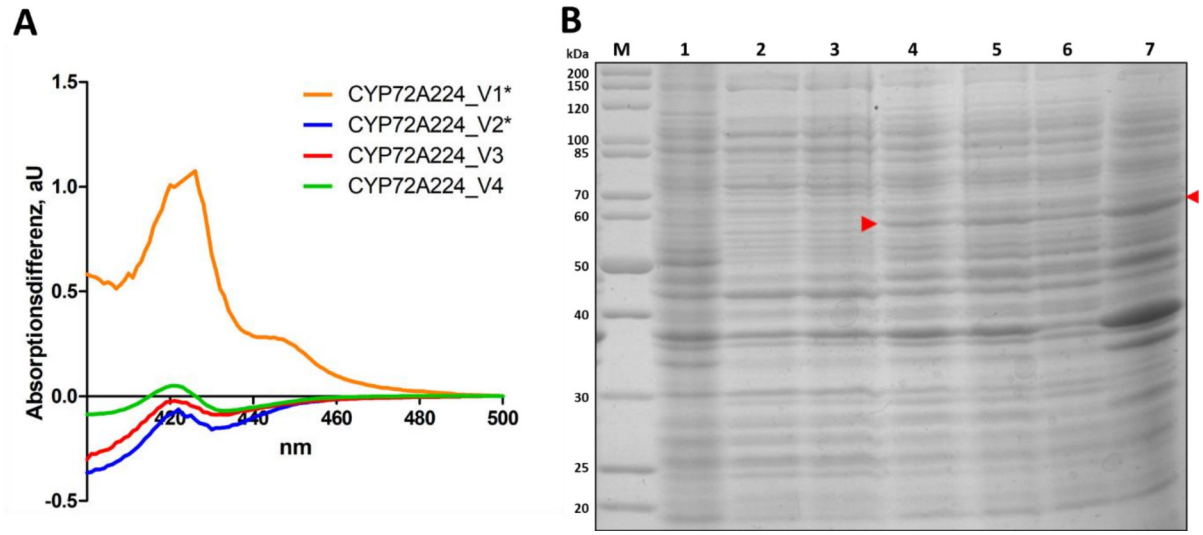

Abbildung 2.6 – Analyse der Expression der Gene der CYP72A224-Varianten. A) Die Lysate der Expressionen *E. coli* C43(DE3) pCDFDuet-1_CYP72A224_V1, pCDFDuet-1_CYP72A224_V2, pCDFDuet-1_CYP72A224_V3, pCDFDuet-1_CYP72A224_V4 nach 40 h Expressionsdauer wurden jeweils mittels CO-Differenzspektrum untersucht. *:Verdünnt um Faktor 2 B) SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) zur Analyse der Expression *E. coli* C43(DE3) pCDFDuet-1_CYP72A224_V1. Es wurden Ganzzellproben, vor der Induktion (2), 4 Stunden (3), 24 Stunden (4) und 40 Stunden (5) nach der Induktion der Expression sowie eine Leervektorkontrolle *E. coli* C43(DE3) pCDF-Duet-1 (1) aufgetragen. Außerdem wurde ein Komigrationsstandard (M), die lösliche (6) und unlösliche (7) Fraktion des Zellextraktes nach 40 Stunden aufgetragen. Das Zielprotein mit einer Masse von 60,1 kDa ist durch rote Pfeile markiert.

Aus den CO-Differenzspektren der vier getesteten Varianten der CYP72A224 zeigte nur CYP72A224_V1 eine Absorptionsdifferenz bei 450 nm in reduzierter CO-gebundener Form.

CYP72A224_V2 liegt in denaturierter Form vor. Wie schon bei CYP72A1 bewirkten auch bei CYP72A224 geringste Veränderungen der TM-Domäne gravierende Auswirkungen auf die Faltung des Proteins oder führten zu veränderter Häm-b Koordination. Möglicherweise besteht ein Einfluss der TM-Domäne auf die Sekundär- oder Tertiärstruktur des Proteins.
Auf dem SDS-Polyacrylamidgel der Expression von CYP72A224_V1 (Abbildung 2.6, B) ist besonders in der unlöslichen Proteinfraktion eine Bande unterhalb der 60 kDa Markierung zu erkennen, die gut mit der erwarteten Masse des Proteins von 60,1 kDa korreliert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass CYP72A224_V1 wie K_CYP72A1 zu einem größeren Teil in unlöslicher Form vorlag. Es kann zusammengefasst werden, dass die Strategie zur Produktion der CYP72A1 in *E. coli* auch auf CYP72A224 angewendet werden konnte.

2.1.5 Heterologe Produktion der Iridoid Oxidase (CYP76A26, W8JIS5) aus *C. roseus* in *E. coli*

CYP76A26 katalysiert als Teil der Strictosidin-Biosynthese die Oxidation von Nepetalactol zu 7-Deoxyloganetinsäure (Abbildung 1.4). Die N-terminale Sequenz der CYP76A26 weist im Vergleich zu CYP72A1 und CYP72A224 Unterschiede auf, wie beispielsweise eine prolinreiche Region, die mit dem Ende der vorhergesagten Transmembrandomäne gut übereinstimmt (Abbildung 2.1). Es wurde untersucht, ob CYP76A26 durch Modifikationen des N-Terminus mit polaren Aminosäuren in *E. coli* hergestellt werden kann.
Die Plasmide mit den hier getesteten Mutanten des CYP76A26-Gens (Tabelle 5.8, P27, P28 und P29) wurden von Dr. O. Mahmoud erhalten. Die Varianten der CYP76A26 wurden im Rahmen dieser Arbeit in *E. coli* C43(DE3) hergestellt (Kapitel 6.2.8) und eine Analyse der Genexpression durchgeführt.
Die CYP76A26-Varianten enthalten Sequenzmodifikationen am N-Terminus (Tabelle 2.3), die aufgrund der festgestellten Sequenzunterschiede von den Veränderungen bei der K_CYP72A1 und der CYP72A224_V1 abweichen. Aufgrund der vorhandenen prolinreichen Region, wurden bei allen erzeugten Varianten umfassende Bereiche der Transmembrandomäne bis zur prolinreichen Region trunkiert (PPGPPG) und dadurch die Polarität des Proteins am N-Terminus erhöht. Bereiche der nativen Sequenz wurden zudem durch Abschnitte der vergleichsweise polaren Aminosäuresequenz KKTSSGK(L)[246] substituiert. Auf den CO-Differenzspektren der löslichen Zellextrakte von CYP76A26_V2 und CYP76A26_V3 war ein Absorptionssignal um 450 nm sichtbar (Abbildung 2.7, A). Es ist plausibel, dass der mögliche Effekt, den die TM-Domäne auf die Sekundär- oder Tertiärstruktur des Proteins besitzt, durch die prolinreiche Region reduziert ist, beispielsweise wegen der strukturbrechenden Eigenschaften, die Prolin zugeschrieben werden. Deshalb wird die Struktur

des Proteins vermutlich nicht wie bei CYP72A1 und CYP72A224 durch Trunkierungen der Membrandomäne beeinträchtigt.

Tabelle 2.3 – Schematische Darstellung der N-terminalen Aminosäuresequenz der Varianten der CYP76A26 zur Produktion in *E. coli*. Substitutionen sind blau markiert. Deletionen sind rot markiert. Die Anzahl der Aminosäuren, um welche die resultierende Variante im Vergleich zur Wildtyp-CYP76A26 (WT) kürzer ist, wird durch die nachgestellte Zahl repräsentiert.

Variante	Resultierende Peptidsequenz am N-Terminus
WT	MATITFDSLNPVTVAISAGFLLLLIIFVKSRTGSSKRKPPGPPGW
CYP76A26_V1	MAKSRTGSSΔ26 KRKPPGPPGW
CYP76A26_V2	MAKKTSSKGKΔ28 PPGPPGW
CYP76A26_V3	MAKKTSSKGKLΔ27 PPGPPGW

Auf dem SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 2.7, B) der CYP76A26_V2 ist eine Bande sichtbar, (rot markiert) die etwa der berechneten Masse des Zielproteins von 55 kDa entspricht. Ein großer Teil der hergestellten CYP76A26_V2 war in der unlöslichen Fraktion enthalten. Eine mögliche Ursache dafür ist die Bildung von Proteinaggregaten.

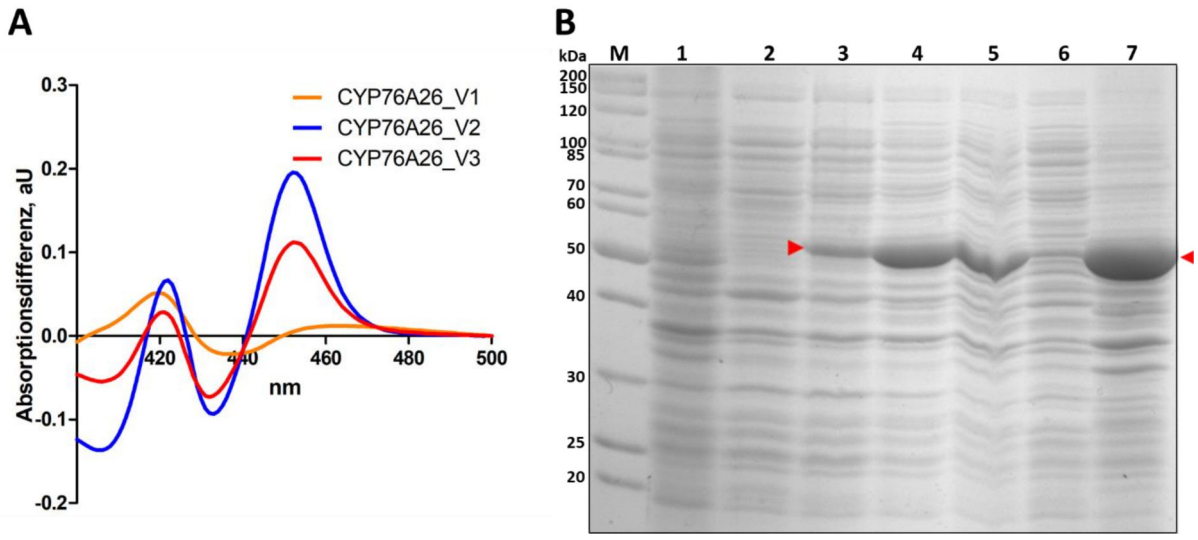

Abbildung 2.7 – Analyse der Expression der CYP76A26-Varianten. A) Die Lysate der Expressionen *E. coli* C43(DE3) pET22b76A26V1, pET22b76A26V2 und pET22b76A26V1 nach 40 Stunden Expressionsdauer wurden jeweils mittels CO-Differenzspektrum untersucht. B) SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) zur Analyse der Expression *E. coli* C43(DE3) pET22b76A26V2. Es wurden Ganzzellproben, vor der Induktion (2), 4 Stunden (3), 24 Stunden (4) und 40 Stunden (5) nach der Induktion der Expression sowie eine Leervektorkontrolle *E. coli* C43(DE3) pET-22b(+) (1) aufgetragen. Außerdem wurde ein Komigrationsstandard (M), die lösliche (6) und unlösliche (7) Fraktion des Zellextraktes nach 40 Stunden aufgetragen. Das Zielprotein ist durch rote Pfeile markiert.

Zusammenfassend konnten alle untersuchten *C. roseus* Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus dem späten Seco-Iridoid-Pfad durch N-terminale Modifikation in *E. coli* hergestellt werden.

2.1.6 Heterologe Produktion Hexahistidin-markierter K_CYP72A1 in *E. coli* C43(DE3) und Reinigung

Für die geplante biochemische Charakterisierung der CYP72A1 ist es zuträglich und teilweise notwendig, mit hochkonzentrierten Präparaten von möglichst hoher Reinheit zu arbeiten. Um die K_CYP72A1 in höherer Konzentration und Reinheit zu erhalten, sollte eine Proteinreinigung mittels Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) an Nickel-NTA durchgeführt werden. Dazu musste zunächst Hexahistidin-markierte CYP72A1 hergestellt werden.

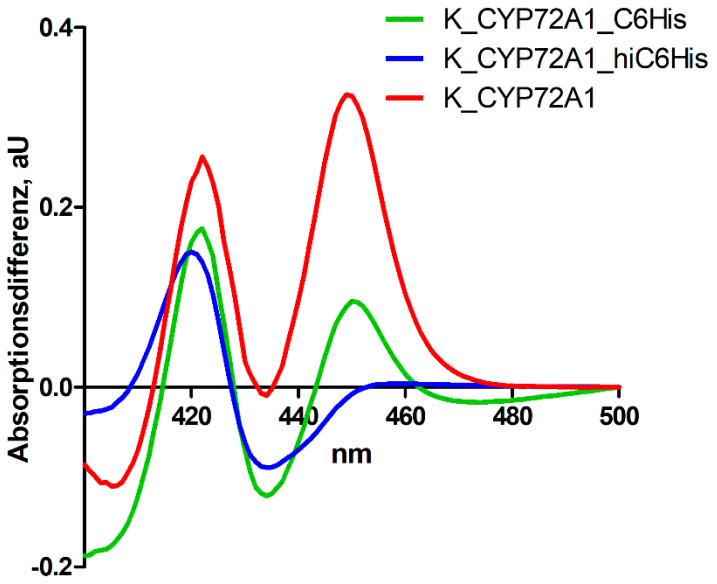

Abbildung 2.8 – Repräsentative CO-Differenzspektren der Hexahistidin-K_CYP72A1-Varianten.
Die Lysate der unter identischen Bedingungen in *E. coli* C43(DE3) produzierten CYP72A1-Varianten K_CYP72A1, K_CYP72A1_hiC6His und K_CYP72A1C6His wurden durch Aufnahme von CO-Differenzspektren untersucht.

Die zuvor erzeugte Variante T_CYP72A1, die einen N-terminalem Hexahistidin-Marker trägt, zeigte kein Absorptionsmaximum bei 450 nm (Tabelle 2.1). Folglich ist diese Variante für eine biochemische Charakterisierung ungeeignet. Deshalb wurde die Variante K_CYP72A1 als Ausgangspunkt gewählt. Die K_CYP72A1 wurde mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag versehen, um den N-Terminus nicht zu verändern. Es wurden zwei Sequenzen des K_CYP72A1-Gens mit C-terminalem Hexahistidin-Tag und jeweils unterschiedlichen Linkersequenzen erzeugt (Kapitel 6.1.9) und exprimiert (Kapitel 6.2.8).

Anhand der CO-Differenzspektren der löslichen Zellextrakte (Abbildung 2.8) ist ersichtlich, dass nur die Variante K_CYP72A1_C6His mit einem GST-Linker das charakteristische Absorptionsmaximum bei 450 nm zeigte. Mögliche auf den Sequenzunterschieden beruhende Ursachen für Fehlfaltung oder Fehlinkorporation der prosthetischen Gruppe bei der K_CYP72A1_hiC6His könnten auf der relativen Position des Hexahistidin-Tags zum Häm-b

Cystein-Liganden (Position 470 aus 524 im Wildtyp-Protein) beruhen. Auch Unterschiede der Linkersequenzen können eine Rolle spielen. Im Vergleich ist die Linkersequenz der K_CYP72A1_C6His (GST-Linker) kürzer als die der K_CYP72A1_hiC6His (KLAAALE-Linker) und hat zusätzlich einen höheren Anteil polarer Aminosäuren. Die unpolaren Aminosäuren könnten in Wechselwirkungen mit unpolaren Regionen der CYP72A1 treten und dadurch die Struktur des Proteins beeinträchtigen. Es gibt auch literaturbekannte Beispiele, in denen elektrostatische Kräfte die posttranslationale Wechselwirkung mit dem Ribosom und die Proteinfaltung beeinflussen.[325]

Auf dem CO-Differenzspektrum der K_CYP72A1_C6His ist wie bei der K_CYP72A1 neben dem 450nm-Signal ein ausgeprägtes Signal bei 420 nm sichtbar.

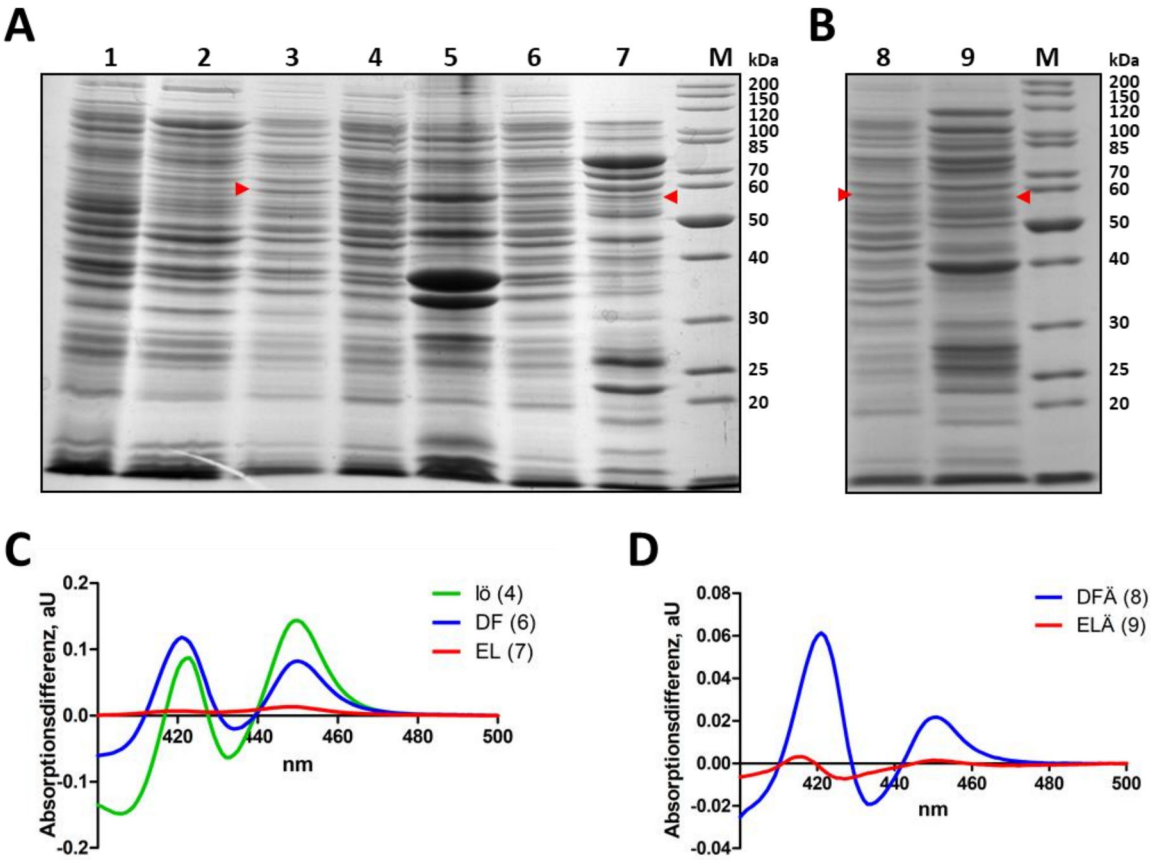

Abbildung 2.9 – Analyse der IMAC-Reinigung der hergestellten K_CYP72A1_C6His mittels SDS-PAGE und CO-Differenzspektren. A) und B) 12,5 %-SDS-Polyacrylamidgel zur Analyse der Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie mittels Schwerkraft-Durchflusschromatographie (A) und FPLC (B). Es wurden Ganzzellproben einer Leervektorkontrolle *E. coli* C43(DE3) pET28a(+) (1) sowie die Proben *E. coli* C43(DE3) pET28a_K_CYP72A1_C6His vor der Induktion (2) und 40 Stunden nach der Induktion (3) aufgetragen. Außerdem wurde ein Komigrationsstandard (M), das Lysat (4) und die unlösliche (5) Fraktion des Zellextraktes jeweils nach 40 Stunden analysiert. Der Erfolg der Aufreinigung wurde durch SDS-PAGE der jeweiligen Durchfluss- (6 und 8) und Eluat-Fraktion (7 und 9) untersucht**.** Das Zielprotein mit einer Masse von 60,1 kDa ist durch rote Pfeile markiert. C) und D) Das Lysat (lö) und die jeweils erhaltenen Durchfluss- (DF , DFÄ) und Eluat-Fraktionen (EL, ELÄ) wurden ohne Anpassung der Probenkonzentration Anhand von CO-Differenzspektren analysiert.

Bei der Polyhistidin-Variante lag unter den gegebenen Expressionsbedingungen das Verhältnis der beiden wellenlängenverschobenen Signale eher auf der Seite des 420 nm Signals.
Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse stehen im Einklang mit den CO-Differenzspektren. Offenbar liegt das Protein zum Großteil in denaturierter Form vor (vergleiche Abbildung 2.9, A: 4 und 5). In Bezug auf die Bildung von Secologanin zeigte die K_CYP72A1_C6His allerdings eine zur unmarkierten K_CYP72A1 vergleichbare Aktivität.
Das Lysat der K_CYP72A1_C6His wurde einer affinitätschromatischen Reinigung unterzogen (Kapitel 6.3.4). Es wurde auf Waschschritte mit Imidazol-haltigem Puffer verzichtet, da keine Rotfärbung des Säulenmaterials zu erkennen war. Zusätzlich wurde getestet, ob durch eine Reinigung via FPLC bessere Ergebnisse erzielt werden können. Auf dem SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 2.9, A und B) ist sichtbar, dass die Proben der Eluate (7 und 9) ein diffuses Bandenmuster aufweisen, welches unterstützt durch die Analyse mittels der CO-Differenzspektren der Eluat- und Durchflussfraktionen (Abbildung 2.9, C und D) auf eine fehlende spezifische Bindung des Zielproteins an die immobilisierten Nickel-Ionen deuten.
Bei einer erfolgreichen Reinigung wäre die relative Intensität der Bande des Zielproteins auf dem SDS-Polyacrylamidgel durch die Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial in der Eluat-Probe (EL oder ELÄ) im Vergleich zu den Nebenbanden höher als vor der Reinigung. Das Bandenmuster deutet durch die hohe Anzahl der Nebenbanden und Veränderung der relativen Intensitäten deutlich auf unspezifische Bindung von Proteinen an das Säulenmaterial hin. Diese Schlussfolgerung wird auch durch die aufgezeichneten CO-Differenzspektren unterstützt (Abbildung 2.9, C und D): Im Eluat ist eine deutliche Reduktion der P450 spezifischen Absorptionsdifferenzen im Vergleich zur lö-Probe sichtbar. Zwischen lö und DF ist eine erkennbare Verschiebung des Verhältnisses der charakteristischen Maxima der Absorptionsdifferenzen sichtbar (Abbildung 2.9, C), die auf ein Fortschreiten der Denaturierung des Enzyms während der Reinigung bei 4°C deutet.
Eine Denaturierung des Proteins als Ursache für die niedrigen P450-spezifischen Absorptionsdifferenzen im CO-Differenzspektrum der Eluat-Probe (Abbildung 2.9, C) ist hingegen unwahrscheinlich. Würde durch Wechselwirkung mit dem Ni-NTA Säulenmaterial oder das Reinigungsprotokoll eine Denaturierung stattfinden, wäre keine Abnahme der Absorption bei 420 und 450 nm, sondern eine Verschiebung der (Abbildung 2.9, C und D) von 450 zu 420 nm zu erwarten. Ein Verlust von Häm b während der Bindung an Ni-NTA ist aufgrund der kovalenten Bindung der prosthetischen Gruppe unwahrscheinlich. Das Zielprotein wäre in diesem Fall auch bei der Analyse der Eluat-Probe auf dem SDS-Polyacrylamidgel sichtbar. Als mögliche Ursachen für die beobachtete fehlende Bindung an das Säulenmaterial

wurden ein Fehlen des Hexahistidin-Affinitätsmarkers oder geringe Löslichkeit in Betracht gezogen. Die geringe Affinität ist zudem durch ein Verdecken des Affinätsmarkers durch die Tertiärstruktur des Proteins erklärbar.

2.1.7 Einfluss von Detergenzien auf eine Reinigung der K_CYP72A1_C6His

Die SDS-PAGE-Analyse der hergestellten K_CYP72A1_C6His deutete darauf hin, dass ein Teil des Enzyms in unlöslicher Form vorlag. Deshalb wurde eine Auswahl nichtionischer Detergenzien bei der Zellhomogenisierung eingesetzt, um zu untersuchen, ob Detergenzien die Löslichkeit des Zielproteins und die Bindung an Ni-NTA verbessern können. Es wurden nichtionische Detergenzien verwendet, um Änderungen der Struktur oder Ladung der K_CYP72A1_C6His durch elektrostatische Wechselwirkungen zu vermeiden.

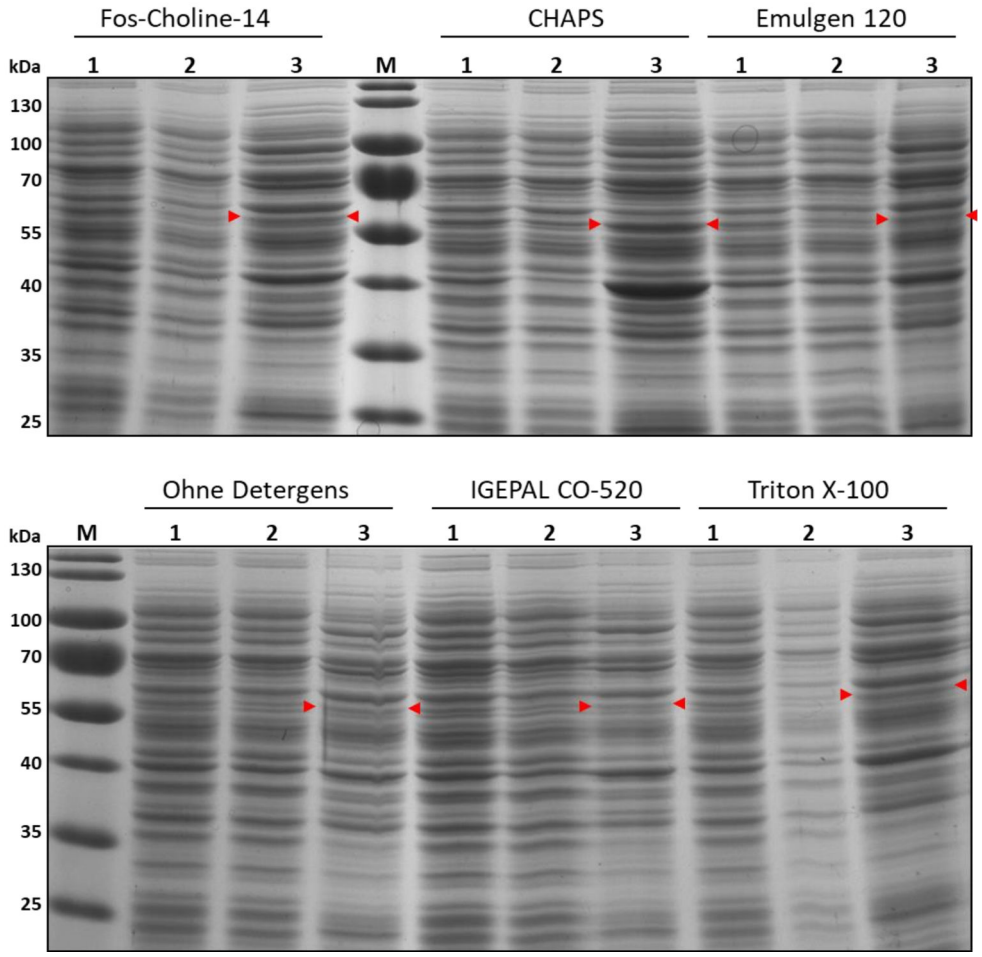

Abbildung 2.10 – SDS-Polyacrylamidgele (12,5%) der Reinigung der K_CYP72A1_C6His im *Batch*-Verfahren mit Ni-NTA unter Verwendung von Detergenzien. Die Proben Lysat (1), Überstand (2) und Eluat (3) nach der Inkubation an Ni-NTA-Perlen wurden unter Verwendung von Emulgen 120, CHAPS, Fos-Choline-14, IGEPAL CO-520, Triton X-100 und ohne Detergens zur Analyse auf ein SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen. Ein Komigrationsstandard *PageRuler*^{TM} *Prestained Protein Ladder* wurde als Referenz analysiert (M). Die aufgetragene Masse der Proben kann jeweils abweichen, da Detergenzien bereits in geringer Konzentration den Bradford-Test beeinträchtigen können.

Für die Untersuchung wurde eine nach einer Expression des K_CYP72A1_C6His-Gens erhaltenene *E. coli*-Zellsuspension in identische Volumina geteilt. Vor der Homogenisierung wurden diese jeweil mit verschiedenen Detergenzien versetzt (Kapitel 6.2.7). Die Lysate wurden an Ni-NTA-Perlen inkubiert und Proben mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 2.10). Auf den SDS-Polyacrylamidgelen ist sichtbar, dass keines der verwendeten Detergenzien zu einer deutlichen Anreicherung des Zielproteins oder Verringerung von Verunreinigungen in den Eluat-Proben (3) führte. Es ist jeweils ein Muster von Proteinbanden sichtbar, welches auf eine große Anzahl von Proteinen unterschiedlicher Größe und unspezifische Bindung hindeutet. Die Menge an Zielprotein war in der löslichen Fraktion bei CHAPS im Vergleich zur Kontrolle ohne Detergenz erhöht. Eine Vergleich der Detergenzien ist aufgrund der niedrigen Bandenintensität des Zielproteins jedoch schwierig.
Alle Eluat-Fraktionen (Abbildung 2.11, A) wurden mittels Western Blot und Immunodetektion (Abbildung 2.11, B) analysiert.

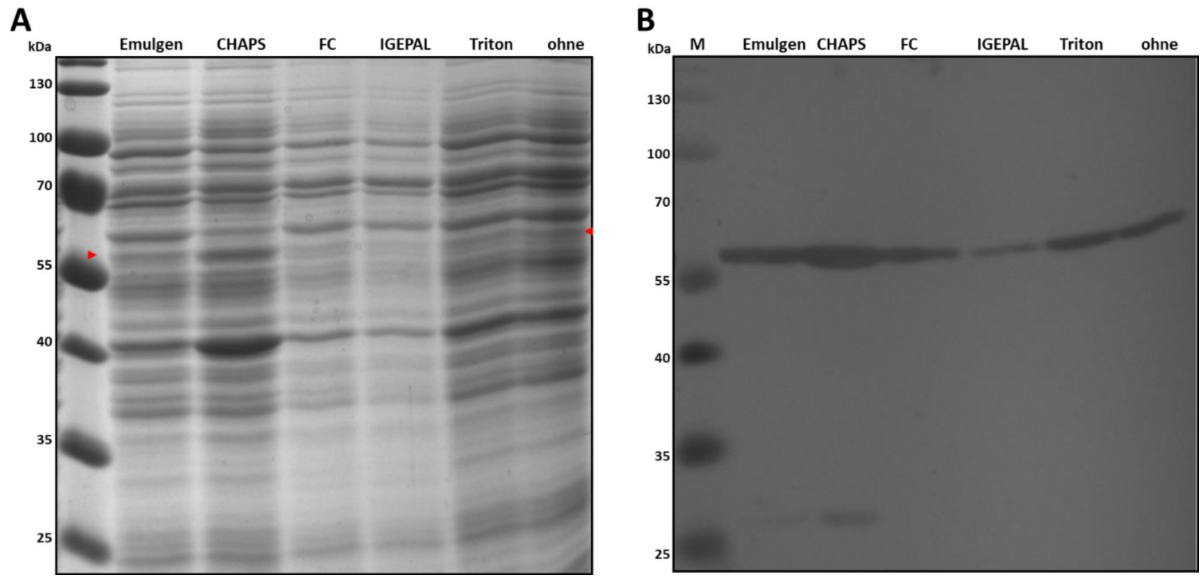

Abbildung 2.11 – Analyse der Reinigung der K_CYP72A1_C6His im *Batch*-Verfahren mit Ni-NTA unter Verwendung von Detergenzien. A) SDS-Polyacrylamid-Gel (12,5 %) zur Analyse der Eluat-Fraktionen der Reinigung. B) Nitrozellulosemembran aus dem Western Blot mit Immunodetektion mittels Anti-His_6-Körpern zur Analyse der Eluat-Fraktionen der Reinigung. Es wurden jeweils die unter Verwendung von Emulgen 120 (Emulgen), CHAPS (CHAPS), Fos-Choline-14 (FC), IGEPAL CO-520 (Igepal); Triton X-100 (Triton) und ohne Detergenzien (ohne) erhaltenen Eluat-Fraktionen aufgetragen. Um über Immunodetektion Aufschluss über erhaltene Menge des Zielproteins K_CYP72A1_C6His zu gewinnen, wurden nicht wie üblich jeweils 10 µg Protein pro Tasche aufgetragen, sondern ein jeweils identisches, unverdünntes Probenvolumen.

Durch Immunodetektion konnte bei allen Proben auf der Nitrozellulosemembran eine Bande oberhalb von 55 kDa sichtbar gemacht werden, die mit Masse des Zielproteins K_CYP72A1_C6His von etwa 60 kDa korreliert. Die Ergebnisse aus der Analyse mittels Western Blot und Immunodetektion sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der SDS-PAGE-Analyse. CHAPS erhöhte die in der Eluat-Probe enthaltene Menge an Zielprotein.

Weiterhin war bei der CHAPS- und Emulgen-Probe jeweils eine weitere Bande oberhalb von 25 kDa zu erkennen. Die relative Intensität der Banden konnte als Anhaltspunkt für die enthaltene Menge an K_CYP72A1_C6His verwendet werden, da alle Proben in identischen Volumina eluiert und jeweils identische Probenvolumina auf die SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen wurden.

Eine anschließende Reinigung (Kapitel 6.3.4) der K_CYP72A1_C6His aus Lysat mittels IMAC und mit CHAPS (Abbildung 2.12, A) führte jedoch nicht zur gewünschten Steigerung der Reinheit des Zielproteins. Die hohe Anzahl an Banden, die in der Eluat-Probe auf dem SDS-Polyacrylamidgel sichtbar sind, deutet darauf hin, dass auch mit CHAPS überwiegend unspezifische Bindung an das Säulenmaterial stattgefunden hat.

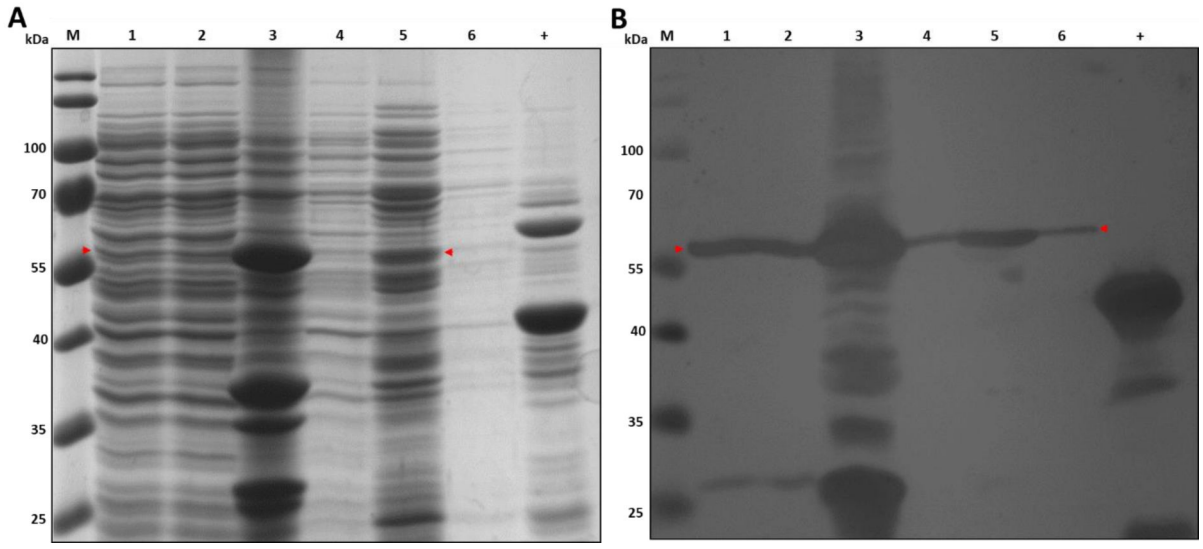

Abbildung 2.12 – Einfluss von CHAPS auf die Reinigung der K_CYP72A1_C6His mittels IMAC.
Gezeigt sind das SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) (A) und die Nitrozellulosemembran (B) der Analyse der IMAC-Reinigung der K_CYP72A1_C6His mittels SDS-PAGE und Western Blot. Es wurden die Proben Komigrationsstandard *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (M), Lysat (1), Durchfluss der Reinigung (2), Pellet nach Zellaufschluss und Zentrifugation (3), Fraktion nach Waschen mit IMAC-Puffer A mit 20 mM Imidazol (4), Eluat nach Zugabe von IMAC-Puffer A mit 150 mM Imidazol (5), Fraktion nach Zugabe von IMAC-Puffer B (6) und eine Positivkontrolle, N6His_LAMT (+) aufgetragen.

Bei der Analyse der Proben durch Western Blot (Abbildung 2.12, B) wurden im Eluat (5) mittels Immunodetektion nur Proteine einer Größe von etwa 60 kDa detektiert. Der Größe nach kann diese Bande der K_CYP72A1_C6His zugeordnet werden. Es ist folglich unwahrscheinlich, dass das diffuse Bandenmuster der Eluat-Probe auf dem SDS-Polyacrylamidgel auf Fragmente der K_CYP71A1_C6His zurückzuführen ist. Zusammenfassend konnte die Löslichkeit der K_CYP72A1_C6His durch Zugabe von CHAPS in geringem Ausmaß verbessert werden. Dies hatte jedoch kaum einen Effekt auf die Reinigung mittels IMAC. Als mögliche Ursache für die fehlende selektive Bindung des Zielproteins an das Säulenmaterial konnte das Fehlen des Hexahistidin-Affinitätsmarkers durch Western Blot

und Immunodetektion mittels Anti-His_6-Körper ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist der Hexahistidin-Affinätsmarker für eine Wechselwirkung mit den immobilisierten Nickel-Ionen unzugänglich; beispielsweise, weil er durch die Tertiärstruktur der K_CYP72A1_C6His verdeckt wird.

2.1.8 Herstellung der Secologanin-Synthase in *E. coli* als Fusionsprotein mit Apolipoprotein I und Maltose Binding Protein

Bei Reinigung der K_CYP72A1_C6His mittels IMAC konnte unter dem löslichkeitsvermittelnden Einfluss von Detergenzien oder dem denaturierenden Einfluss von Harnstoff (Kapitel 8.2.7) keine selektive Bindung des Zielproteins am Säulenmaterial beobachtet werden. Es ist möglich, dass der Hexahistidin-Afffinitätsmarker durch die Tertiärstruktur der K_CYP72A1_C6His verdeckt wird.

Maltose Binding Protein (MBP) besteht aus 370 Aminosäuren und hat eine Masse von etwa 42.5 kDa. Aufgrund der Größe sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass eine spezifische Bindung an Amylose während einer Reinigung durch das fusionierte Zielprotein behindert wird. Bei Vorversuchen konnte CYP72A1 nicht als Fusionsprotein mit MBP in aktiver Form in *E. coli* produziert werden. In der Literatur sind dreigliedrige Fusionskonstrukte aus MBP, einem Zielprotein und trunkiertem ApoA1 (ApoAI*) beschrieben, die zur löslichen Herstellung vom Häm-Proteinen angewendet wurden.[238] Um zu untersuchen, ob auf diese Weise aktive CYP72A1 als Fusionsprotein in *E. coli* hergestellt werden kann, wurde zur Expression ein Gen-Konstrukt generiert (Kapitel 6.1.9), das für ein Fusionsprotein aus MBP, CYP72A1 und ApoAI* kodiert. Die einzelnen Glieder des chimären Proteins erfüllen unterschiedliche Aufgaben. Neben der Möglichkeit zur Reinigung des Zielproteins einer Amylose-Affinitätsmatrix werden MBP solubilisierende Eigenschaften zugeordnet, welche die Faltung eines Zielproteins unterstützen können.[233] ApoA1* liegt in einem geschmolzen-globulären Zustand[326] vor und bindet Phospholipide, die wie eine artifizielle Membran für das zu exprimierende Transmembranprotein wirken. Im Resultat soll CYP72A1 durch Wechselwirkungen mit ApoA1* bereits während der Faltung stabilisiert werden.[238] Es wurden Varianten erzeugt, die Anpassungen der N-terminalen Aminosäuresequenz der CYP72A1 beinhalten (Tabelle 2.4). Die SIMPLEx-Variante K basiert auf der zuvor untersuchten K_CYP72A1. Bei SIMPLEx-Variante C wurde die Membransequenz und bei SIMPLEx-Variante D9 das Sekretionssignal bis zur Membransequenz trunkiert. Nach einer persönlichen Korrespondenz mit Dario Mizrachi, Ph.D.[238], werden die besten Ergebnisse erzielt, wenn ApoAI* am C-Terminus des Fusionsproteins liegt. Eine Änderung der Reihenfolge führt zu einer unabhängigen Faltung der einzelnen Proteine. Das Zellpellet der SIMPLEx-Variante-K,

das nach einer Expressionsdauer von etwa 48 Stunden durch Zentrifugation erhalten wurde (Kapitel 6.2.8), wies im Vergleich zu den übrigen getesteten Konstrukten eine sichtbare rötliche Färbung auf.

Tabelle 2.4 – N-terminale Amiosäuresequenzen der Fusionskonstrukte der SIMPLEx-Varianten der CYP72A1 zur Produktion in *E. coli* und Reinigung. Die eingeführten Modifikationen der Aminosäuresequenzen der erzeugten SIMPLEx-Varianten der CYP72A1 sind farbig markiert. Substitutionen sind blau markiert. Deletionen sind rot markiert. Die nachgestellte Zahl gibt die Anzahl der Aminosäuren an, um welche die resultierende Variante im Vergleich zur Wildtyp-CYP72A1 gekürzt wurde. Die Sequenz der modifizierten CYP72A1 wird von MBP und ApoA1* flankiert.

Variante	Modifikation am N-Terminus der CYP72A1
WT	MBP_MEMDMDTIRKAIAATIFALVMAWAWRVLDWAWFTP_ApoA1*
K	MBP_MALLLAVFLGAIAATIFALVMAWAWRVLDWAWFTP_ApoA1*
C	MBP_MAΔ32_____TP_ApoA1*
D9	MBP_MAΔ9_____IAATIFALVMAWAWRVLDWAWFTP_ApoA1*

Eine Rotfärbung des Zellpellets kann bei der heterologen Produktion von P450 in *E. coli* häufig als ein erster Indikator für eine erfolgreiche Genexpression gewertet werden. Die Lysate wurden mit Hilfe von CO-Differenzspektren analysiert. Es waren Intensitätsunterschiede der Absorptionsdifferenzen bei 420 nm auf den CO-Differenzspektren der löslichen Zellextrakte (Abbildung 2.13, A) zu erkennen. Nur das CO-Differenzspektrum der SIMPLEx-Variante-K hatte eine geringe Absorptionsdifferenz um 450 nm, die auf lösliche P450 im niedrigen nanomolaren Bereich hindeutete.

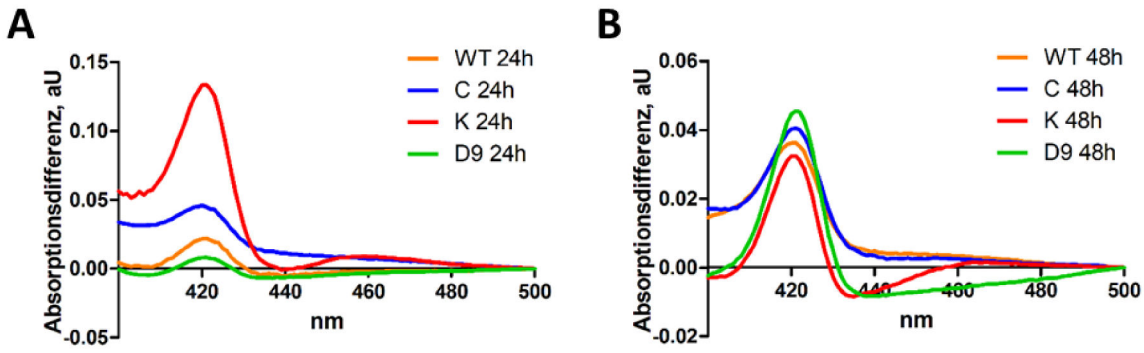

Abbildung 2.13 – Repräsentative CO-Differenzspektren aufgezeichnet mit *E. coli* Zelllysaten der CYP72A1-SIMPLEx-Varianten A) nach einer Expressionsdauer von 24 Stunden und B) nach einer Expressionsdauer von 48 Stunden.

Diese liegt um einen Faktor von etwa 100 bis 150 unter der Konzentration, die üblicherweise bei der Herstellung der K_CYP72A1 in *E. coli* bei gleicher Handhabe der Proben und Verdünnung erhalten wurde. Die zuvor beobachteten Intensitätsunterschiede waren nach 48 Stunden kaum noch sichtbar (Abbildung 2.13, B). Eine Erklärung für die beobachteten

Veränderungen der Proben könnte eine Denaturierung der Proteine sein, die bei den jeweiligen Proben einem unterschiedlichen zeitlichem Verlauf folgte.

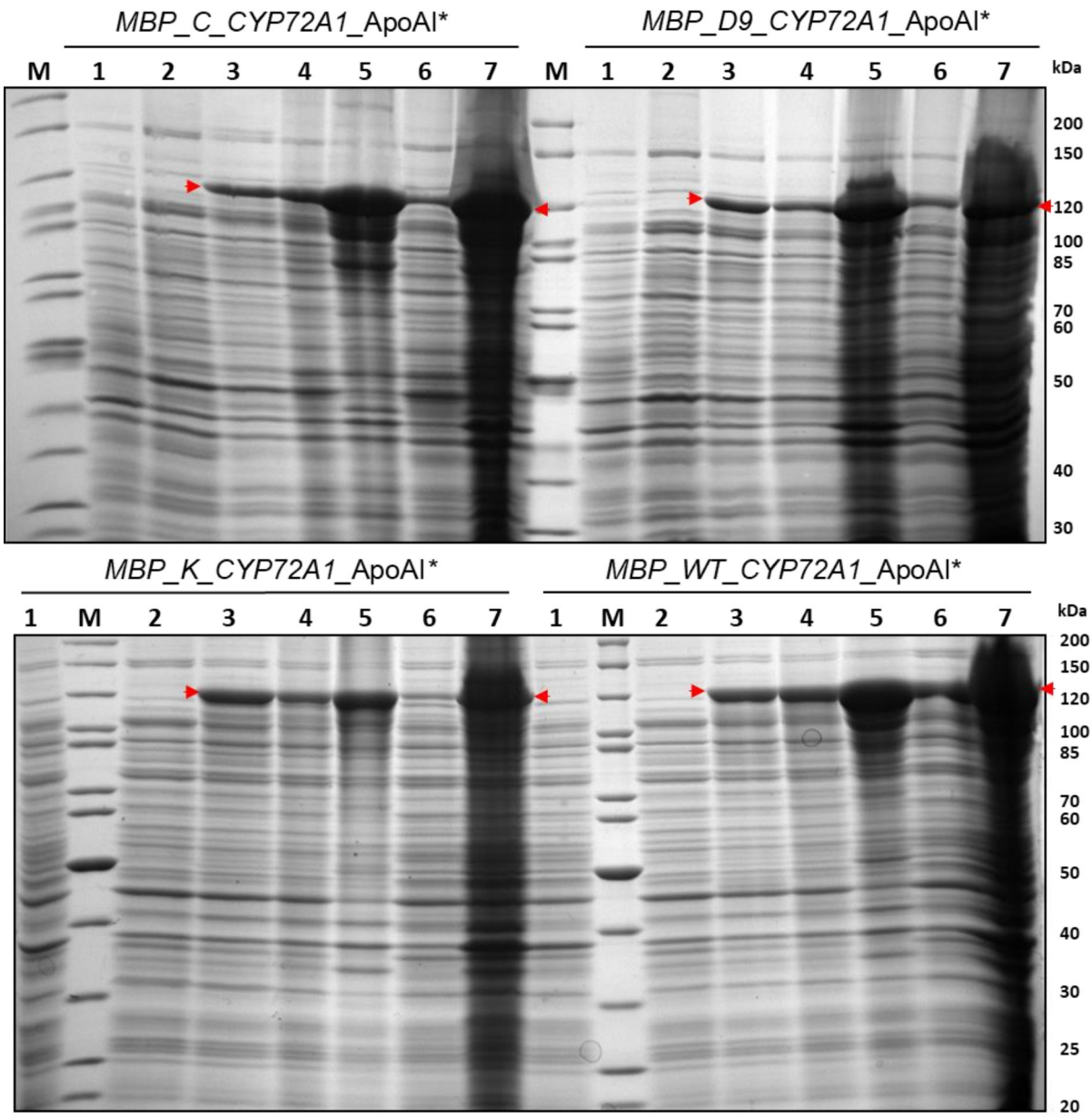

Abbildung 2.14 – SDS-Polyacrylamidgel zur Analyse der Expression der Gene der SIMPLEx-Varianten. Es wurden jeweils Ganzzellproben der Leervektorkontrolle *E. coli* C43(DE3) pET28a(+)(1) sowie von *E. coli* C43(DE3) pET28a_MBP_WT_CYP72A1_ApoAI*, pET28a_MBP_C_CYP72A1_ApoAI*, pET28a_MBP_K_CYP72A1_ApoAI* und pET28a_MBP_D9_CYP72A1_ApoAI* vor Induktion der Expression (2) und nach einer Expressionsdauer von 3 Stunden (3) aufgetragen. Außerdem wurde jeweils eine Probe vom Lysat nach einer Expressionsdauer von 24 Stunden (4) und 48 Stunden (6) sowie die unlösliche Fraktion der homogenisierten Zellen nach einer Expressionsdauer von 24h (5) und 48h (7) aufgetragen. Zur Massenreferenz dient ein Komigrationsstandard, *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (M).

Die Expression wurde mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 2.14). Auf den SDS-Polyacrylamidgelen ist sichtbar, dass als Tripelfusion jeweils ein Teil des produzierten Zielproteins in löslicher Form vorlag, jedoch eine erhebliche Menge in der unlöslichen Fraktion enthalten war. Die höchste abgeschätzte Bandenintensität des Zielproteins im Lysat war jeweils

nach 24 Stunden erkennbar. Das verschmierte Erscheinungsbild, insbesondere der Proben der unlöslichen Proteinfraktion (5, 7) deutet auf Proteinaggregate hin. Protein-Einschlusskörper können ein Störfaktor beim Bradford-Test sein, da sie die Bildung des Farbkomplexes mit Coomassie-Brilliant-Blau G-250 behindern.

Als Resultat wurde die tatsächliche Proteinkonzentration einiger Proben unterschätzt und mehr Protein auf das Gel aufgetragen. Die relative Stellung von MBP und ApoAI* zur CYP72A1 innerhalb des Fusionskonstrukts ist unter Einbeziehung der Vorergebnisse im Bezug auf Modifikationen am N-Terminus der CYP72A1 ungünstig. Die erwartete stabilisierende Wirkung von ApoAI* auf CYP72A1 ist möglicherweise aufgrund der Distanz der CYP72A1-Membrandomäne zu ApoAI* reduziert.

Das Lysat der Variante SIMPLEx-Variante-K wurde zum Test mittels Affinitätschromatographie an einer Amylose-Affinitätsmatrix (Amylose Resin, siehe Tabelle 5.5) gereinigt. Eine Untersuchung der Gesamtproteinkonzentration des farblosen Eluats ergab eine niedrigen Proteingehalt von weniger als 70 µg/mL Protein.

2.1.9 Einfluss der Ammoniumsulfat-Konzentration auf die Löslichkeit der K_CYP72A1

Unterschiedliche Versuche einer chromatographischen Reinigung der K_CYP72A1_C6His und von Fusionen der CYP72A1 mit MBP führten nicht zum gewünschten Ergebnis. Einen anderen Ansatz zur Reinigung stellt die Ammoniumsulfat-Fällung dar. Diese ist unabhängig von Affinitätsmarkern wie Hexahistidin. Ammoniumsulfat ist eine stark wasserlösliche Substanz mit antichaotroper Wirkung. Die löslichen Proteine können in Fraktionen präzipitiert und durch Lösen in einem geringeren Volumen aufkonzentriert werden. Es wurde untersucht, ob durch eine fraktionierte Fällung mit $(NH_4)_2SO_4$ eine Reinigung der K_CYP72A1 erreicht werden kann.

Um die nötige Ammoniumsulfat-Konzentration zur Fällung der K_CYP72A1 zu ermitteln, wurde die Ammoniumsulfat-Konzentration des *E. coli*-Lysat mit K_CYP72A1 (5) schrittweise erhöht (20 %, 40 %, 60 %, 80 %, im Folgenden immer jeweils bezogen auf die 100%ige Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration). Der in Folge jeder Zugabe von Ammoniumsulfat entstehende Niederschlag wurde getrennt, gelöst, mittels Bradford-Test quantifiziert und per SDS-PAGE untersucht (Kapitel 6.3.9). Anhand der jeweils als Niederschlag erhaltenen Masse an Proteinen (Abbildung 2.15, A) war sichtbar, dass bei 40 % Ammoniumsulfat weniger als ein Drittel der gesamten Proteine als Niederschlag vorlag. Die Bildausschnitte zeigen die farbliche Veränderung der jeweils erhaltenen Lösungen.

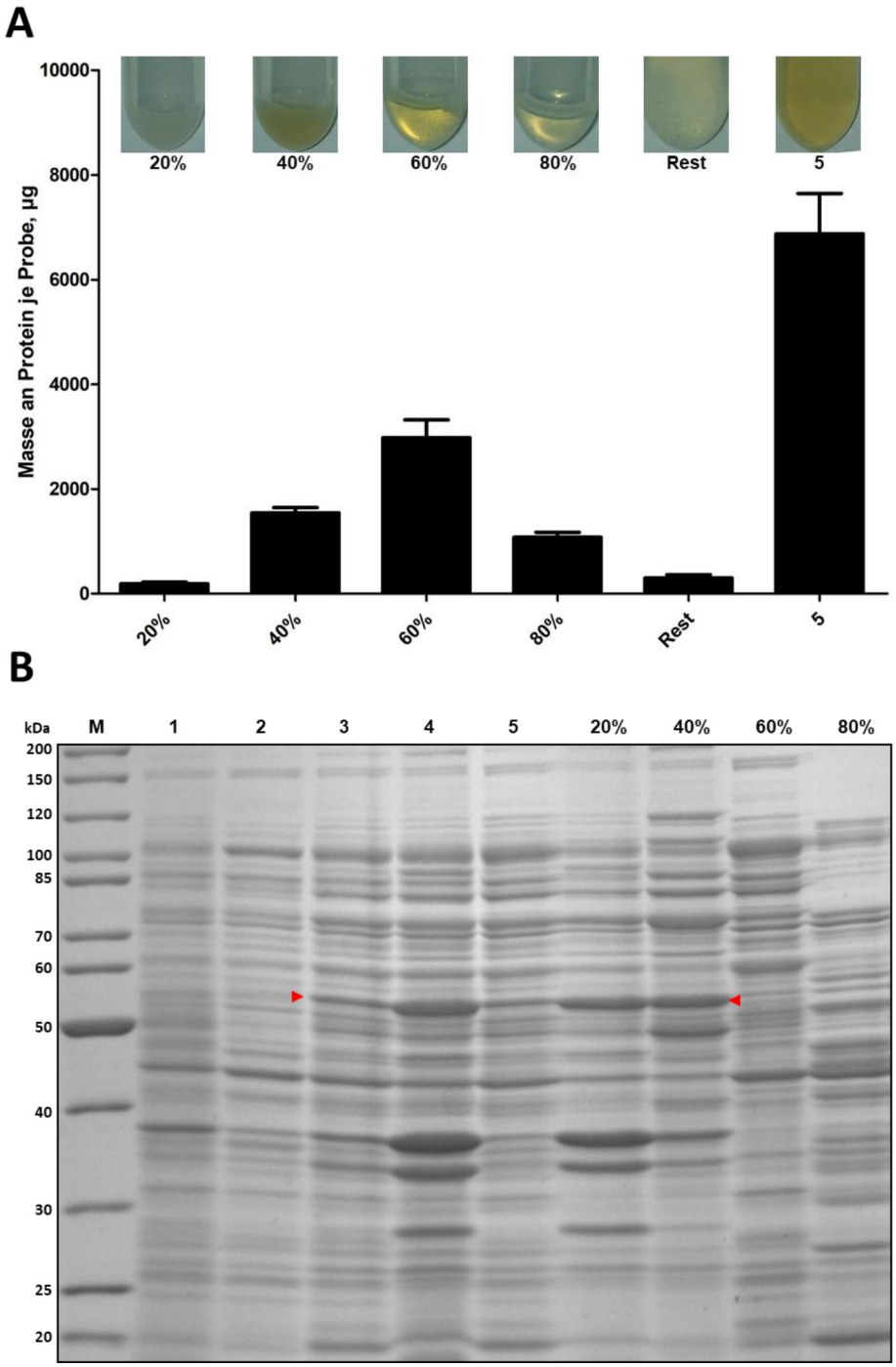

Abbildung 2.15 – Analyse der fraktionierten Fällung der K_CYP72A1 aus *E. coli* Lysat durch Ammoniumsulfat. A) Bestimmung der Masse an Protein die jeweils nach Steigerung der $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration (20 % ,40 % ,60 % und 80 % der $(NH_4)_2SO_4$-Sättigungskonzentration) als Niederschlag erhalten wurde. Die Masse der Proteine im Lysat (5) und die Masse an Protein welche nach Zugabe von 80 % $(NH_4)_2SO_4$ weiterhin in Lösung waren (Rest), wurde ebenfalls ermittelt. Die erhaltenen Niederschläge wurden vom Überstand getrennt, in 200 µL 50 mM Tris-Puffer gelöst und mittels Bradford-Test quantifiziert. Die Bildausschnitte illustrieren die farbliche Veränderung der gelösten Niederschläge. B) SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) aus der SDS-PAGE-Analyse der fraktionierten Fällung. Es wurden Ganzzellproben der Expression C43(DE3) pET28a_K_CYP72A1, vor Induktion der Expression (2), 24 Stunden nach Induktion der Expression (3) und eine Leervektorkontrolle C43(DE3) pET28a(+) (1) aufgetragen. Außerdem wurden Proben der unlöslichen Proteinfraktion (4), der löslichen Proteinfraktion jeweils nach 40 Stunden Expressionsdauer (5), der gelösten Niederschläge (bei 20 % ,40 % ,60 % und 80 % der $(NH_4)_2SO_4$-Sättigungskonzentration) sowie ein Komigrationsstandard (M) aufgetragen. Je Tasche wurde jeweils 10 µg Protein eingesetzt. Ein roter Pfeil markiert das Zielprotein.

Die mit Probe mit 40 % Ammoniumsulfat weist eine rötliche Färbung auf. Alle anderen Proben besitzen eine deutlich geringere charakteristische Rotfärbung, oder sind annähernd farblos. Das deutet darauf hin, dass die K_CYP72A1 durch fraktionierte Fällung von etwa 70 % der Gesamtproteine getrennt werden kann.

Die SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 2.15, B) bestätigt, dass bei jeder getesteten Ammoniumsulfat-Konzentration unterschiedliche Proteine im Niederschlag erhalten waren. Es ist sichtbar, dass die K_CYP72A1 bei 40 % Ammoniumsulfat fast vollständig als Niederschlag vorlag. Bei den Proben mit mehr als 40 % Ammoniumsulfat war die Bande des Zielproteins auf dem SDS-Polyacrylamidgel nicht mehr zu erkennen. Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Untersuchung des Proteingehalts der Fraktionen. Durch fraktionierte Fällung mit 40 % der Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration kann die K_CYP72A1 von etwa 70 % der Gesamtproteine getrennt werden.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob nach einer Fällung der K_CYP72A1 und anschließendem Lösen in einem geringeren Gesamtvolumen die Häm b prosthetische Gruppe erhalten bleibt. Dazu wurde die gesamte Menge an K_CYP72A1, die aus Kulturvolumen 2 L TB (20 x 100 mL TB-Medium) erhalten wurde, durch Zugabe von 40 % Ammoniumsulfat gefällt und die erhaltenen Lösungen durch Aufnahme von CO-Differenzspektren untersucht.

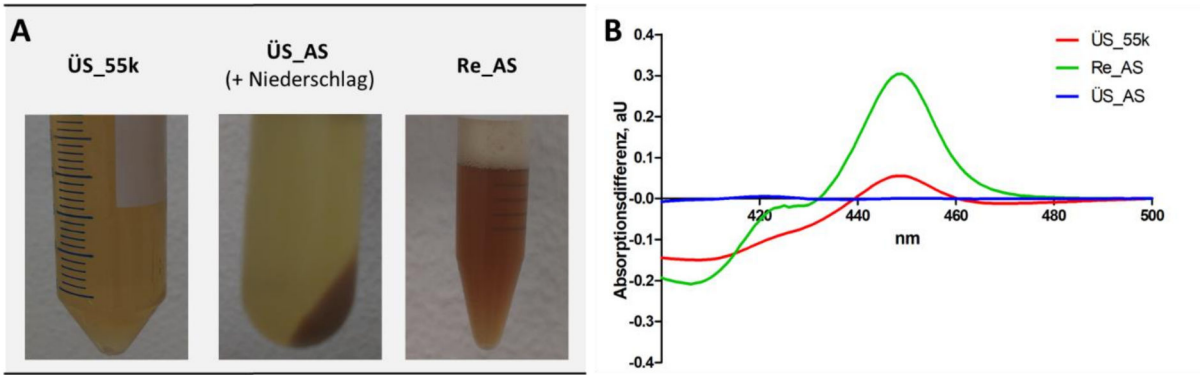

Abbildung 2.16 – Fällung der K_CYP72A1 aus *E. coli* Lysat mit Hilfe von Ammoniumsulfat und Analyse der erhaltenen Fraktionen mittels CO-Differenzspektren. Die K_CYP72A1 wurde in einem Kulturvolumen von 20 x 100 mL TB-Medium hergestellt und das nach Zellaufschluss erhaltene Homogenat bis zur Klärung zentrifugiert. K_CYP72A1 wurde anschließend mit 40 % $(NH_4)_2SO_4$ gefällt. A) Gezeigt ist die fotographische Dokumentation der fraktionierten Fällung: *E. coli*-Lysat mit K_CYP72A1 (ÜS_55k), Überstand bei 40 % der Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration (ÜS_AS) und in etwa einem Zehntel des Ausgangsvolumens gelöster Niederschlag (Re_AS). B) Gezeigt sind repräsentative CO-Differenzspektren der Proben, die während der fraktionierten Fällung zur Analyse aufgenommen wurden.

Die Bildausschnitte (Abbildung 2.16, A) illustrieren, dass ein rötlicher Niederschlag nach Zugabe von Ammoniumsulfat (Vergleiche ÜS_55k und ÜS_AS) erhalten wird. Dabei ändert sich die rötliche Färbung des Überstands von rötlich zu gelb. Der gelöste Niederschlag (Re_AS) weist im Vergleich eine erhöhte Intensität der charakteristischen Färbung im Vergleich zum

E. coli-Lysat auf. Dieser Trend ist auch auf den CO-Differenzspektren zu verfolgen (Abbildung 2.16, B). Nach der Fällung ist im Überstand kein 450 nm Signal oder 420 nm Signal erkennbar. Die auf das Volumen bezogene Signalintensität ist nach der Fällung (Re_AS) deutlich im Vergleich zur Probe mit Lysat (ÜS_55k) gestiegen. Eine Analyse mittels SDS-PAGE untermauert die vorherigen Beobachtungen (Kapitel 8.2.5), dass die K_CYP72A1 mit Ammoniumsulfat quantitativ gefällt und im Anschluss vollständig gelöst werden konnte. Auf Basis der CO-Differenzspektren bleibt nach Fällen und Lösen die Fähigkeit zur Aufnahme von Elektronen und Komplexierung von Kohlenmonoxid intakt und ist in Bezug auf das Volumen gesteigert. Durch Fällung mittels Ammoniumsulfats kann die K_CYP72A1 folglich von etwa 70 % der im Lysat erhaltenen Proteinverunreinigungen getrennt werden.

2.2 Biochemische Charakterisierung der K_CYP72A1

Die Variante der CYP72A1, K_CYP72A1, wurde einer biochemischen Charakterisierung unterzogen. Im Folgenden ist die Rekonstitution der Aktivität, eine Optimierung der RP und die biochemische Charakterisierung beschrieben.

2.2.1 Rekonstitution der Aktivität der K_CYP72A1

Die katalytische Aktivität der K_CYP72A1 ist sowohl für die biochemische Charakterisierung der P450 als auch als Biokatalysator für die Spaltung des Loganin-Fünfringes in der geplanten Kaskade von entscheidender Wichtigkeit. Das zuvor auf CO-Differenzspektren detektierte 450 nm Signal der K_CYP72A1 (Kapitel 2.1.3) weist auf mögliche katalytische Aktivität hin. Es sind verschiedene Möglichkeiten bekannt, dem katalytischen Zyklus einer P450 Elektronen zuzuführen. Bezugnehmend auf die CYP72A1 erfüllt diese Aufgabe *in vivo* eine diflavinhaltige Klasse II CPR (Q05001) aus dem Sekundärstoffwechsel von *C. roseus*.[297,298] Weil die CPR nicht durch Trunkierung der TM-Domäne in *E. coli* hergestellt werden konnte, wurden mögliche Surrogat-RP untersucht. Da die Elektronenübertragung bei CPR durch Flavin ermöglicht wird, sind ebenfalls Flavin-basierte RP-Systeme naheliegende Kandidaten. Hierzu wurden folgende nichtphysiologische RP auf eine mögliche Kompatibilität mit der K_CYP72A1 untersucht, da deren Verwendbarkeit als nicht-physiologische Redoxpartner in der Literatur dokumentiert ist: Ein bakterielles Zwei-Komponenten Redoxsystem der Klasse III bestehend aus dem FMN-abhängigen Flavodoxin YkuN aus *E. coli* und der FAD-abhängigen Ferredoxin/Flavodoxin Reduktase FpR[327,328] aus *B. subtilis*, ein Klasse II System bestehend aus einer pflanzlichen CPR aus *A. thaliana* (Ökotyp Colombia ATR2[329]) und ein artifizielles RP-System bestehend aus einer Fusion von YkuN und FpR (YR-P5[330]) (Abbildung 2.17).

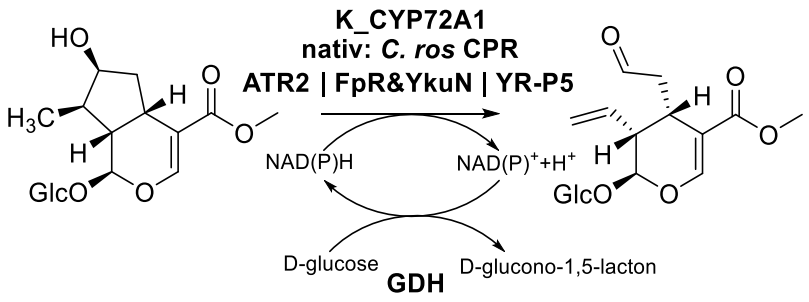

Abbildung 2.17 – Reaktionsschema der Umwandlung von Loganin durch K_CYP72A1. Der Elektronenbedarf der Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 wird in *C. roseus* durch eine CPR gedeckt. Es wurden unterschiedliche nicht-physiologische RP-Systeme (ATR2, FpR & YkuN und YR-P5) mit der K_CYP72A1 getestet.

Um die katalytische Aktivität der K_CYP72A1 für die geplante biochemische Charakterisierung und Kaskadenreaktion zu rekonstituieren, wurde die K_CYP72A1 jeweils mit unterschiedlichen Redoxpartnern in unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten zur Umsetzung von Loganin eingesetzt (Kapitel 6.5.1). Eine Glukose-Dehydrogenase (EC:1.1.1.47, *gdhIV*)[331] aus *Bacillus megaterium* wurde jeweils zur Regenerierung von NADPH eingesetzt. Die Reaktionen wurden im Hinblick auf die mittels Integration ermittelte Secologanin-DNPH-Signalfläche im LC/MS-Chromatogramm (Kapitel 6.4.1.3) evaluiert (Abbildung 2.18). Aus dem Balkendiagramm der Secologanin-Signalfäche ist ersichtlich, dass in allen vorliegenden Kombinationen eine K_CYP72A1-Aktivität gegenüber Loganin rekonstituiert werden konnte und Secologanin gebildet wurde. Die Versuche zeigen, dass der Großteil an Secologanin innerhalb der ersten 2 Stunden der Reaktion gebildet wurde und sowohl die Art als auch eingesetzte Konzentration der RP einen Einfluss auf die Secologanin-Bildung hatten. Im Vergleich zu ATR2 wurde mit YR-P5 bei der höchsten getesteten Konzentration etwa 30 % und bei Einsatz von FpR und YkuN bis zu 300 % mehr Produkt gebildet. Aufgrund der Tatsache, dass ATR2 wie die *C. roseus* CPR aus einem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel kommt, wurde erwartet, dass in dieser Kombination die höchste Effizienz der Wechselwirkung und folglich die höchste Produktausbeute erzielt wird. Möglicherweise war die Größe und Form des Elektronendonors der maßgebliche Faktor. Betrachtet man die Differenz der Secologanin-Signale bei zehnfachem RP-Überschuss, die zwischen zwei Stunden und zwanzig Stunden gebildet wurde, so war diese beinahe unabhängig von der Art der RP (vergleiche jeweils 10:1, 2 h und 10:1, 20 h). Ursächlich dafür könnte sein, dass bis zu einer Reaktionszeit von 2 Stunden Art und Konzentration der jeweiligen RP die Produktbildung limitieren und diese Faktoren bei längerer Reaktionsdauer an Gewicht verlieren. Ab zwei Stunden dominiert möglicherweise die verbleibende Aktivität der P450 und nicht die Art und Konzentration der RP die Reaktionsgeschwindigkeit.

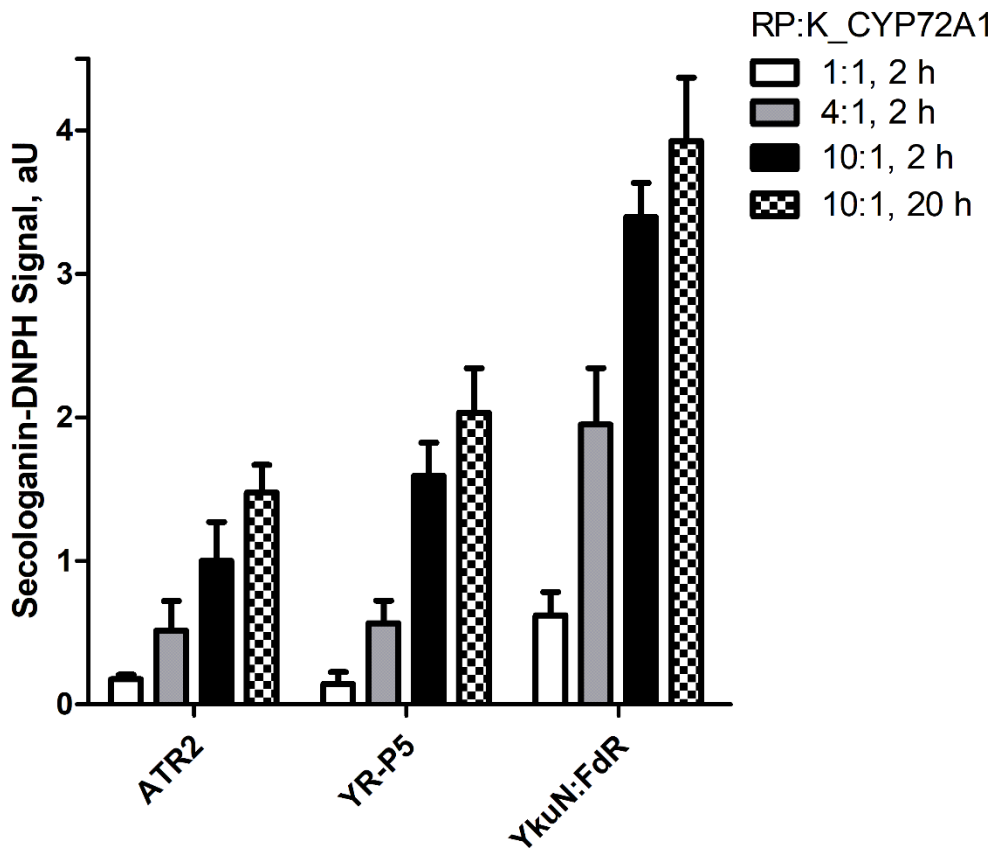

Abbildung 2.18 – Rekonstitution der Aktivität der K_CYP72A1 mit nicht-physiologischen RP anhand einer Umsetzung von Loganin. Es ist die ermittelte Secologanin-DNPH-Signalfläche aus Umwandlungen von Loganin durch K_CYP72A1 mit 1 bis 10 µM ATR2, YR-P5 oder FpR und YkuN gezeigt. Die Legende gibt das eingesetzte Verhältnis der RP und K_CYP72A1 in µM und die Inkubationsdauer an. Die Produktbildung wurde anhand der detektierten Intensität der Secologanin-DNPH-Signalfläche per LC/MS ermittelt. Die Probenvorbereitung wurde mit StageTips durchgeführt. Alle Werte sind auf die Reaktion 10:1, 2h mit ATR2 normiert. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei oder mehr Experimenten.

Der beobachtete Effekt könnte dadurch hervorgerufen werden, dass die effektive Konzentration noch aktiver P450 während der Reaktion stärker sinkt als die der Reaktionspartner und ab einem gewissen Punkt Sättigungseffekte dominieren. Das würde bedeuten, dass im Fall der K_CYP72A1 bei theoretisch unendlich hoher RP-Konzentration die Reaktionsgeschwindigkeit nur noch durch die Konzentration der P450 und nicht mehr durch die Wechselwirkung und Art der eingesetzten RP bestimmt wird. Grundsätzlich kann zusammengefasst werden, dass die Aktivität der K_CYP72A1 erfolgreich wiederhergestellt werden konnte.

Bei Kombination der bakteriellen RP YkuN und FpR mit der K_CYP72A1 wurde bei sämtlichen getesteten Enzymkonzentrationen und Inkubationszeiten unter vergleichbaren Bedingungen die größte Menge Secologanin detektiert. Deshalb wurden YkuN und FpR zur biochemischen Charakterisierung der K_CYP72A1 verwendet.

2.2.2 Optimierung des Verhältnisses von K_CYP72A1, YkuN und FpR

In Vorversuchen wurde beobachtet, dass die Konzentration der eingesetzten RP einen Einfluss auf die Secologanin-Bildung besitzen kann. Es ist literaturbekannt, dass das Verhältnis der RP- und P450-Konzentrationen einen erheblichen Einfluss auf den Substratumsatz ausüben kann.[332–334,330]

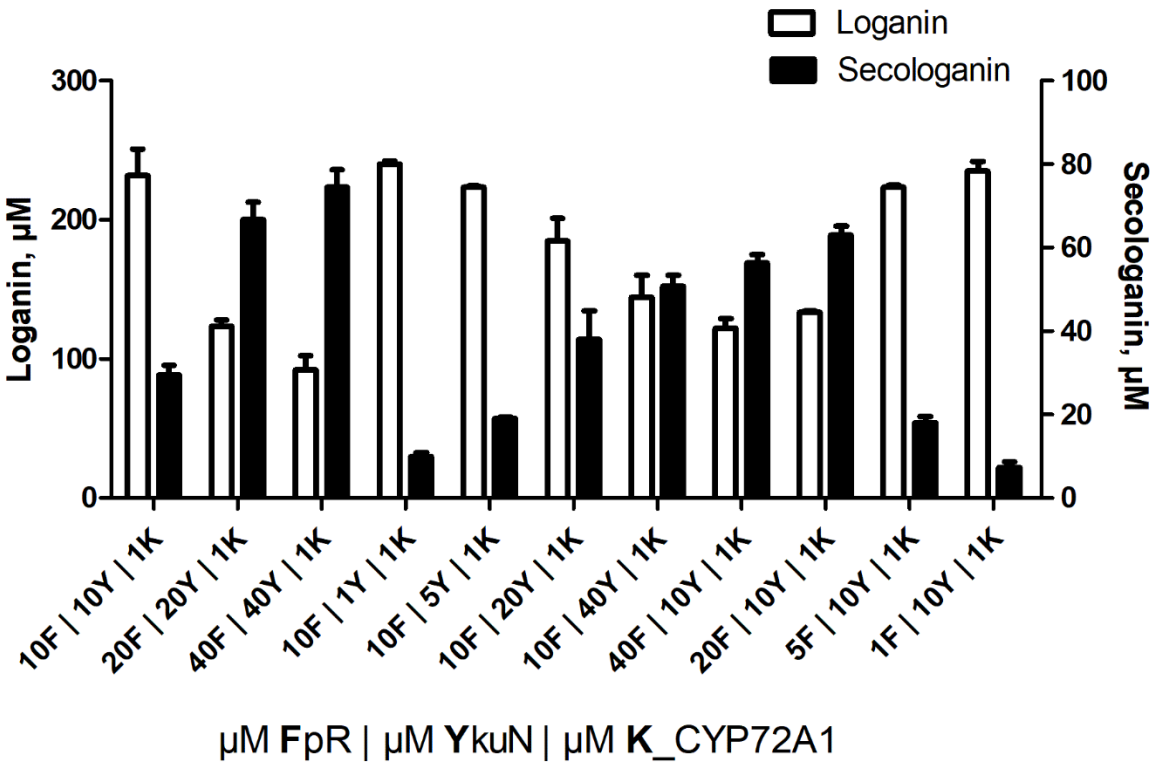

Abbildung 2.19 – Umsetzung von 250 µM Loganin durch K_CYP72A1 mit verschiedenen FpR und YkuN Konzentrationen. Es sind die aus der Umwandlung von Loganin durch K_CYP72A1 mit FpR und YkuN gemessenen Produktkonzentrationen nach 20 h bei 25 °C abgebildet. Die Umsetzung wurde mit jeweils verschiedenen Konzentrationen von 1 bis 40 µM FpR oder YkuN durchgeführt und die Endkonzentration von Secologanin und Loganin per LC/MS quantifiziert. Die Beschriftung der horizontalen Achse zeigt Anfangsbuchstaben der eingesetzten Proteine FpR (F), YkuN (Y) und K_CYP72A1 (K). Die vorgestellten Zahlen stehen für die jeweils eingesetzte Proteinkonzentration in µM. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei Experimenten. Die angegebenen Konzentrationen sind auf das Reaktionsvolumen von 100 µL bezogen.

Im Hinblick auf die geplante Etablierung einer enzymatischen Reaktionskaskade ist eine Optimierung der Secologanin-Produktion entscheidend. Es sollten mehr Informationen über den Einfluss der YkuN und FpR-Konzentration auf die Bildung von Secologanin durch K_CYP72A1 gewonnen und die Produktkonzentration in Bezug auf die eingesetzte Enzymmenge optimiert werden. Die konzentrationsabhängige Wechselwirkung zwischen YkuN, FpR und K_CYP72A1 wurde untersucht, indem die Umwandlung von Loganin jeweils mit 1 µM K_CYP72A1 1 bis 40 µM YkuN und 1 bis 40 µM FpR durchgeführt wurde (Kapitel 6.5.1). Anschließend wurden die Ergebnisse auf Basis der Produktkonzentrationen ausgewertet.

In Fortsetzung des beobachteten Trends war zu sehen, dass die quantifizierte Secologanin-Konzentration grundsätzlich mit der einer äquimolaren Erhöhung (10F|10Y|1K, 20F|20Y|1K und 40F|40Y|1K) der eingesetzten Menge FpR und YkuN anstieg (Abbildung 2.19). Im Einklang mit dieser Beobachtung wurde bei der höchsten eingesetzten RP-Konzentration (40F|40Y|1K) die höchste Secologanin-Konzentration beobachtet. Es war außerdem ein Sättigungseffekt zu sehen, wenn die Menge eingesetzter RP von 20F|20Y|1K auf 40F|40Y|1K erhöht wurde. Mögliche Erklärungen sind, dass ab einem bestimmten RP-Überschuss die Übertragung von Elektronen auf K_CYP72A durch *Crowding*-Effekte limitiert wird oder der Elektronenbedarf gesättigt ist.

Bei nicht-äquimolarem Verhältnis der RP wurde sowohl ein Effekt beim Verhältnis der YkuN und FpR Konzentration als auch beim Verhältnis der RP-zu-K_CYP72A1-Konzentration auf die Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 beobachtet.

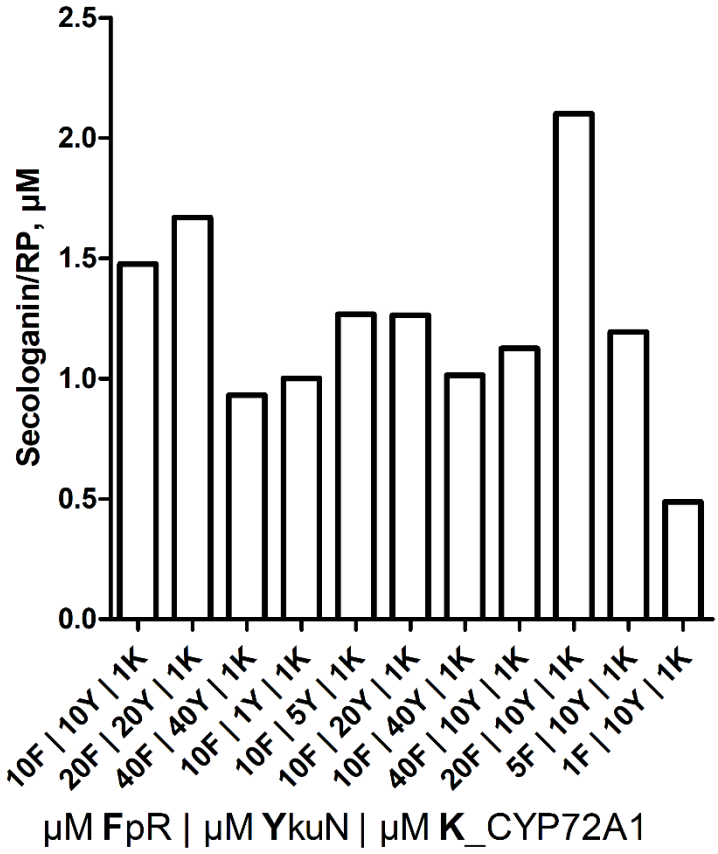

Abbildung 2.20 – Verhältnis von Secologanin und eingesetzter RP-Menge. Es ist der Quotient aus Produktkonzentration und der RP-Konzentration ([SL-DNPH]/[RP]) bezogen auf den jeweiligen Reaktionsansatz dargestellt.

Beispielsweise wurde bei der Reaktion 10F|5Y|1K überproportional weniger Produkt detektiert als bei 20F|10Y|1K. Umgekehrt wurde bei 5F|10Y|1K proportional zur FpR-Konzentration

weniger Produkt erzeugt als bei 10F|20Y|1K. In beiden Beispielen war jeweils das YkuN zu FpR-Verhältnis gleich, aber das RP-zu-K_CYP72A1-Verhältnis verändert.

Bei einem nicht-äquimolaren Verhältnis von YkuN und FpR war der Einfluss der FpR-Konzentration größer als der von YkuN. Dies ist beim Vergleich der Proben 20F|10Y|1K und 10F|20Y|1K oder 20F|10Y|1K und 20F|20Y|1K besonders deutlich zu sehen.

Auch bei der FpR-Konzentration wurden Sättigungseffekte beobachtet. Bei der Reaktion 40F|10Y|1K wurde weniger Secologanin erzeugt als bei 20F10Y1K. Die Stabilität der FpR könnte eine Erklärung für diese Beobachtungen liefern. Es ist bekannt, dass FpR in reduzierter Hydrochinon-Form zur Denaturierung neigt.[335] Wenn FpR im hohen Überschuss zu YkuN und zur K_CYP72A1 eingesetzt wurde, lag FpR wahrscheinlich in reduzierter Form vor.

In Anbetracht der Sättigungseffekte und weiterer konzentrationsabhängiger Faktoren wie der Enzymstabilität, wurde die Ökonomie der Umsetzung – die Secologanin-Konzentration pro µM FpR und YkuN – zur Evaluation miteinbezogen. Dazu wurde der Quotient der Produktmenge und der eingesetzten Menge RP berechnet (Abbildung 2.20). Bei 40F|40Y|1K wurde zuvor die höchste Secologanin-Konzentration quantifiziert. Unter Einbeziehung der eingesetzten Enzymkonzentration wurde bei 20F|10Y|1K die höchste Zielprodukt-Konzentration pro µM RP gemessen.

2.2.3 Zusammenhang zwischen der Absorptionsdifferenz bei 450 nm und der katalytischen Aktivität der K_CYP72A1 zur Umwandlung von Loganin

Die bei einer Umwandlung eingesetzte Konzentration katalytisch aktiver K_CYP72A1 ist bei der Charakterisierung häufig eine Bezugsgröße. Um die Konzentration zu bestimmen, wird die Absorptionsdifferenz bei 450 nm herangezogen. Dieser Konzentrationsbestimmung liegt die Annahme zugrunde, dass nur P450 zur Reaktion beiträgt, die eine Absorptionsdifferenz bei 450 nm besitzt. Diese Annahme wurde überprüft und dazu die katalytische Aktivität der 450 nm absorbierenden K_CYP72A1 mit 420 nm absorbierender K_CYP72A1 (hier jeweils bezeichnet als K450 und K420) bei Umsetzungen von Loganin (Kapitel 6.5.1) verglichen. Für K420 wurde K_CYP72A1-Lysat aus einer Kultur verwendet, bei der nach Zellhomogenisierung kein 450 nm Absorptionsmaximum im CO-Differenzspektrum zu sehen war (Abbildung 2.21, A). Die P450-Konzentration der K420-Probe wurde über den literaturbekannten Extinktionskoeffizienten (ε_{420} = 111 $cm^{-1}*mM^{-1}$) bestimmt (Kapitel 6.3.7). Als Messgröße der Reaktion diente die mittels Integration bestimmte Secologanin-DNPH-Signalfläche im LC/MS-Chromatogramm (Abbildung 2.21, B).

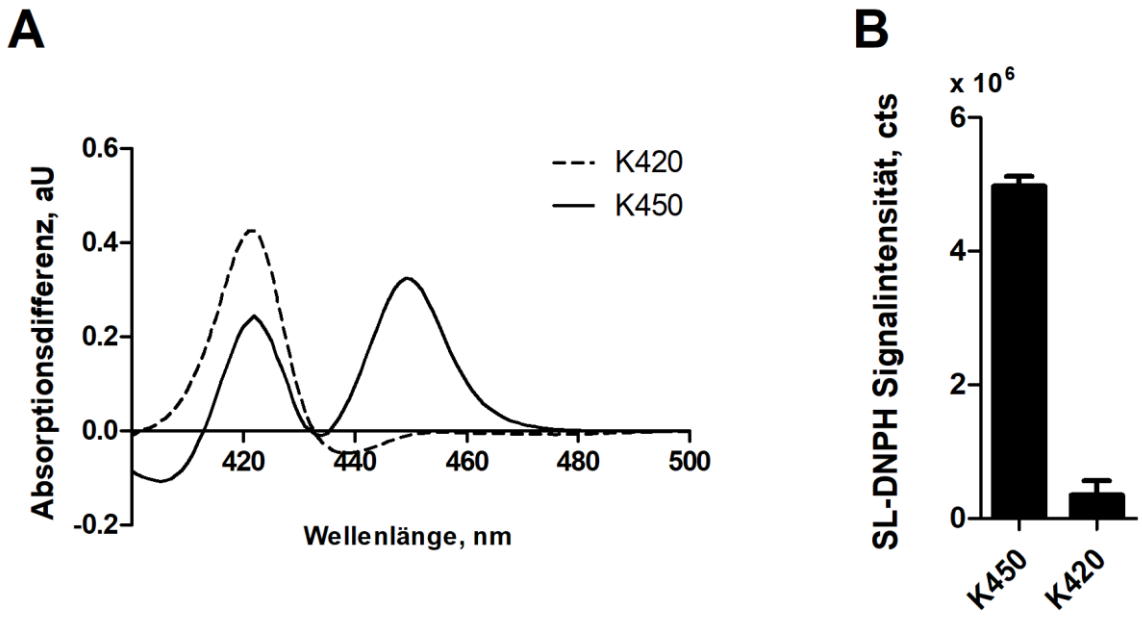

Abbildung 2.21 – CO-Differenzspektren und Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 mit und ohne Absorptionsdifferenz bei 450 nm. A) Repräsentative CO-Differenzspektren von K_CYP72A1-haltigem Zell-Lysat mit vorhandener (K 450) oder fehlender (K420) Absorptionsdifferenz bei 450 nm. B) Umsetzung von 500 µM Loganin durch 1 µM K_CYP72A1(K420) oder 1µM K_CYP72A1(K450). Gezeigt ist die Secologanin-DNPH-Signalfläche nach 2 h bei 25 °C in 100 µL Reaktionsvolumen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei Experimenten.

Es ist ersichtlich, dass K450 im Vergleich zur K420 etwa 15-mal mehr Secologanin bildet. Es ist darüber hinaus möglich, dass die geringe durch K420 gebildete Menge an Secologanin auf K450 in der Lösung zurückzuführen ist, die im CO-Differenzspektrum beispielsweise aufgrund der niedrigen Konzentration nicht erfasst wurde. Aus der Untersuchung geht hervor, dass bei der K_CYP72A1 eine gute Korrelation zwischen Absorption bei 450 nm und katalytischer Aktivität besteht. Die Abschätzung der K_CYP72A1-Aktivität durch CO-Differenzspektren ist somit validiert.

2.2.4 Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1

Wie die Vorversuche zeigen, wird die größte Menge Secologanin bei der Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 kurz nach Beginn der Reaktion gebildet. Eine temperaturbedingte Denaturierung der K_CYP72A1 könnte den beobachteten Effekt hervorrufen. Aus diesem Grund und um einen optimalen Temperaturbereich für die Umwandlung von Loganin zu identifizieren, wurde der Zeitverlauf der Umsetzung von Loganin unter dem Gesichtspunkt des Temperatureinflusses untersucht. Dazu wurden die Reaktionsansätze jeweils bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von 20 bis 35°C inkubiert, die etwa dem Temperaturbereich der Jahresdurchschnittstemperaturen des Lebensraums von *C. roseus* entsprechen (Kapitel

6.5.1).[336] Es wurde jeweils die Secologanin Bildung anhand der Signalfläche in LC/MS-Chromatogrammen zu definierten Zeitpunkten (20, 60, 180, 360 Minuten) nach Beginn der Reaktion analysiert (Abbildung 2.22).

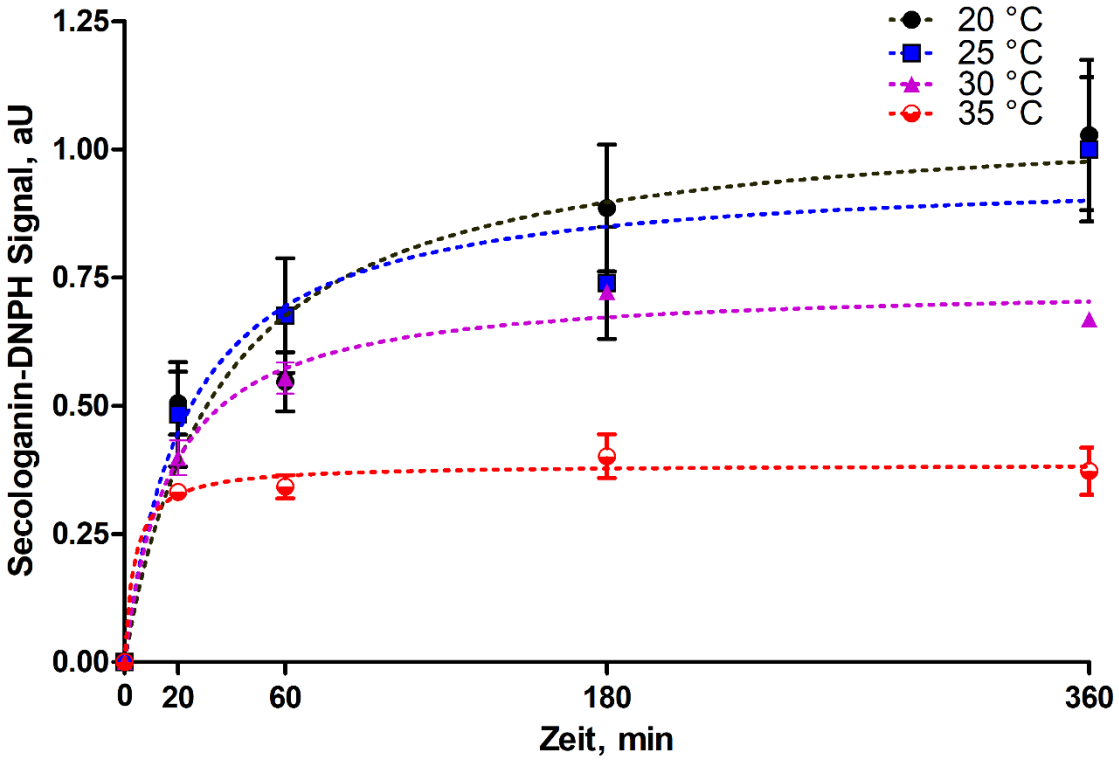

Abbildung 2.22 – Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen und Inkubationszeiten. Gezeigt sind die normierten Secologanin-DNPH Signalflächen aus der Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 bei 20 bis 35 °C und jeweils nach 20, 60, 180 und 360 min. Die Reaktionsansätze wurden nach der Derivatisierung mit StageTips extrahiert und per LC/MS analysiert. Die ermittelten Quotienten der SL-DNPH-Peakflächen und der Peakflächen des Internen Standards wurden auf die größte gemessene Fläche normiert und der Reaktionsverlauf durch einen nichtlinearen Fit angedeutet. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils mindestens drei Experimenten.

Aus dem Zeitverlauf ist ersichtlich, dass bei sämtlichen getesteten Reaktionstemperaturen bereits innerhalb der ersten 20 bis 60 Minuten nach Reaktionsbeginn – und nicht erst innerhalb der ersten 2 Stunden – ein Großteil der Endproduktmenge gebildet wurde. Die Menge an gebildetem Secologanin je Messintervall nahm bei allen Temperaturen mit fortschreitender Inkubationsdauer ab. Bei Reaktionstemperaturen über 25 °C waren diese Effekte besonders deutlich und die Reaktionen kamen früher zum Erliegen. Der Reaktionsverlauf bei 20 °C lässt keine definitive Aussage auf ein Erliegen der Reaktion in den ersten 360 Minuten zu.

Da die optimale Reaktionstemperatur möglicherweise außerhalb des erwarteten Temperaurbereichs liegt und bei niedrigeren Temperaturen längere Reaktionszeiten erreicht werden können, wurde ein größerer Temperaturbereich von 5 bis 35 °C über eine längere Reaktionsdauer untersucht (Kapitel 6.5.1, Abbildung 2.23).

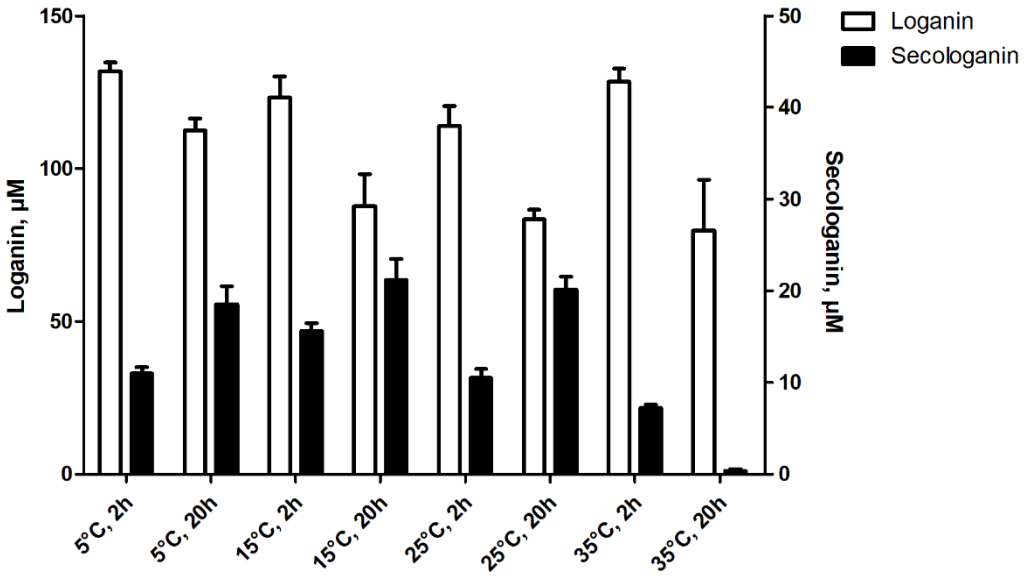

Abbildung 2.23 – Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 bei niedrigen Reaktionstemperaturen nach 2 und 20 h. Es sind die ermittelten Loganin- und Secologanin-Konzentrationen aus der Umwandlung von 150 µM Loganin durch K_CYP72A1 bei 5, 15, 25 und 35 °C und nach jeweils 2 und 20 h dargestellt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils mindestens drei Experimenten. Die angegebenen Konzentrationen sind auf das Reaktionsvolumen von 100 µL bezogen.

Die Ergebnisse, die im Balkendiagramm abgebildet sind, bestätigen die Beobachtung, dass bei Temperaturen unterhalb von 25 °C höhere Secologanin Endkonzentrationen erzielt werden können. Die Konzentration von Secologanin, die aus der Analyse der Reaktionsansätze nach 20 Stunden hervorging, war bei den Proben unterhalb von 25 °C im Rahmen der Standardabweichungen vergleichbar. Tendenziell wurde bei 5 °C ein geringerer Loganin-Verbrauch beobachtet als Proben oberhalb von 5 °C. Im Vergleich dazu nahm bei 35 °C die Loganin-Endkonzentration zwischen 2 Stunden und 20 Stunden in einem Ausmaß ab, das nicht in der gebildeten Secologanin-Menge in Einklang gebracht werden kann. Obwohl bei 2 Stunden Secologanin detektiert wurde, ist nach 20 Stunden fast kein Produkt mehr sichtbar. Der Effekt der reduzierten Produktbildung mit fortschreitender Reaktionsdauer korreliert folglich mit der Reaktionstemperatur. Diese Beobachtung ist unter anderem durch eine Inaktivierung der K_CYP72A1 oder RP zu erklären. Zusammen mit der ausbleibenden Temperaturabhängigkeit des Loganin-Umsatzes nach 20 Stunden bei 15 bis 35 °C und der niedrigen Secologanin-Konzentration bei 35 °C sind temperaturabhängige Neben- oder Zerfallsreaktionen ausgehend von Secologanin wahrscheinlich. Es kann zusammengefasst werden, dass Reaktionstemperaturen von 25 °C oder weniger optimal für die Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 sind. Oberhalb von 25 °C wurden reduzierte Produktausbeuten und eine schlechtere Atomökonomie bei Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 beobachtet.

2.2.5 Einfluss von Loganin und Secologanin auf die Produktkonzentration bei der Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1

In Vorversuchen wurde bei der Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 jeweils eine niedrige Secologanin-Konzentration detektiert. Zudem wurde beobachtet, dass die Neubildung von Secologanin abhängig von den Reaktionsbedingungen innerhalb der ersten 1–3 Stunden zum Erliegen kam. Eine mögliche Erklärung ist eine Produktinhibierung durch Secologanin. Es wurde untersucht, ob eine Substratinhibierung durch Secologanin vorliegt, indem zusätzlich 250 µM Secologanin im Reaktionsansatz vorgelegt wurden (Kapitel 6.5.1). Falls Secologanin die Reaktion inhibiert, sollte in diesem Reaktionsansatz weniger Secologanin synthetisiert werden. Diese Menge von Secologanin wurde aus der Differenz der ermittelten Secologanin-Endkonzentration und der Secologanin-Anfangskonzentration errechnet.

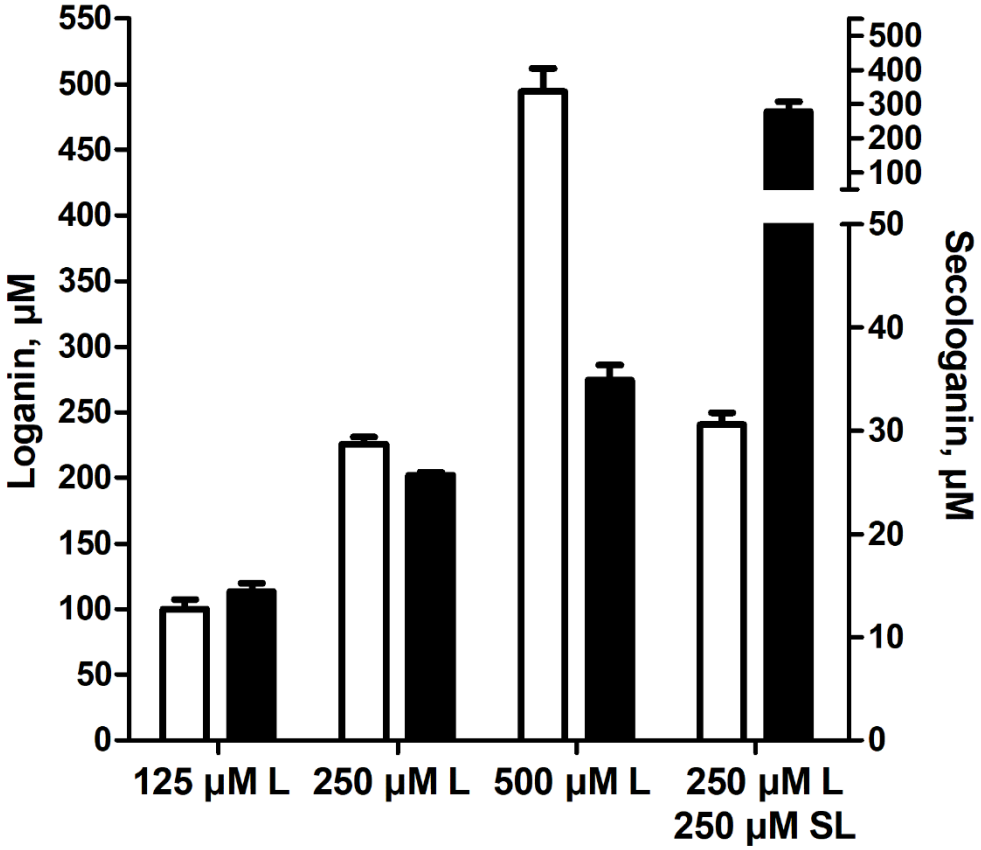

Abbildung 2.24 – Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 mit verschiedenen Loganin-Anfangskonzentrationen. Es sind die ermittelten Loganin- und Secologanin-Konzentrationen aus der Umwandlung von 125, 250 und 500 µM Loganin (L) durch K_CYP72A1 dargestellt. Zudem ist das Ergebnis einer Reaktion gezeigt, welche 250 µM Loganin und 250 Secologanin (SL) zu Reaktionsbeginn enthielt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei Experimenten. Die angegebenen Konzentrationen sind auf das Reaktionsvolumen von 100 µL bezogen.

Um eine mögliche Substratinhibierung zu untersuchen und die optimale Substratkonzentration bei gegebener Katalysatorkonzentration zu ermitteln, wurde der Einfluss von Loganin auf die

K_CYP72A1 untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Umsetzung von Loganin mit 125 bis 500 µM Loganin durchgeführt (Kapitel 6.5.1).

Bei der Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 war ein ungefähr proportionaler Zusammenhang zwischen der eingesetzten Substratmenge und Produktkonzentration sichtbar (Abbildung 2.24). Die absolute Secologanin-Konzentration stieg wie erwartet jeweils mit der eingesetzten Substratmenge. Eine Substratinhibierung wurde folglich nicht beobachtet. Beim Vergleich der eingesetzten Loganin-Konzentration und der detektierten Secologanin-Konzentration waren Sättigungseffekte sichtbar.

Bei 125 µM wurde etwa 12 % des eingesetzten Substrats in Secologanin umgewandelt, bei 250 µM Loganin waren es 10 % und bei 500 µM etwa 7 %. Die Konzentration des Zielprodukts stieg bei sehr hohen Substratkonzentrationen nicht mehr proportional zur Substratkonzentration. Folglich lag die optimale Substratkonzentration bei den gegebenen Reaktionsbedingungen im Bereich von 250 µM Loganin.

Wenn 250 µM Secologanin im Reaktionsansatz vorgelegt wurde (250 µM L + 250 µM SL), war unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen (vgl. 250 µM L) eine vergleichbare Konzentration von synthetisiertem Secologanin und ein vergleichbarer Substrat-Verbrauch sichtbar. Es gab folglich keine Hinweise dafür, dass Secologanin durch K_CYP72A1 umgewandelt wurde, unter den Reaktionsbedingungen instabil ist, oder die K_CYP72A1 inhibiert. Für den Fall einer Inhibition durch Secologanin wurde ein geringerer Substratverbrauch und eine geringere Produktbildung als bei der Vergleichsreaktion erwartet. Es ist hier anzumerken, dass die Reaktion 250 µM L möglicherweise nicht von der Probe mit vorgelegtem Secologanin zu unterscheiden ist, wenn eine Produktinhibierung bereits bei sehr niedrigen Secologanin-Konzentrationen (z. B. < 1 µM) in großem Umfang auftritt. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Hemmung durch Nebenprodukte der Reaktion stattfindet. Bei Nebenprodukten ausgehend von Secologanin ist plausibel, dass deren Bildung von der Secologanin-Konzentration abhängig ist. Das plausible Nebenprodukt Secoxyloganin, das aus der Überoxidation von Secologanin gebildet wird, konnte – möglicherweise auch aufgrund von Instabilität – nicht, oder nur in Spuren detektiert werden. Auch Nebenprodukte von Secologanin, die aus einer möglichen Hydrolyse oder Bildung von Schiff-Basen hervorgehen, konnten nicht detektiert werden.

2.2.6 Stabilität der K_CYP72A1 während der Umsetzung von Loganin

Vorexperimente zeigten, dass die gebildete Menge Secologanin bei der Umwandlung von Loganin durch K_CYP72A1 abhängig von der Temperatur etwa nach zwei Stunden nicht mehr deutlich ansteigt. Möglicherweise ist die Wahrscheinlichkeit der K_CYP72A1 hoch, während

einer Reaktion zu denaturieren. Aufgrund einer niedrigen Kopplungseffizienz könnten beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, die zur Denaturierung der K_CYP72A1 führen. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass Absorption bei 450 nm auf CO-Differenzspektren als Indikator für eine korrekte Proteinfaltung und katalytische Aktivität der K_CYP72A1 gewertet werden kann. Um Informationen darüber zu gewinnen, welchen Effekt die Umwandlung von Loganin auf den Zustand der K_CYP72A1 besitzt, wurde der Zeitverlauf der Absorptionsdifferenz bei 450 nm während einer Reaktion untersucht. Dazu wurde die 450 nm Absorptionsdifferenz zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Reaktionsansätzen ermittelt und mit Proben verglichen, bei denen die K_CYP72A1 unter gleichen Bedingungen in Puffer inkubiert wurde (Kapitel 6.5.1). Zugleich wurde die Produktbildung in den Reaktionsansätzen analysiert.

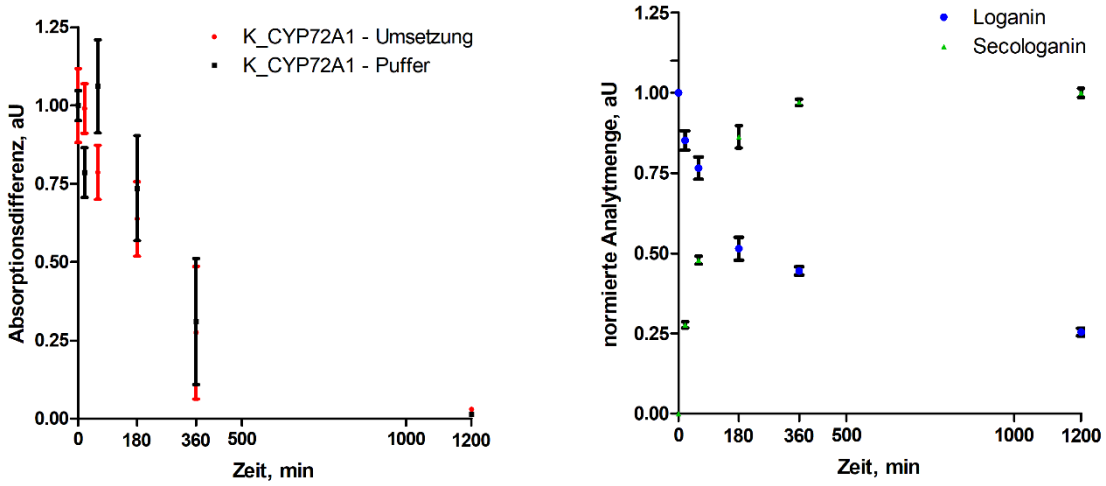

Abbildung 2.25 – Umwandlung von Loganin durch K_CYP72A1 und Verlauf der mittels CO-Differenzspektren ermittelten Absorptionsdifferenz bei 450 nm. Die linke Hälfte der Abbildung zeigt den Zeitverlauf der mittels CO-Differenzspektren ermittelten normierten Absorptionsdifferenz bei 450 nm. Diese wurden während einer Umsetzung von Loganin durch 1 µM K_CYP72A1 oder mit 1 µM K_CYP72A1 in Puffer nach 0 bis 1200 min aufgenommen. Die rechte Hälfte der Abbildung zeigt die auf die Anfangskonzentration normierte Analytmenge der Umsetzung bei 0 bis 1200 min. Die Werte sind Mittelwerte aus drei Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

Aus den Zeitverläufen der Absorptionsdifferenz bei 450 nm ist ersichtlich, dass die Änderung der bestimmten Absorptionswerte der K_CYP72A1 unabhängig davon stattfand, ob Loganin umgewandelt wurde oder die K_CYP72A1 in Puffer bei 25 °C inkubiert wurde (Abbildung 2.25). Folglich wird die K_CYP72A1 nicht während der Umsetzung von Loganin denaturiert. Die detektierte Abnahme der Absorptionsdifferenz bei 450 nm kann auf die Stabilität der K_CYP72A1 zurückgeführt werden, die beispielsweise von Faktoren wie den Modifikationen am N-Terminus, Reaktionsbedingungen und dem Reaktionsmedium abhängig sein kann.

Nach 180 Minuten fand kaum noch Neubildung von Secologanin statt, jedoch deutete die Absorptionsdifferenz bei 450 nm darauf hin, dass noch etwa 75 % der K_CYP72A1 in aktiver Form vorlag. Zugleich war nach drei Stunden weiterhinein ein Verbrauch von Loganin sichtbar. Möglicherweise wurde Loganin weiterhin zu Secologanin umgewandelt, aber die sichtbare Neubildung von Secologanin wurde durch eine Nebenreaktion reduziert.

2.2.7 Einfluss des pH-Wertes auf die Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1

Es ist bekannt, dass die katalytischen Eigenschaften von P450 und die Stabilität der FpR durch den pH-Wert beeinflusst werden können.[337,335]

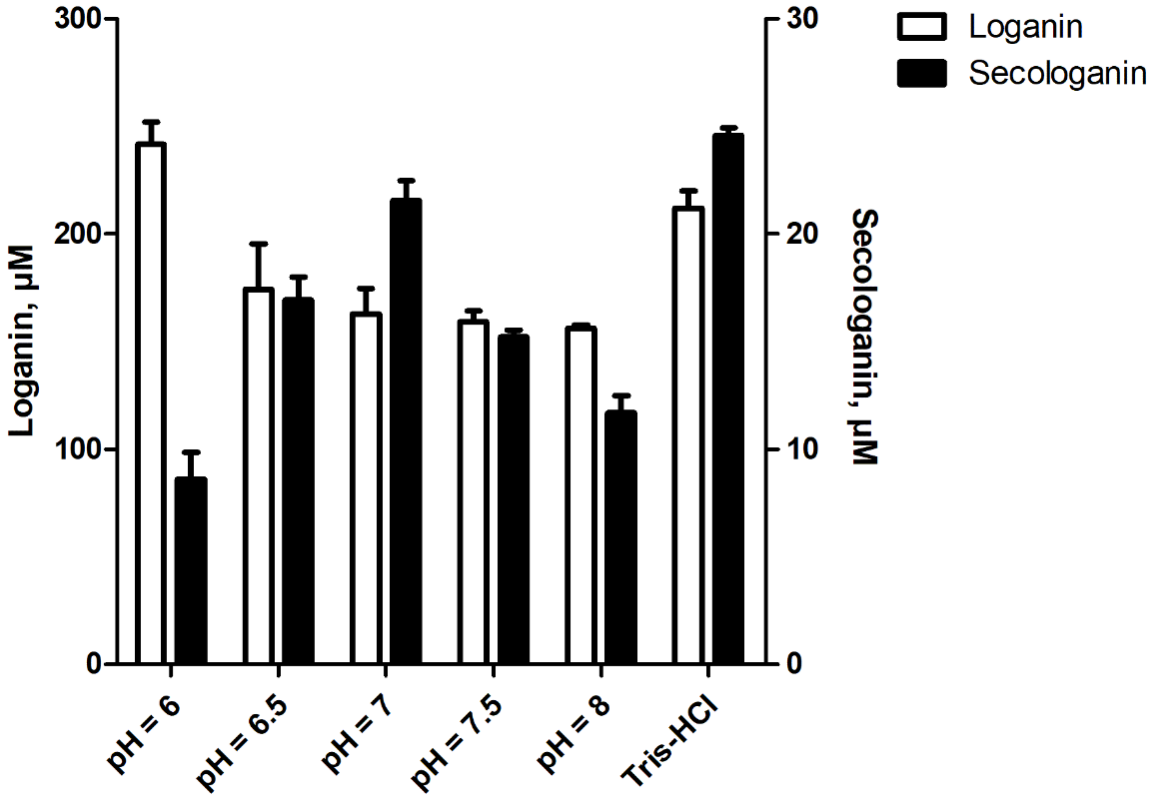

Abbildung 2.26 – Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 bei unterschiedlichen pH-Werten. Es sind die ermittelten Loganin- und Secologanin-Konzentrationen aus der Umwandlung von Loganin durch K_CYP72A1 bei pH 6 bis 8 dargestellt. Die pH-Werte wurden jeweils durch Zugabe von 50 µL 0,2 M Phopshatpuffer in einem Endvolumen von 100 µL eingestellt. Die Werte sind Mittelwerte aus drei Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Die angegebenen Konzentrationen sind auf das Reaktionsvolumen von 100 µL bezogen.

Um den pH-Wert für die Bildung von Secologanin im vorliegenden System zu optimieren, wurde die Reaktion bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Die K_CYP72A1 wurde üblicherweise in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5, bei 4 °C) gelagert. Um auch pH-Werte im leicht sauren Bereich untersuchen zu können, wurde Phosphatpuffer verwendet.

Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit wurde der pH-Wert der Reaktionslösung bei allen Proben durch Zugabe von 50 µL 200 mM Phosphatpuffer auf den zu untersuchenden Wert

eingestellt (Tabelle 5.1). Dies bewirkte, dass der angestrebte pH-Wert bei einer Phosphatpuffer-Endkonzentration von 100 mM in einem 100 µL Endvolumen erreicht wurde (Kapitel 6.5.1). Die Reaktionen wurden auf Basis der Produktkonzentration bei unterschiedlichen pH-Werten evaluiert (Abbildung 2.26). Aus dem Balkendiagramm geht hervor, dass der pH-Wert einen erheblichen Einfluss auf die Secologanin-Konzentration besitzt. Das pH-Optimum liegt etwa im Neutralen bei pH 7. Im Vergleich zum Optimum fällt die gebildete Secologanin-Konzentration sowohl bei Abweichungen ins Saure als auch Basische deutlich ab.

Der üblicherweise verwendete Puffer (50mM Tris-HCl) besitzt bei der Inkubationstemperatur von 25 °C einen pH-Wert, der aufgrund der Temperaturabhängigkeit des pKs-Wertes ($\Delta pKs = -0{,}031$ 1/K) von Tris(hydroxymethyl)aminomethan im Bereich des ermittelten Optimums von pH 7 liegt. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Zugabe von Phosphatpuffer – oder möglicherweise eine erhöhte Salzkonzentration – wie erwartet einen negativen Einfluss auf die Endkonzentration des Zielprodukts ausüben. Zugleich wurde bei pH 6.5 bis 8 nach der Reaktion jeweils weniger Loganin als bei pH 6 und in Tris-Puffer detektiert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass mehr Loganin umgewandelt wurde. Diese Beobachtung könnte durch eine Änderung der Effizienz der Elektronenübertragung erklärbar sein. Aus verschiedenen Studien zum Beispiel mit CYP1A2 und CYP2B4 ist literaturbekannt, dass die Ionizität des Reaktionsmediums die elektrostatische Wechselwirkung zwischen RP und P450 und auch die Struktur der P450 beeinflussen kann.[338–340] Vornehmlich auf den Chromatogrammen der Phosphatpuffer-Reaktionen bei pH 6.5 bis 8 waren zusätzliche Peaks sichtbar, die möglicherweise auf Nebenprodukte zurückgeführt werden können. Allerdings ist diese Schlussfolgerung mit Vorsicht zu betrachten, da die beobachtete Steigerung des Loganin-Umsatzes oberhalb von pH 6 genau mit der pH-abhängigen Dissoziation von Dihydrogenphoshphat-Anionen übereinstimmt. Bei pH 6 liegen hauptsächlich $H_2PO_4^-$-Ionen und bei pH 6.5 bis 8 vorwiegend HPO_4^{2-}-Ionen vor.[341] Es ist also denkbar, dass die Änderung der gemessenen Loganin-Konzentration teilweise auf den Phosphatpuffer zurückzuführen ist.

2.2.8 Einfluss der K_CYP72A1-Konzentration auf die Umsetzung von Loganin

Es ist zu erwarten, dass einer Erhöhung der K_CYP72A1-Konzentration eine proportionale Erhöhung der erzielten Produktkonzentration folgt, wenn die verfügbare Substratmenge nicht limitierend ist. Eine nicht-proportionale Abhängigkeit könnte beispielsweise auf konzentrationsabhängige Protein-Protein-Wechselwirkungen, Produktinhibierung oder eine konzentrationsabhängige Stabilität der K_CYP72A1 hindeuten. Deshalb wurde der Einfluss der Konzentration der K_CYP72A1 auf die Umwandlung von Loganin im Konzentrationsbereich von 0.5 bis 2 µM untersucht (Kapitel 6.5.1). Im Versuch ist die absolute Menge eingesetzter

RP jeweils konstant, um ausschließlich den Einfluss der K_CYP72A1-Konzentration zu untersuchen. Es wurde beobachtet, dass bei gleichbleibender RP-Konzentration ein proportionaler Zusammenhang zwischen Secologanin-Konzentration und der eingesetzten K_CYP72A1-Konzentration vorlag (Abbildung 2.27). Eine Konzentrationsabhängigkeit der K_CYP72A1-Stabilität oder konzentrationsabhängige Protein-Protein-Wechselwirkungen, welche die Aktivität der K_CYP72A1 im untersuchten Konzentrationsbereich beeinflussen, können als unwahrscheinlich betrachtet werden.

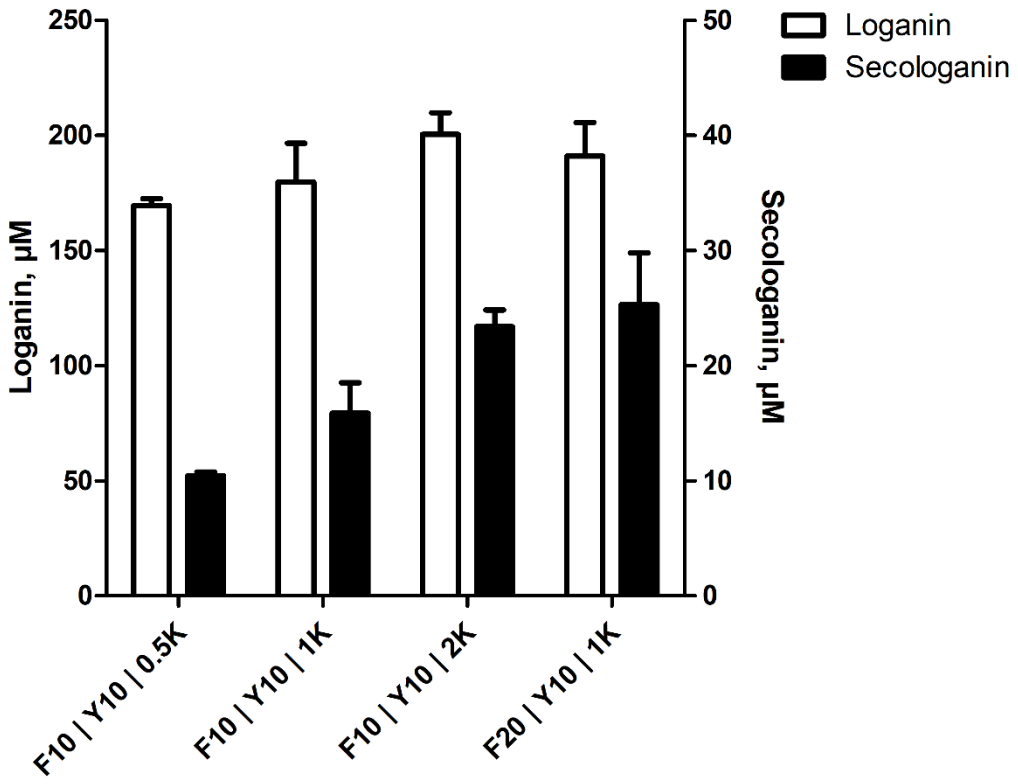

Abbildung 2.27 – Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 bei unterschiedlichen Enzym-Konzentrationen. Es sind die ermittelten Loganin- und Secologanin-Konzentrationen aus der Umwandlung von Loganin durch 0,5 bis 2 µM K_CYP72A1 dargestellt. Die Beschriftung der horizontalen Achse zeigt Anfangsbuchstaben der eingesetzten Proteine FpR (F), YkuN (Y) und K_CYP72A1 (K). Die nachgestellten Zahlen stehen für die jeweils eingesetzte Proteinkonzentration in µM. Die Werte sind Mittelwerte aus drei Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Die angegebenen Konzentrationen sind auf das Reaktionsvolumen von 100 µL bezogen.

Einem abgestimmten RP-Verhältnis (F20|Y10|1K) konnte ein vergleichbarer positiver Effekt auf die Bildung von Secologanin beigemessen werden, wie einer Verdopplung der K_CYP72A1-Konzentration. Dies unterstreicht die Wichtigkeit eines abgestimmten P450 zu RP-Verhältnisses

2.2.9 Kinetische Parameter der K_CYP72A1

Ein Ziel dieser Arbeit ist eine biochemische Charakterisierung der K_CYP72A1. Die in Vorversuchen beobachtete niedrige Aktivität der K_CYP72A1 steht im Einklang mit der vermuteten Rolle der CYP72A1 als Engpass bei der Strictosidin-Biosynthese. Die kinetischen Parameter der K_CYP72A1 wurden ermittelt, um diese Vorergebnisse mit konkreten Zahlen zu untermauern. Dazu wurden Substratkonzentrationen von 0 bis 1000 µM vorgelegt und mit einer bekannten Konzentration der K_CYP72A1 umgesetzt. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wird die Bildungsgeschwindigkeit von Secologanin pro Sekunde gegen die eingesetzte Substratmenge aufgetragen (Kapitel 6.5.1). YkuN und FpR wurden dabei als Redoxpartner verwendet, da mit den bakteriellen Flavoproteinen die höchsten Secologanin-Konzentrationen erreicht wurden (Kapitel 2.2.1). Es ergab sich eine Sättigungskurve mit einem nichtlinearen Verlauf, die sich asymptotisch dem Sättigungswert nähert (Abbildung 2.28).

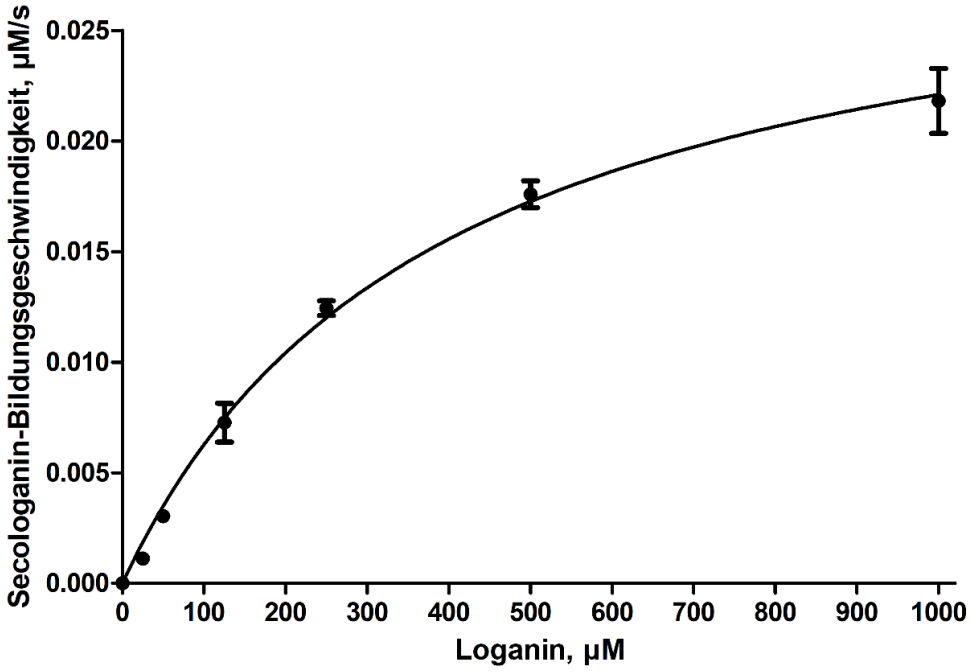

Abbildung 2.28 – Umsetzung von Loganin der K_CYP72A1 mit FpR und YkuN. Es ist die Bildungsgeschwindigkeit von Secologanin bei Loganin-Konzentrationen von 0 bis 1000 µM dargestellt. Es wurden v_{max} und K_{mapp} für die K_CYP72A1 ermittelt. Die Daten wurden durch nichtlineare Regression ausgewertet und die kinetischen Parameter basierend auf der Formel $\boldsymbol{v = Vmax * [S]/(Km + [S])}$ berechnet. Die Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

Mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung wurde für die maximale Geschwindigkeit ein Wert v_{max} von 1,84 ± 0,052 µM x min^{-1} ermittelt. Aufgrund der bekannten eingesetzten Enzymkonzentration ergab sich für k_{cat} ein Wert von 1,84 ± 0,052 min^{-1}. Für die Michaeliskonstante wurde ein Wert von K_m 389 ± 24,92 µM bestimmt. Die niedrige beobachtete Substrataffinität und Wechselzahl sind in Übereinstimmung mit den

Beobachtungen aus den Vorexperimenten und der vermuteten Rolle der CYP72A1 als Engpass der Strictosidin-Biosynthese.

2.2.10 Kopplungseffizienz mit nicht-physiologischen RP

Wie vorangegangenen Versuche ergaben, ist die katalytische Aktivität der K_CYP72A1 abhängig von der Art und Konzentration der Redoxpartner. Der Wirkungsgrad der Wechselwirkung zwischen der K_CYP72A1 und den RP ist folglich entscheidend.

Eine geringe Kopplungseffizienz – verstärkt oder verursacht durch die verwendeten nicht-physiologischen Redoxpartner – könnte die beobachtete niedrige Aktivität der K_CYP72A1 erklären. Aus diesem Grund wurde die Kopplungseffizienz der K_CYP72A1 mit den Redoxpartnern YkuN und FpR sowie mit YR-P5 und ATR2 untersucht. Die Kopplungseffizienz wurde bei der Umsetzung von Loganin aus der quantifizierten Secologanin-Stoffmenge berechnet, die unter Verbrauch einer NADPH-definierten Stoffmenge gebildet wurde (Kapitel 6.5.1). Die NADPH-Verbrauchsrate wurde dabei photometrisch – anhand der Absorption bei 340 nm – überwacht. Die Kopplungseffizienz kann als Maßstab für die Effizienz interpretiert werden, mit der ein System Redoxäquivalente zur Produktbildung verwendet.

Tabelle 2.5 – Kopplungseffizienz bei der Umwandlung von Loganin durch K_ CYP72A1. Es sind die NADPH-Verbrauchsraten und Produktkonzentrationen bei der Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 (K) mit den RP ATR2, YR-P5 und FpR (F) & YkuN (Y) aufgelistet. Die vorstehenden Zahlen stehen für die eingesetzten Enzymkonzentrationen im Reaktionsvolumen von 100 µL. Der NADPH-Verbrauch wurde photometrisch mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt. Die NADPH-Verbrauchsraten sind inklusive des Hintergrundzerfalls von NADPH unter Versuchsbedingungen angegeben. Anschließend wurde die Secologanin-Konzentration mittels LC/MS quantifiziert.

Ansatz	NADPH-Verbrauch µM/min	Secologanin µM	Kopplungseffizienz %
10F | 10Y | 1K	124,4 ± 11,5	5,5 ± 0,1	0,57
20F | 10Y |1K	191,4 ± 18,0	5,2 ± 0,3	0,54
40F | 40Y |1K	479,0 ± 91,4	4,8 ± 0,1	0,50
10F | 10Y | 0K	35,9± 2,1	-	-
10ATR2 | 1K	53,4 ± 2,8	< 1*	< 0,1
10YR-P5 | 1K	116,9 ± 21,4	1,22 ± 0,2	0,13
0 RP| 1K	41,3 ± 2,1	-	-
0F | 10Y | 1K	48,9 ± 23,9	-	-
10F | 0Y | 1K	104,8 ± 13,8	-	-
nur Puffer	0,9 ± 0,3	-	-

*unterhalb der Detektionsgrenze

Die ermittelte Kopplungseffizienz war mit allen getesteten RP niedrig (Tabelle 2.5). Die Kopplungseffizienz der jeweils getesteten Systeme spiegelt die Ergebnisse aus den Vorversuchen wider. Das beste System war Fpr und YkuN. Deutlich geringere Werte wurden mit YR-P5 und ATR2 mit der K_CYP72A1 beobachtet. Die Menge Secologanin, die in Kombination mit YR-P5 gemessen wurde, lag an der Detektionsgrenze. Mit ATR2 wurde so wenig Secologanin gebildet, dass die Konzentration nicht bestimmt werden konnte. Im Bezug auf die eingesetzte FpR- und YkuN-Konzentration war bei der Kopplungseffizienz ein negativer Trend sichtbar. Bei 40F | 40Y | 1K wurde ein deutlich höherer NADPH-Verbrauch pro Minute ermittelt, während im Trend weniger Secologanin detektiert wurde, als bei 10F | 10Y | 1K. Im vorliegenden System verbessert eine höhere RP-Teilchenzahl offenbar nicht in proportionaler Weise die Anzahl produktiver Wechselwirkungen mit der K_CYP72A1. Wenn keine Regeneration von NADPH vorhanden ist, führt die schlechtere Kopplungseffizienz im Ergebnis zu einer niedrigeren Secologanin-Konzentration. Die geringen beobachteten Kopplungseffizienzen sind eine wahrscheinliche Erklärung für die beobachtete niedrige Aktivität der K_CYP72A1.

2.3 Entwicklung und Optimierung einer Kaskadenreaktion zur biokatalytischen Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin

Im folgenden Kapitel ist beschrieben, wie die Enzyme LAMT, K_CYP72A1 und STR zu einer Reaktionsfolge rekonstituiert wurden. Im Anschluss an die Etablierung ist eine Optimierung der Kaskadenreaktion beschrieben.

2.3.1 Etablierung Kaskadenreaktion zur Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin

Ein Ziel dieser Arbeit ist es eine mehrstufige enzymatische Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin auf Basis der rekonstituierten Aktivität der K_CYP72A1 *in vitro* zu etablieren. Zu diesem Zweck wurden die *C. roseus* LAMT und *R. serpentina* STR jeweils in *E. coli* hergestellt und anschließend mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA gereinigt (Kapitel 8.2.1). Um katalytische Aktivität zu ermöglichen, weist die vorliegende Kaskade einige Unterschiede zur natürlichen Reaktion in *C. roseus* auf (Abbildung 2.29).

Neben dem fehlenden Wirtsorganismus sind ein System zur Regeneration der Kofaktoren und heterologe Redoxpartner zur Rekonstitution der Aktivität der modifizierten K_CYP72A1 notwendig. Zur Aufrechterhaltung der Methylierungsreaktion von Loganinsäure durch LAMT wird der notwendige Kofaktor SAM im vierfachen molaren Überschuss zugegeben. Eine trunkierte STR aus *R. serpentina* wurde eingesetzt, da diese eine höhere Stabilität[177] besitzt als die STR aus *C. roseus*.

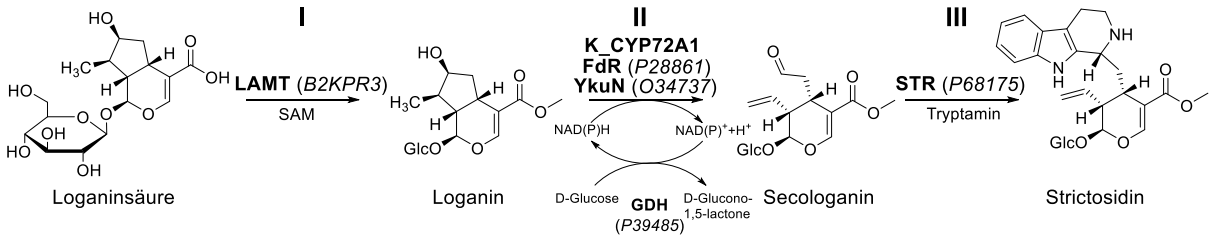

Abbildung 2.29 – Schematische Darstellung der biokatalytischen Umwandlung von Loganinsäure zu Strictosidin. Die mehrstufige Synthese von Strictosidin wird durch aufeinanderfolgende Aktivität der LAMT, K_CYP72A1 und STR katalysiert.

Für die Kaskade wurden alle benötigten Proteine, Kofaktoren und Substrate vorgelegt und die Reaktionsansätze für 20 h bei 25 °C inkubiert (Kapitel 6.5.2). Um Informationen über den Einfluss der Proteine auf die Produktbildung zu gewinnen, wurde die K_CYP72A1 in Konzentrationen von 0 bis 2 µM eingesetzt.

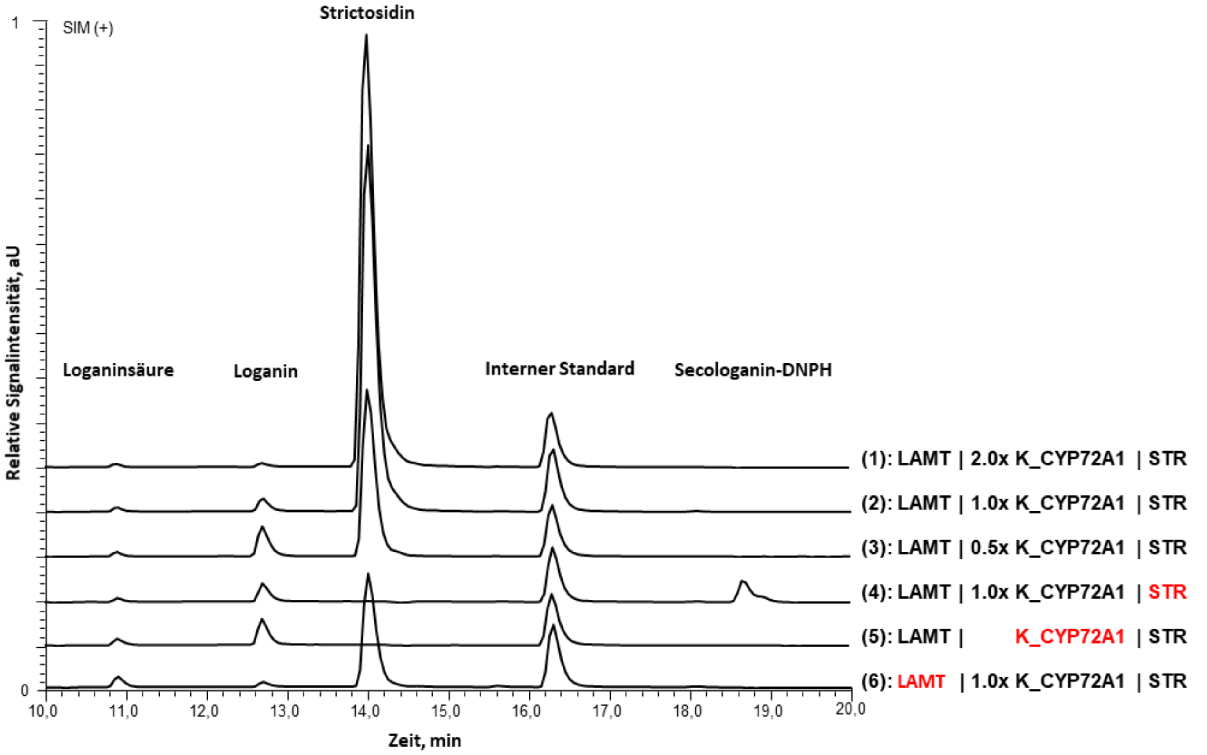

Abbildung 2.30 – Mehrstufige Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin durch LAMT, K_CYP72A1 und STR. Es sind im SIM(+) Modus aufgezeichnete Chromatogramme nach der Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin durch LAMT, 0 bis 2 µM K_CYP72A1 mit FpR und YkuN und STR dargestellt. Die Reaktionsansätze wurden nach einer Reaktionsdauer von 20 h bei 25 °C derivatisiert, gefriergetrocknet per LC/MS analysiert. Rechts neben den Chromatogrammen sind die jeweils eingesetzten Enzyme aufgeführt. Rot markiertes Enzym war im Reaktionsansatz nicht vorhanden. Die Basislinie der Chromatogramme (1) bis (5) wurde aus Darstellungsgründen parallel in Ordinatenrichtung verschoben.

Zudem wurde der Einfluss fehlender LAMT und STR untersucht. Die Chromatogramme, die jeweils im *Selected-ion-monitoring*-Modus (SIM-Modus) aufgezeichnet wurden, zeigen, dass die Signalfläche der Strictosidin-Peaks – wie erwartet – mit der eingesetzten K_CYP72A1-Konzentration zunimmt (Abbildung 2.30, (1) bis (3)). Die Höhe des

Strictosidin-Signals konnte durch eine Vervierfachung der P450-Konzentration etwa verdreifacht werden. Unter den Reaktionsbedingungen war sowohl ein Signal des Ausgangsprodukts Loganinsäure als auch vom Zwischenprodukt Loganin sichtbar. Beide Umwandlungen liefen folglich jeweils unvollständig ab. Die Signalfläche von Loganin war etwa umgekehrt proportional zur eingesetzten K_CYP72A1-Konzentration. Die Bildung von Loganin ist schneller als die Umwandlung zu Secologanin.

Insofern die geringe Signalintensität diese Beobachtung zulässt, ist die Loganinsäure-Signalfläche weitestgehend unabhängig von der K_CYP72A1-Konzentration. Nur in Abwesenheit von STR (4) kann Secologanin detektiert werden. Folglich reagiert Secologanin sofort unter Verbrauch von Tryptamin zu Strictosidin. Es ist auffällig, dass bei vollständiger Reaktionsfolge (1) bis (3) kein Secologanin detektiert werden konnte, jedoch bei allen getesteten Bedingungen jeweils ein Loganin-Signal erkennbar war. Es ist somit naheliegend, dass die Aktivität der K_CYP72A1 die Bildung von Strictosidin in der vorliegenden mehrstufigen Synthese limitiert.

Entgegen den Erwartungen wurde ein Loganin- und Strictosidin-Peak auch dann detektiert, wenn LAMT (6) im Reaktionsansatz fehlte. Eine plausible Erklärung dafür ist das im Reaktionsansatz enthaltene, K_CYP72A1-haltige *E. coli* Zell-Lysat. Eine *E. coli*-Methyltransferase könnte Reaktivität gegenüber Loganinsäure aufweisen. In Puffer wurde ohne LAMT in Gegenwart von SAM keine Methylierung von Loganinsäure beobachtet.

2.3.2 Einfluss der Loganinsäure und LAMT-Konzentration auf die Synthese von Loganin

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist eine Optimierung der mehrstufigen enzymatische Synthese von Strictosidin aus Loganinsäure. Im Hinblick auf den Reaktionsfluss einer Kaskade kann die Vermeidung von instabilen Intermediaten oder Zwischenprodukten, die auch als Inhibitoren[141] wirken könnten, ökonomisch von Vorteil sein. Die Vorexperimente deuteten darauf hin, dass die Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 die Kaskadenreaktion limitiert. Desweiteren wurde beobachtet, dass die Aktivität der K_CYP72A1 ein bis drei Stunden nach Beginn der Reaktion stark abnimmt. Vorexperimente zeigten auch, dass die Bildung von Secologanin abhängig von der Loganin-Konzentration ist. Eine Optimierung der Umwandlung von Loganinsäure könnte den Umsatz der Umwandlung von Loganinsäure zu Strictosidin verbessern, indem die K_CYP72A1 innerhalb der zeitlich limitierten Aktivität des Enzyms möglichst schnell eine größtmögliche Menge Loganin zugeführt wird. Dies kann erreicht werden, indem die Umsetzung von Loganinsäure zu Loganin durch LAMT optimiert wird. Deshalb wurde zunächst nur für die Umwandlung von Loganinsäure (Abbildung 2.29, Reaktion

I), eine Optimierung der Enzym- und Substratkonzentration durchgeführt. Es wurden eine Reihe von Enzym- und Substratkonzentrationen getestet und die Produktbildung jeweils mittels LC/MS analysiert (Kapitel6.5.3). Die Untersuchung zeigte, dass – wie erwartet – bei höheren LAMT-Konzentrationen mehr Loganinsäure zu Loganin umgesetzt wurde. Bei 4 µM LAMT wurde ein Großteil der eingesetzten Loganinsäure verbraucht. Ohne LAMT wurde in Puffer keine Umsetzung von Loganinsäure beobachtet.

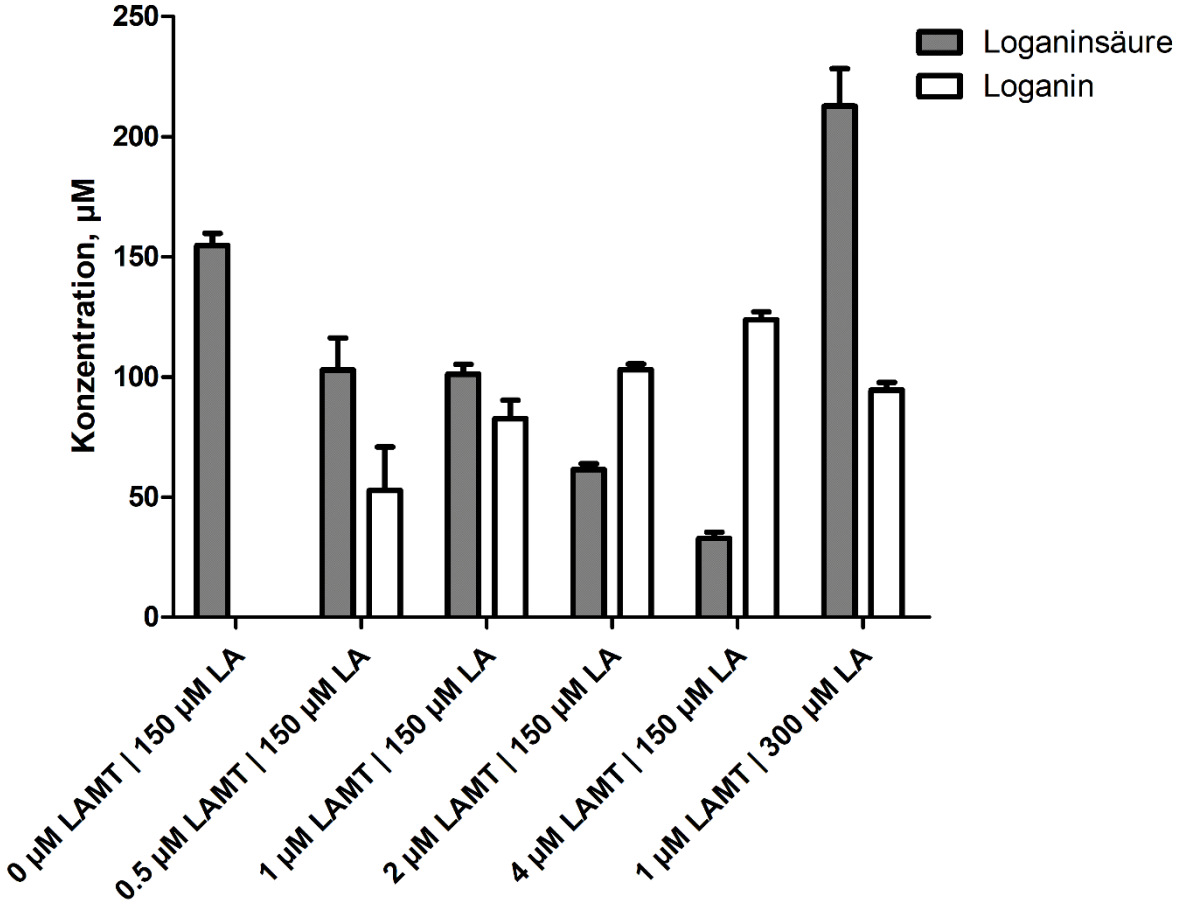

Abbildung 2.31 – Umsetzung von Loganinsäure durch LAMT mit verschiedenen LAMT- und Substrat-Konzentration. Es sind die Produktkonzentrationen nach der Umsetzung von 150 und 300 µM Loganinsäure durch 0.5 bis 4 µM LAMT dargestellt. Die Proben wurden nach Inkubation für 20 h bei 25 °C einer Derivatisierung unterzogen, gefriergetrocknet und per LC/MS analysiert. Die Werte sind Mittelwerte aus drei Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Die angegebenen Konzentrationen sind auf das Reaktionsvolumen von 100 µL bezogen.

Bei einer Verdopplung der Substratkonzentration wurde nur unwesentlich mehr Loganin detektiert. Die absolute Konzentration des Zielprodukts steigt durch eine Verdopplung der Substratkonzentration also nur in geringem Maß. Zusammenfassend besitzt die Enzymkonzentration den größten Effekt auf die Synthese von Loganin und es sollte folglich eine möglichst hohe LAMT-Konzentration bei der Kaskade eingesetzt werden.

2.3.3 Einfluss der Secologanin und STR-Konzentration auf die Synthese von Strictosidin

Mit Blick auf die Optimierung der mehrstufigen Synthese könnte eine Optimierung der Umwandlung von Secologanin (Abbildung 2.29, Reaktion III) durch STR mögliche Nebenreaktionen reduzieren. Auch könnte eine möglichst geringe Secologanin-Konzentration im Reaktionsmedium die Freisetzung von Secologanin aus der Umwandlung von Loganin beschleunigen. Um die bestmögliche Substrat- und Enzymkonzentration zu ermitteln, wurde die Auswirkung der STR- und Secologanin-Konzentration auf die Produktbildung untersucht. Dazu wurde die Umwandlung von Secologanin mit jeweils einer Reihe von Substrat- (125 bis 1000 µM Secologanin bei 250 nM STR, Abbildung 2.32, A) und Enzymkonzentrationen (25 bis 500 nM STR bei 250 µM Secologanin, Abbildung 2.32, B) durchgeführt und die Produktbildung jeweils mittels LC/MS analysiert (Kapitel 6.5.4).

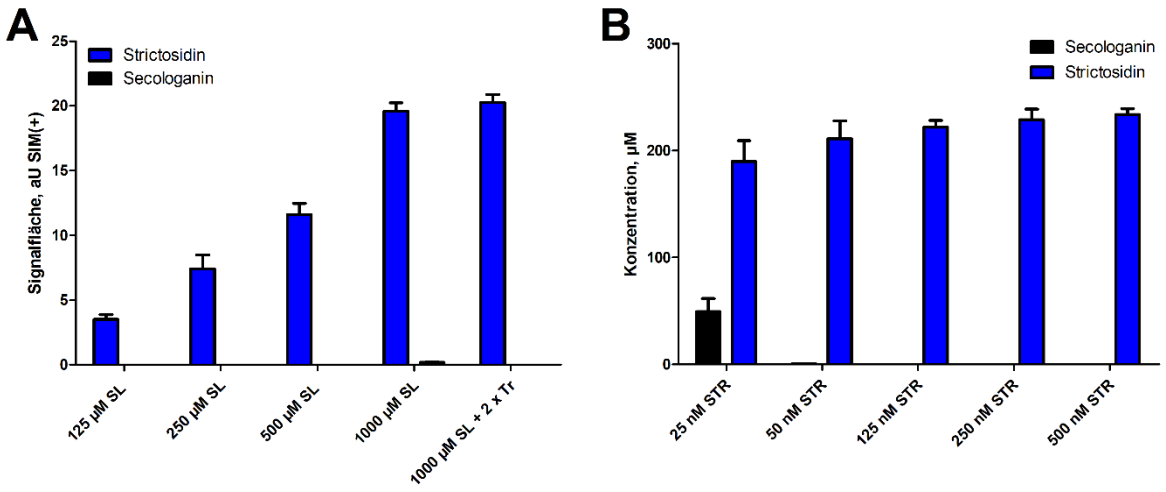

Abbildung 2.32 – Umsetzung von Secologanin mit verschiedenen STR- und Substrat-Konzentrationen.
A) Es sind die nach Umsetzung von 125 bis 1000 µM Secologanin durch STR mittels LC/MS-Analyse bestimmten Quotienten aus den Signalflächen der Analyten und des internen Standards im SIM(+)-Modus dargestellt. B) Es sind die nach der Umsetzung von Secologanin durch 25 bis 500 nM STR quantifizierten Secologanin- und Strictosidin-Konzentrationen dargestellt. Alle Reaktionsansätze wurden nach Inkubation für 2 h bei 25 °C einer Derivatisierung unterzogen, gefriergetrocknet und per LC/MS analysiert. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte aus drei Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Die angegebenen Analytkonzentrationen sind auf das Reaktionsvolumen von 100 µL bezogen.

Aus der Untersuchung der Secologanin-Konzentration (Abbildung 2.32, A) geht hervor, dass Secologanin bei allen Konzentrationen quantitativ umgesetzt wurde, wenn Tryptamin in ausreichender Stoffmenge vorhanden war.

Bei der Untersuchung Kondensationsreaktion von Secologanin und Tryptamin in Abhängigkeit der STR-Konzentration wurde deutlich, dass das eingesetzte Secologanin bereits nach 2 Stunden vollständig umgesetzt war. Lediglich bei einer Enzymkonzentration von 25 nM STR konnte Secologanin detektiert werden. Secologanin wurde durch STR ohne Nebenprodukte in weniger als 2 Stunden quantitativ zu Strictosidin umgewandelt. Deshalb konnten Umsetzungen

von Secologanin direkt zur Erzeugung einer Kalibrierung für die Quantifizierung von Strictosidin verwendet werden.

2.3.4 Einfluss der LAMT-Konzentration auf die Kaskade

Die LAMT-Konzentration bewirkte einen großen Effekt auf die Produktbildung bei der Umwandlung von Loganinsäure zu Loganin. Dieser Effekt der LAMT-Konzentration könnte auch die Umwandlung von Loganinsäure zu Strictosidin beeinflussen; beispielsweise, weil Loganin, das Substrat der K_CYP72A1, bei höheren LAMT-Konzentrationen schneller gebildet wird.

Zur Optimierung der Synthese von Strictosidin aus Loganinsäure sollten deshalb Informationen über den Einfluss der LAMT-Konzentration auf die Kaskade (Abbildung 2.30, Reaktion I bis III) gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurde die Reaktion mit einer Reihe unterschiedlicher LAMT-Konzentrationen (1 bis 10 µM) durchgeführt (Kapitel 6.5.2).

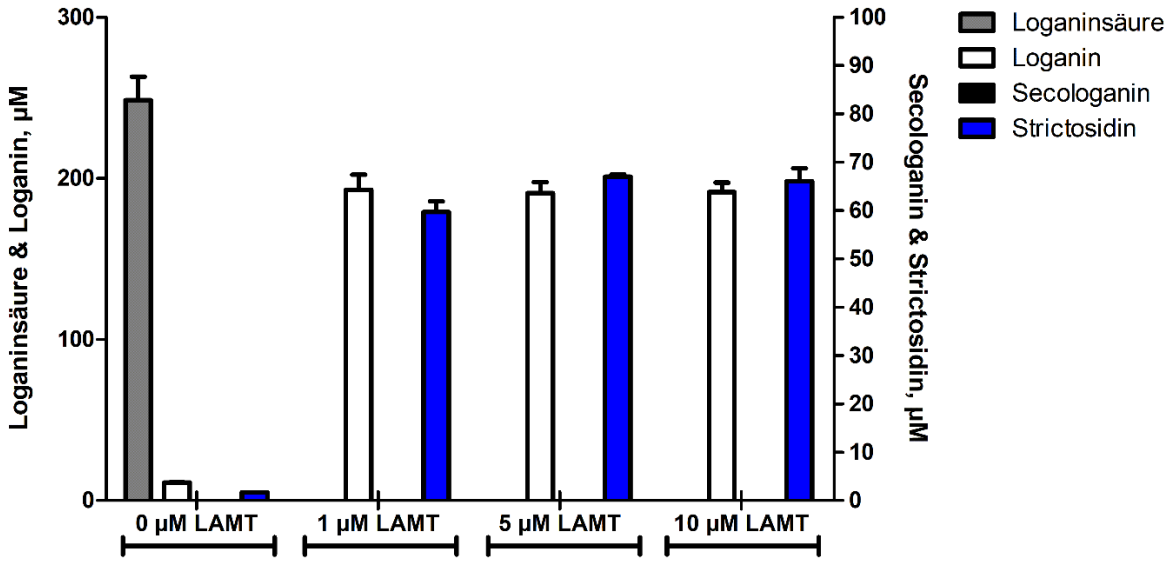

Abbildung 2.33 – Mehrstufige Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin durch LAMT, K_CYP72A1 und STR mit verschiedenen LAMT-Konzentrationen. Es sind die per LC/MS-Analyse quantifizierten Produktkonzentrationen nach der Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin mit verschiedenen LAMT-Konzentrationen von 0 bis 10 µM LAMT dargestellt. Alle Reaktionsansätze wurden nach der Inkubation für 20 h bei 25 °C einer Derivatisierung unterzogen, gefriergetrocknet und per LC/MS analysiert. Die abgebildeten Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Die angegebenen Analytkonzentrationen beziehen sich auf das Reaktionsvolumen von 100 µL.

Loganinsäure wurde hier bei jeder untersuchten Enzymkonzentration vollständig umgesetzt (Abbildung 2.36). Es ist bekannt, dass zur Reaktivität der Methyltransferase Thiolgruppen von Bedeutung sind. Auch Reduktionsmittel wie DTT oder NADPH in Kombination mit FAD, können die LAMT-Aktivität um das bis zu Vierfache steigern.[342] NADPH, welches als Kofaktor in der Reaktionslösung der Kaskadenreaktion enthalten ist, stellt somit eine

wahrscheinliche Ursache für die beobachteten Aktivitätsunterschiede zwischen den Experimenten mit LAMT in Puffer und unter Kaskadenbedingungen dar.

Ein weiterer Effekt der LAMT-Konzentrationen war anhand der Konzentration des Zielproduktes Strictosidin sichtbar. Bei 5 µM LAMT wurde im Vergleich zu 1 µM LAMT etwa 12 % mehr Strictosidin detektiert, obwohl in beiden Reaktionsansätzen Loganinsäure vollständig umgewandelt wurde. Eine weitere Erhöhung der LAMT-Konzentration auf 10 µM ist nicht von messbarem Vorteil. Möglicherweise ist die Geschwindigkeit, mit der Loganin synthetisiert wird, entscheidend für die darauffolgende Umsetzung, die durch K_CYP72A1 katalysiert wird.

Unter diesen Gesichtspunkten ist es unwahrscheinlich, dass die Menge an Loganinsäure, die ohne LAMT umgesetzt wurde (0 µM LAMT, Abbildung 2.33 (D)), durch die beobachteten LAMT-Aktivitätsunterschiede in Puffer und Lysat haltigem Medium verursacht wurde. Wahrscheinlich ist eine Proteinverunreinigung in Form einer Methyltransferase dafür verantwortlich, die in den K_CYP72A1-Präparationen aus *E. coli*-Lysat enthalten war. Dieser Effekt war hier jedoch so gering, dass er im Vergleich zur Aktivität der LAMT vernachlässigt werden kann.

2.3.5 Einfluss der STR-Konzentration auf die Kaskade

Die Vorexperimente deuten darauf hin, dass Secologanin durch STR schneller umgesetzt wird, als es durch K_CYP72A1 gebildet werden kann. Die STR besitzt eine hohe Substratspezifität gegenüber Secologanin.[174] Es ist deshalb plausibel, dass die – im Vergleich zur Bildung von Secologanin – hohe Geschwindigkeit der Umsetzung von Secologanin physiologische Gründe besitzt. Beispielsweise könnten konzentrationsabhängige Nebenreaktionen minimiert werden. Um Informationen über den Einfluss der STR und somit der Umwandlungsgeschwindigkeit von Secologanin auf die Produktbildung zu gewinnen und eine Optimale STR-Konzentration zu ermitteln, wurde die Kaskade (Abbildung 2.30, Reaktion I bis III) mit einer Reihe von STR-Konzentrationen (25–500 nM STR) durchgeführt (Kapitel 6.5.2). Es ist erkennbar, dass Loganinsäure bei allen Versuchen vollständig zu Loganin umgewandelt wurde (Abbildung 2.34). Bereits mit 25 nM STR – einer im Vergleich zur LAMT (5 µM) und K_CYP72A1 (1 µM) niedrigen Konzentration – konnte kein Secologanin mehr detektiert werden. Es ist auffällig, dass ohne STR weniger Secologanin detektiert wurde als Strictosidin, wenn STR vorhanden ist. Bereits bei der geringsten getesteten Konzentration der STR (25 nM) wurde fast die vierfache Menge Secologanin zu Strictosidin umgewandelt.

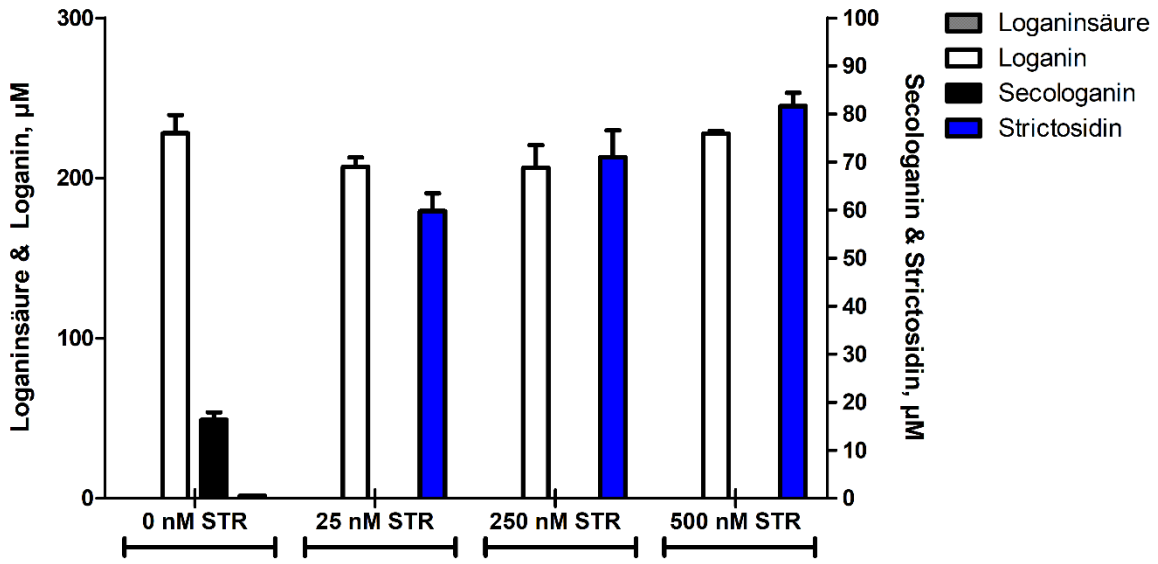

Abbildung 2.34 – Mehrstufige Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin durch LAMT, K_CYP72A1 und STR mit verschiedenen STR-Konzentrationen. Es sind die per LC/MS-Analyse quantifizierten Produktkonzentrationen nach der mehrstufigen Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin mit STR-Konzentrationen von 25 bis 500 nM dargestellt. Alle Reaktionsansätze wurden nach Inkubation für 20 h bei 25 °C einer Derivatisierung unterzogen, gefriergetrocknet und per LC/MS analysiert. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte aus drei Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Die angegebenen Analytkonzentrationen beziehen sich auf das Reaktionsvolumen von 100 µL.

Mögliche Erklärungen sind unter Anderem eine Produktinhibierung der K_CYP72A1 – die auf Basis der Vorexperimente (Kapitel 2.2.5) unwahrscheinlich ist – oder mögliche Instabilität und Nebenreaktionen ausgehend von Secologanin. Im Einklang dazu steht auch die Beobachtung, dass durch eine zehnfache (250 nM STR) oder zwanzigfache STR-Konzentration (500 nM STR) die quantifizierte Strictosidin-Konzentration um 18 % oder 37 % im Vergleich zu 25 nM STR gesteigert werden konnte.

2.3.6 Biokatalytische Synthese von Strictosidin

Um Referenzsubstanz des Zielsubstrats im Milligramm-Maßstab zu erhalten, wurde Strictosidin aufgrund der eingeschränkten kommerziellen Verfügbarkeit[c] aus der Kondensationsreaktion von Secologanin und Tryptamin durch die Strictosidin-Synthase hergestellt (Abbildung 2.29, Reaktion III). Dazu wurde die Kondensationsreaktion von Tryptamin und Secologanin mit Hilfe gereinigter Strictosidin-Synthase durchgeführt (Kapitel 6.5.5). Im Anschluss sollte die Isolation der Zielsubstanz durch eine präparative Dünnschichtchromatographie (DC) erreicht werden. Dazu musste zunächst die Zielsubstanz auf der DC-Platte identifiziert und die Retentionsfaktoren ermittelt werden.

[c] Zum Zeitpunkt dieser Arbeit lag der Preis der Substanz oberhalb von 1000€/mg

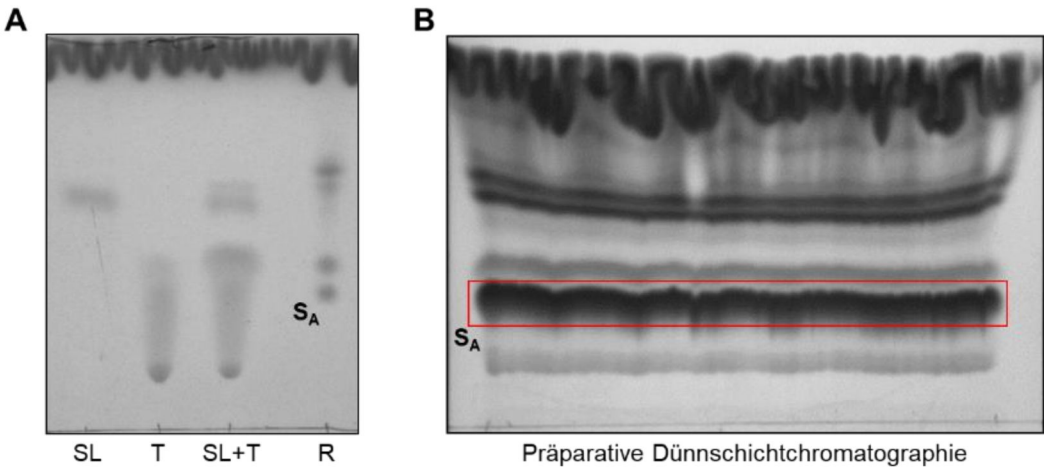

Abbildung 2.35 – Repräsentative Dünnschichtchromatographie der Synthese von Strictosidin.
Es sind repräsentative mit UV-Licht-bestrahlte (256 nm) analytische und präparative DC-Platten, die zur Analyse der Umsetzung von Secologanin zu Strictosidin durch STR entwickelt wurden, dargestellt: A) Analytische Dünnschichtchromatographie: Secologanin (SL), Tryptamin (T), Secologanin und Tryptamin (SL+T) und eine abgeschlossene Reaktion mit Secologanin, Tryptamin und STR (R). B) Präparative Dünnschichtchromatographie zur Isolation der Zielsubstanz. Innerhalb des rot markierten Bereichs, wurde die Trennschicht vom Trägermaterial entfernt und die Zielsubstanz eluiert. Laufmittel: Ethylacetat, Methanol und Wasser im Volumenverhältnis von 77 : 15 : 8. Es wurde zudem ein Tropfen Triethylamin je 20 mL Laufmittel zugegeben.

Zu diesem Zweck wurde eine analytische Dünnschichtchromatographie durchgeführt, bei der eine Testreaktion sowie alle verfügbaren Referenzsubstanzen aufgetragen wurden. Auf der DC-Platte war bei der Testreaktion (Abbildung 2.35, A) ein Substanzfleck S_A sichtbar, der ausreichend von Secologanin und Tryptamin getrennt war (Tabelle 2.6). Zur Identifikation der Substanz wurde die stationäre Phase bei Substanzfleck S_A vom Trägermaterial getrennt, mit Methanol eluiert und mittels LC/MS-analysiert (Abbildung 2.36).

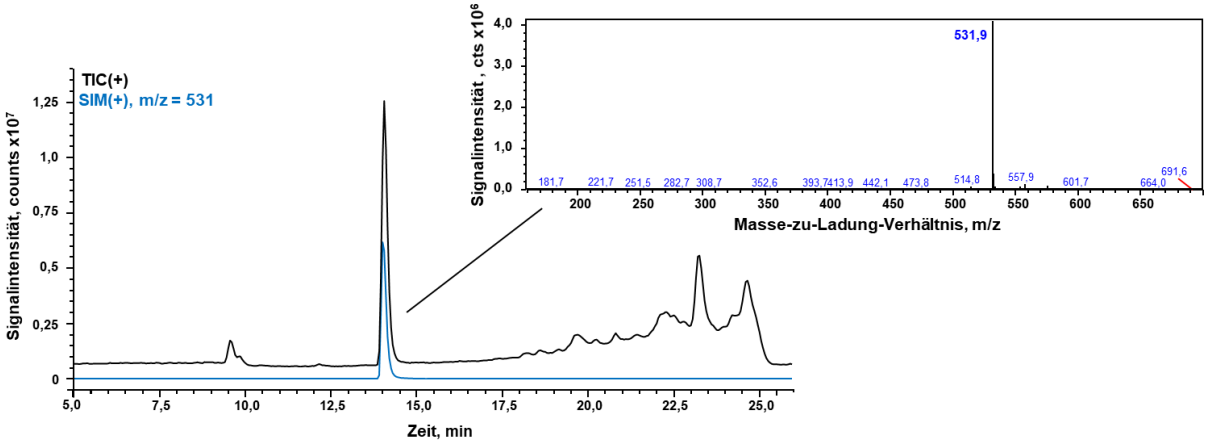

Abbildung 2.36 – Analyse von Substanzfleck A mittels LC/MS. Es sind die überlagerten LC/MS-Chromatogramme im SIM(+) und TIC(+)-Modus und das Massenspektrum des markierten Peaks dargestellt.

Auf dem LC/MS-Chromatogramm von Substanzfleck A mit dem niedrigsten ermittelten R_f-Wert wurde ein Peak identifiziert, dessen Hauptsignal im zugehörigen Massenspektrum ein Masse-zu-Ladungs-Verhältnis besitzt, welches mit dem erwarteten Wert des Addukts

[Strictosidin+H]+ von m/z = 531 übereinstimmte. Die Feinmasse und die ermittelte Summenformel der Substanz stimmen gut mit Strictosidin ($C_{27}H_{35}N_2O_9$ und Exakte Masse 531,2237) überein. Die Ausbeute wurde durch eine Kalibriergerade (Kapitel 6.4.5) ermittelt, indem die Konzentration des gesamten Reaktionsproduktes in einer Lösung bekannten Volumens quantifiziert wurde.

Die Summenformel und Feinmasse der nach Abschaben von der präparativen DC-Platte und Methanol-Elution (Abbildung 2.35, B) gewonnenen Substanz wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt (Abbildung 2.37).

Tabelle 2.6 – Empirische Retentionsfaktoren (R_f).

Substanz	R_f-Wert	Molare Masse, g/mol
Secologanin	0,6	388,37
Tryptamin	0,44	160,22
Strictosidin (S_A)	0,34	530,57

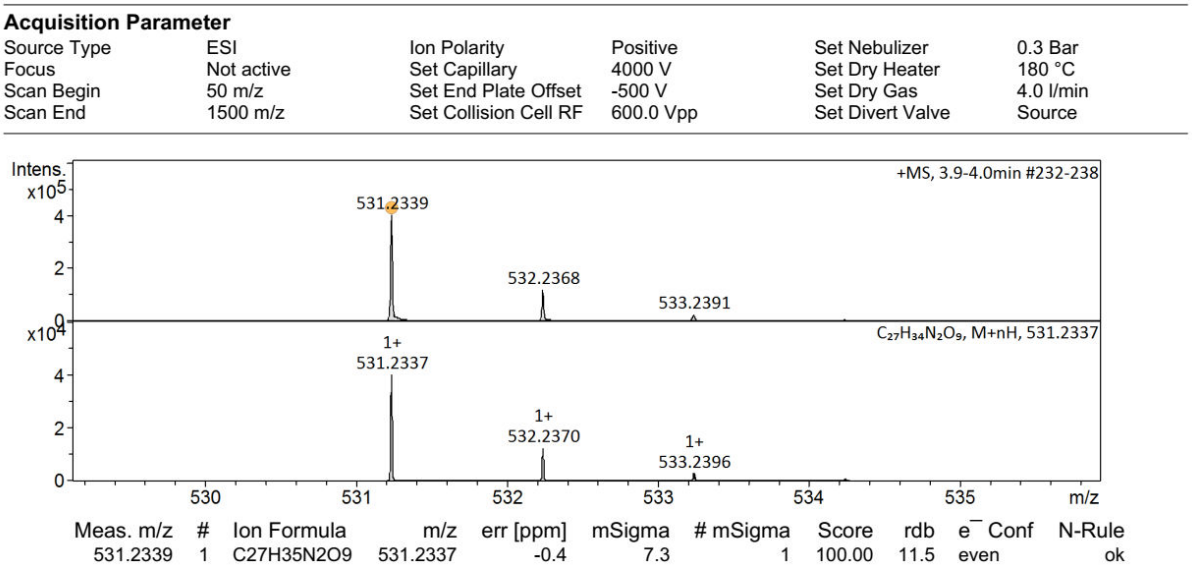

Abbildung 2.37 – Ermittlung der Feinmasse und Summenformel der isolierten Substanz. Die hochauflösende ESI Massenspektrometrie (UHR-QTOF maXis 4G, Bruker Daltonics) wurde von der Abteilung für Massenspektrometrie in der wissenschaftlichen Einrichtung Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHUCeMSA) durchgeführt.

Aus der Konzentration wurde die Stoffmenge an isoliertem Strictosidin und die Ausbeute der Reaktion berechnet. Aus dem größten durchgeführten Ansatz konnten insgesamt etwa 7 mg Strictosidin gewonnen werden. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 51,5 % Strictosidin im Verhältnis zur eingesetzten Menge von 10 mg Secologanin. Die Reinheit des Produkts wurde mittels HPLC anhand der relativen Signalflächen der Analyten bei einer Wellenlänge 273 nm berechnet. Es wurde nach diesem Verfahren eine Reinheit von mehr als 80 % ermittelt.

2.3.7 Optimierung der Reaktionsbedingungen der Kaskade

Ein Ziel dieser Arbeit war die Optimierung der Kaskade zur Synthese von Strictosidin aus Loganinsäure. Aus den Vorergebnissen ist bekannt, dass die Aktivität der K_CYP72A1 die vorliegende Kaskadenreaktion limitiert. Zur Optimierung der Produktion von Strictosidin aus der Reaktionsfolge ist die Maximierung der K_CYP72A1-Aktivität somit ein wichtiger Ansatzpunkt. Die Konzentration der Redoxpartner (Kapitel 2.2.2), die Reaktionstemperatur (Kapitel 2.2.4) und der pH-Wert (Kapitel 2.2.7) wurden in Vorexperimenten als Faktoren identifiziert, welche die Aktivität der K_CYP72A1 beeinflussen.

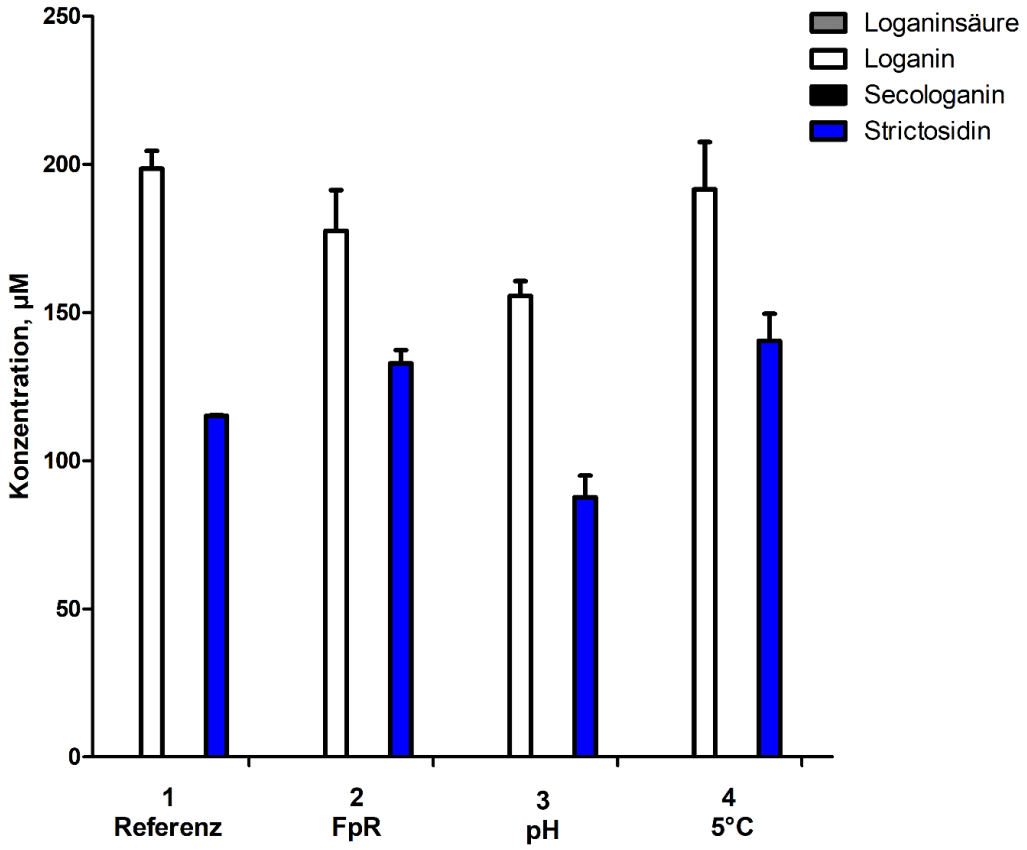

Abbildung 2.38 – Mehrstufige Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin durch LAMT, K_CYP72A1 und STR mit verschiedenen Reaktionsbedingungen. Es sind die per LC/MS-Analyse quantifizierten Produktkonzentrationen nach der mehrstufigen Umsetzung von 300 µM Loganinsäure zu Strictosidin bei verschiedenen Reaktionsbedingungen abgebildet. Referenzbedingungen (1), mit 20 µM anstatt 10 µM FpR (2), mit 50 mM Tris-Puffer, bei pH 7 anstatt pH 7,5 (Puffer jeweils angesetzt bei 4 °C) (3), bei einer Reaktionstemperatur von 5 °C anstatt 25 °C (4). Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte aus drei Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Die angegebenen Analytkonzentrationen beziehen sich auf das Reaktionsvolumen von 100 µL.

Es wurde untersucht, ob diese Faktoren auch die Produktbildung bei der mehrstufigen Umwandlung (Abbildung 2.30, Reaktion I bis III) beeinflussen. Dazu wurden Umwandlungen mit veränderter Reaktionstemperatur, optimiertem RP-Verhältnis und verändertem pH-Wert durchgeführt und jeweils der Einfluss auf die Produktkonzentration untersucht (Kapitel 6.5.2).

Des Weiteren deuten die vorangegangenen Ergebnisse darauf hin, dass die Änderung der Secologanin-Konzentration im Reaktionsansatz mit dem Zeitintervall einer Reaktion (Kapitel 2.2.4 und 2.2.6) korreliert. Es ist somit denkbar, dass die Produktbildung während der Reaktionskaskade, durch den Zeitpunkt der Zugabe der K_CYP72A1 und STR zum Reaktionsansatz, beeinflusst werden kann. Ein plausibler Mechanismus ist beispielsweise, dass die Gesamtwechselzahl der K_CYP72A1 durch eine zeitliche Abstimmung der Zugabe der Enzyme gesteigert werden kann.

Um diesen möglichen Effekt zu untersuchen, wurde eine schrittweise Durchführung der Umwandlung von Loganinsäure zu Strictosidin (Abbildung 2.30, Reaktion I bis III) durchgeführt. Dazu wurde die mehrstufige Synthese zwei Stunden nach Beginn der Inkubation der anderen Substanzen und Enzyme der Kaskadenreaktion durch Zugabe der K_CYP72A1 oder STR vervollständigt.

Ein optimiertes Verhältnis der RP (2) führte – wie erwartet – zu einer um etwa 16 % erhöhten Strictosidin-Konzentration im Vergleich zur Referenz (Abbildung 2.38, 1). Der üblicherweise verwendete Puffer besitzt einen pH-Wert, der nahe am pH-Optimum der K_CYP72A1 liegt (siehe Kapitel 2.2.7). Wurde die Reaktion bei einem effektiven pH-Wert von etwa pH 6,35 durchgeführt (3), konnte eine Reduktion der Strictosidin-Konzentration verzeichnet werden. Die Änderung des pH-Wertes entspricht einer Verschiebung des Reaktionsmilieus weg vom bestimmten pH-Optimum der K_CYP72A1 in Richtung des literaturbekannten pH-Optimums der *R. serpentina* STR (pH ~ 6,5[177,157]). Aus diesem Grund wäre auch eine Steigerung der Produktbildung aufgrund des veränderten pH-Wertes denkbar gewesen.

Die Durchführung der mehrstufigen Synthese bei 5 °C (4) bewirkt eine Steigerung der erzielten Strictosidin-Konzentration um etwa 21 %. Dieser positive Einfluss einer reduzierten Reaktionstemperatur ist unerwartet, da *C. roseus* eine endemische Pflanzenart Madagaskars ist, wo Jahresdurchschnittstemperaturen von 20 bis 25 °C herrschen.[336] Bezogen auf die gesamte Inkubationszeit besitzt also eine mögliche temperaturbedingte Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit einen geringeren Einfluss auf die Produktbildung als eine mögliche temperaturbedingte Steigerung der enzymatischen Stabilität. Zieht man die Ergebnisse aus Kapitel 2.3.4 und 2.3.5 hinzu, wird deutlich, dass die Bildung von Strictosidin in der vorliegenden mehrstufigen Synthese zwar durch STR und LAMT beeinflusst wird, aber vorwiegend von der Aktivität der K_CYP72A1 abhängig ist.

Bezogen auf das Ziel der Optimierung der Zielprodukt-Konzentration wurde bei zeitversetzter Zugabe von STR (Abbildung 2.39, b) im Vergleich zur Referenz (a) etwa 50 % weniger Strictosidin gebildet. Offenbar besitzt der zeitliche Ablauf der Synthese und Umsetzung von

Secologanin Relevanz für die Konzentration des Zielprodukts. Unter Berücksichtigung der Kontrollreaktion ohne STR, sind auch Instabilität oder Nebenreaktionen ausgehend von Secologanin denkbare Erklärungsszenarien. Bei zeitversetzter Zugabe der K_CYP72A1 und STR (c) wurde eine um 20 % gesteigerte Strictosidin-Konzentration im Vergleich zur Referenzreaktion gemessen.

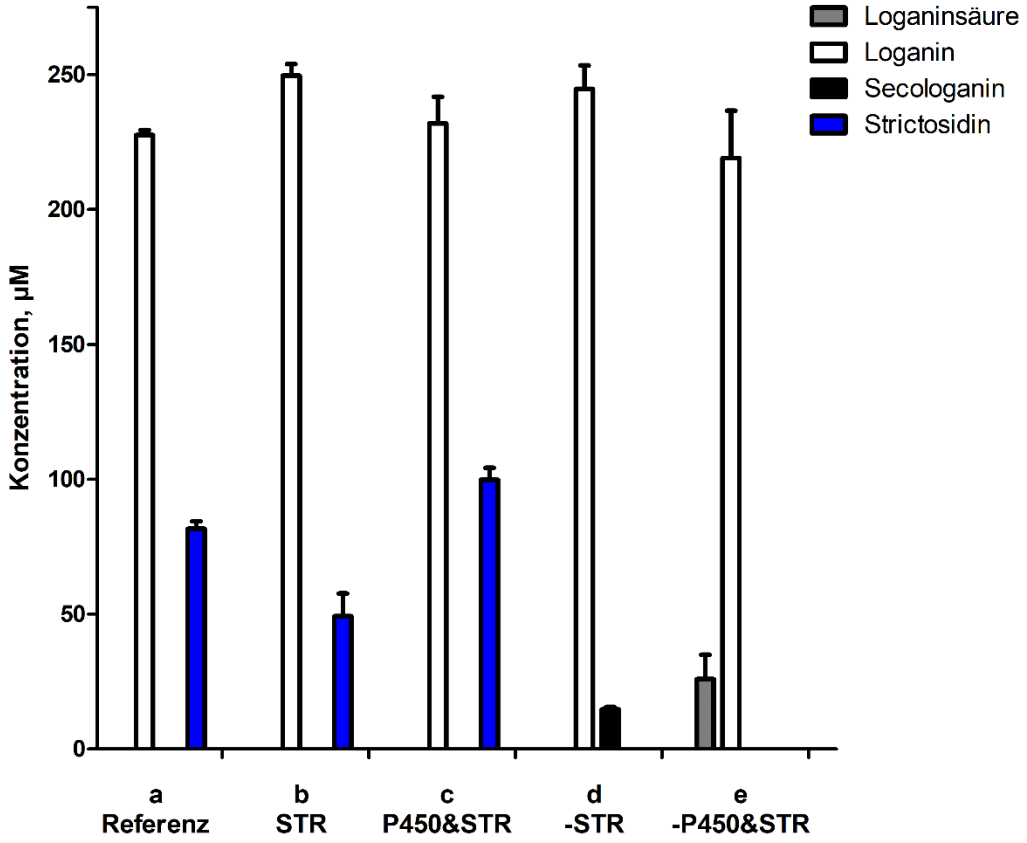

Abbildung 2.39 – Mehrstufige Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin durch LAMT, K_CYP72A1 und STR mit zeitversetzter Zugabe der K_CYP72A1 und STR. Es sind die per LC/MS-Analyse quantifizierten Produktkonzentrationen nach der mehrstufigen Umwandlung von 300 µM Loganinsäure zu Strictosidin bei verschiedenen Reaktionsbedingungen abgebildet. Im Vergleich zu dem von Beginn an vollständigen Reaktionsansatz (a) wurden die STR (b) oder die K_CYP72A1 und STR (c) zwei stunden nach Beginn der Inkubation zugegeben oder ein gleiches Volumen Puffer anstatt Enzym eingesetzt (d, e). Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte aus drei Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das Reaktionsvolumen von 100 µL.

Möglicherweise ist die Gesamtwechselzahl der K_CYP72A1 erhöht, da direkt nach Zugabe des Enzyms mehr Loganin zur Verfügung steht. Dieser zuträgliche Effekt ist nur dann sichtbar, wenn Secologanin sofort umgewandelt werden konnte. Zur Maximierung des Zielprodukts ist folglich sowohl die zeitliche Abstimmung der Umsetzung von Loganin als auch von Secologanin von Wichtigkeit. Nachteile der Durchführung der Kaskade bei zeitversetzter Zugabe der K_CYP72A1 und STR sind der erhöhte experimentelle Aufwand und die Tatsache, dass das anfängliche Reaktionsvolumen halbiert ist. Das K_CYP72A1-haltige *E. coli*

Zell-Lysat zusammen mit den RP nehmen – bereits bei 1 µM K_CYP72A1 – etwa die Hälfte des Reaktionsvolumens ein. Dadurch gibt es bei zeitversetzter Zugabe nicht viel Spielraum die eingesetzte P450-Konzentration noch zu steigern.

2.3.8 Mehrstufige Synthese von Strictosidin unter optimierten Bedingungen

Während der vorangegangenen Untersuchung und Optimierung der Kaskade wurde die Konzentration der K_CYP72A1, die Temperatur, der pH-Wert und ein abgestimmtes Verhältnis der Redoxpartner- auf die K_CYP72A1-Konzentration als die wichtigsten Faktoren identifiziert, welche die limitierende Aktivität der K_CYP72A1 und folglich die Bildung des Zielproduktes Strictosidin beeinflussen. Um zu ermitteln, wieviel Loganinsäure in der vorliegenden *in vitro* Synthese maximal zu Strictosidin umgesetzt werden kann, wurde die Reaktion unter den bestmöglichen, gefundenen Bedingungen durchgeführt (Kapitel 6.5.2). Um mehr Informationen über den unerwarteten Effekt der reduzierten Reaktionstemperatur zu gewinnen und die bestmögliche Inkubationsdauer der Kaskadenreaktion unter optimierten Bedingungen zu identifizieren, wurde die Synthese bei einer Temperatur von 5 °C und 25°C durchgeführt und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

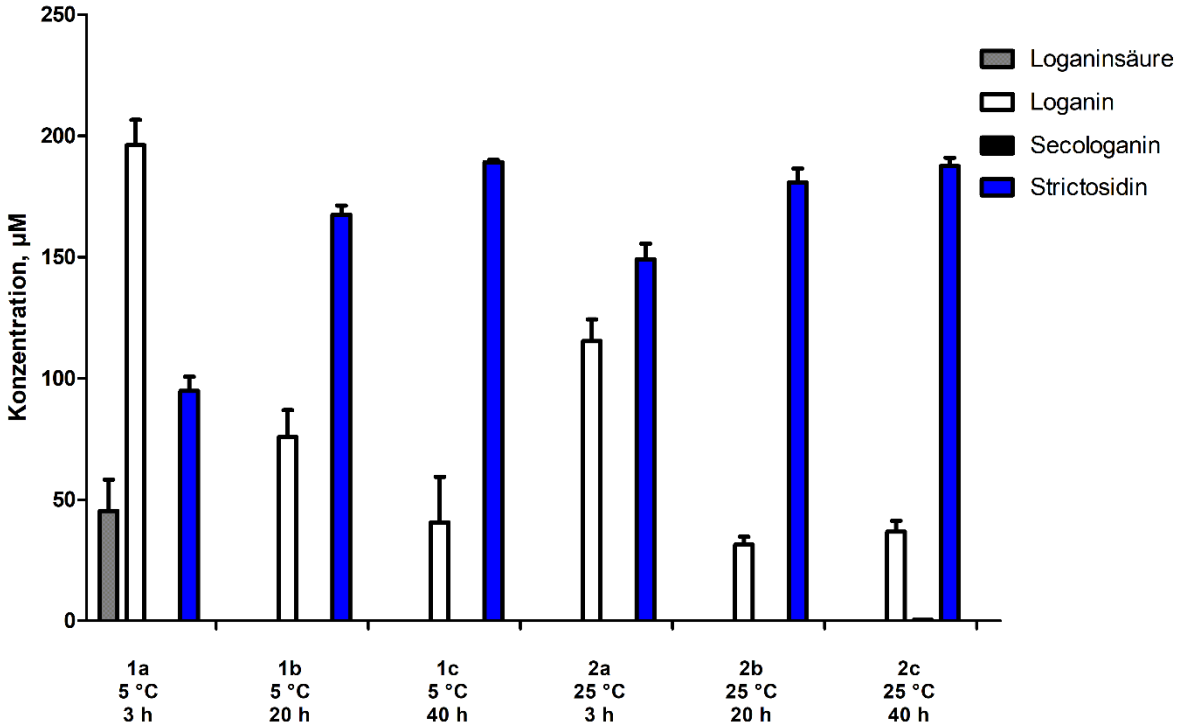

Abbildung 2.40 – Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin durch LAMT, K_CYP72A1 und STR unter optimierten Bedingungen. Es sind die per LC/MS-Analyse quantifizierten Produktkonzentrationen nach der mehrstufigen Umwandlung von Loganinsäure zu Strictosidin mit 2 µM K_CYP72A1 mit 40 µM FpR und 20 µM YkuN abgebildet. Die Umsetzungen wurden bei 5 °C und 25 °C durchgeführt nach 180, 1200 und 2400 min per LC/MS analysiert. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte aus drei Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen. Die angegebenen Analytkonzentrationen beziehen sich auf das Reaktionsvolumen von 100 µL.

Die Reaktionsansätze wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert, um zusätzlich die beste Inkubationsdauer der Kaskadenreaktion zu identifizieren und Informationen über den Effekt der niedrigen Temperatur zu gewinnen. Anhand der Loganinsäure- und Loganin-Konzentrationen ist ersichtlich, dass die Umwandlung beider Substanzen bei 5 °C langsamer ablief als bei 25 °C und nach 20 Stunden weiterhin K_CYP72A1-Aktivität gegenüber Loganin vorhanden war (Abbildung 2.40). Der zuvor beobachtete Effekt der Temperatur (Abbildung 2.38) auf die Kaskade wurde hier nach 20 Stunden nicht beobachtet. Im Gegensatz zu diesem Vorexperiment wurden die Reaktionen hier bei niedriger Temperatur und einem abgestimmten RP-Verhältnis durchgeführt. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass der zuvor beobachtete Temperatureinfluss auf die Temperaturabhängigkeit der FpR-Stabilität zurückzuführen ist.

FpR neigt zur Denaturierung, wenn das flavinhaltige Enzym in reduzierter Form vorliegt. Die Geschwindigkeit der Denaturierung ist bei einem pH-Wert von pH 6,5 bis 7,5 und bei Temperaturen unterhalb von 30 °C niedriger.[335] Bei zwanzigfacher FpR-Konzentration im Vergleich zur Konzentration der K_CYP72A1 war der FpR-Überschuss möglicherweise groß genug, damit eine Denaturierung von FpR bei 25 °C keine detektierbare Auswirkung mehr auf die Deckung des Elektronenbedarfs der K_CYP72A1 hatte. Bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C ist die optimale gefundene Inkubationsdauer 20 Stunden. Bei 5 °C ist die beste Inkubationsdauer 40 Stunden.

Unter den optimierten Reaktionsbedingungen wurden sowohl bei 25 °C (187,4 ± 3,5 µM Strictosidin) als auch bei 5 °C (189,3 ± 0,9 µM Strictosidin) maximale Konzentrationen von Strictosidin gemessen, die einer enzymatischen Stoffumwandlung von etwa 75 % der vorgelegten Menge Loganinsäure zu Strictosidin entsprechen.

3 Diskussion

TIA, die aus dem pflanzlichen Sekundärmetabolismus und einer gemeinsamen Vorstufe Strictosidin entstammen, besitzen eine Vielzahl relevanter pharmakologischer Wirkungseigenschaften. Aufgrund der oft komplexen chemischen Struktur ist eine Synthese meist unwirtschaftlich und die Substanzen werden durch Extraktion aus Pflanzenmaterial gewonnen. Eine ernstzunehmende Alternative ist die Synthese auf biochemischem Wege, bei der Cytochrom-P450-Monooxygenasen eine Sonderstellung einnehmen. Die hier untersuchte CYP72A1 katalysiert eine ungewöhnliche Ringöffnung an Loganin und ist zugleich ein möglicher *Engpass* der Synthese von Strictosidin. Aufgrund der Aufwendigkeit der Herstellung und Handhabung pflanzlicher P450 ist nur wenig über die biokatalytischen Eigenschaften der CYP72A1 bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die lösliche Herstellung der CYP72A1 in *E. coli* durch *Protein-Engineering*, die Identifikation kompatibler RP und die Rekonstitution der Aktivität gegenüber Loganin *in vitro*. Auf dieser Basis sollte CYP72A1 einer biochemischen Untersuchung unterzogen werden. Im nächsten Schritt sollte eine biokatalytische *in vitro* Kaskade zur Umwandlung von Loganinsäure zu Strictosidin etabliert und evaluiert werden.

3.1 Herstellung der P450 des späten Seco-Iridoid-Pfads in *E. coli*

Für die mehrstufige Umwandlung von Loganinsäure zu Strictosidin wird CYP72A1 aus *C. roseus* aufgrund der einzigartigen katalytischen Aktivität der P450 zwingend benötigt. Die heterologe Herstellung pflanzlicher P450 ist aufgrund der Membranständigkeit der Enzyme mit einer Zahl von Herausforderungen verbunden.[232]

Dabei wurde *E. coli* als Expressionssystem ausgewählt. Diese Wahl ist durch die unkomplizierte Handhabung bei der Kultivierung im Labormaßstab, dem schnellen Wachstum unter einfachen Bedingungen, einer leichten Modifizierbarkeit und dem hohen Grad der Erforschung gerechtfertigt. Das entscheidende Attribut ist jedoch das Fehlen eigener P450[304–306] im Organismus. Für die Charakterisierung der CYP72A1 wurde dadurch das Arbeiten mit Lysat ermöglicht, da die Konzentration der CYP72A1 in *E. coli*-Lysat mittels CO-Differenzspektrum zuverlässig und auch in geringen Konzentrationen bestimmt werden konnte.

Aus den vorgestellten Strategien (Kapitel 1.5.1) zur heterologen Herstellung pflanzlicher Transmembranproteine wurden unterschiedliche Ansätze zur Produktion von CYP72A1 in rekombinanten *E. coli* verfolgt. Darunter die Fusion mit einer *C. roseus* CPR[143,242,343] (Kapitel 2.1.2) oder mit Löslichkeitshelfern (Kapitel 2.1.8) und Modifikationen der N-terminalen

Aminosäuresequenz (Kapitel 2.1.3). Nur durch Anpassung am N-Terminus konnte aktive K_CYP72A1 in *E. coli* hergestellt werden.

Aus Untersuchungen der *E. coli*-Lysate, die nach Expressionen der CYP72A1-CPR-Fusionskonstrukte und SIMPLEx-Varianten erhalten wurden, war ersichtlich, dass jeweils Protein hergestellt wurde, welches mit der erwarteten Masse des jeweiligen Zielproteins korrelierte (Abbildung 2.2, A, Abbildung 2.14). Bei der Analyse der jeweiligen *E. coli*-Lysate mit Hilfe von CO-Differenzspektren konnte jedoch kein charakteristisches 450 nm Signal beobachtet werden (Abbildung 2.2, B, Abbildung 2.13). Mechanismen, die zum Verlust der notwendigen Interaktion des axialen Thiolat-Liganden mit dem Eisen-Zentralatom führen können, sind Austausch durch einen Liganden mit geringerer Elektronendonor-Fähigkeit, Protonierung des Thiolatrests oder Dehnung der Fe-S-Bindung.[319,320] So führte der Austausch des axialen Liganden in $P420_{CAM}$ zum Verschwinden der charakteristische Bande um 450 nm und zum Verlust der Fähigkeit der Verdrängung des Wasser-Liganden durch Substrat und somit zur Inaktivierung. Eine potenzielle katalytische Aktivität kann folglich über die CO-Differenzspektren evaluiert werden, wie in späteren Versuchen für die CYP72A1 demonstriert wurde (Abbildung 2.21). Zur Herstellung der P450-Red-Fusion, wurde in der Literatur[143] der *E. coli*-Stamm RM82 verwendet, der in dieser Arbeit nicht zur Verfügung stand. Als Alternative wurde der *E. coli*-Stamm C43(DE3) in Kombination mit einem abweichenden Expressionsvektor pCDFDuet-1 verwendet. Diese Unterschiede sind eine plausible Erklärung für die abweichenden Ergebnisse. Die Wahl des Vektors und des Expressionstammes kann die Expression von P450 beeinflussen.[232] Bei einer literaturbeschriebenen P450-Red-Fusion mit CYP73A5 aus *A. thaliana* (Zimtsäure-4-Hydroxylase) wurden verschiedene Stämme wie *E. coli* JM109, DH5α und M15 getestet, jedoch führte nur DS410 jeweils zur Expression.[343,242] In einem anderen Ansatz wurde das dreigliedrige Fusionskonstrukt aus MBP, CYP72A1 und ApoA1*[238] mit dem Ziel erzeugt, eine Proteinreinigung nach der heterologen Herstellung in *E. coli* durchzuführen. Der Protein-Untereinheit MBP werden solubilisierende Eigenschaften zugeordnet, welche die Faltung eines Zielproteins unterstützen können.[233] ApoA1* soll mit der hydrophoben Membrandomäne in Wechselwirkung treten und das Protein während der Faltung außerhalb einer Membran stabilisieren. Ähnlich zur Fusion der CYP72A1 mit der *C. roseus* CPR konnte das Fusionsprotein aus MBP, CYP72A1 und ApoA1* teilweise in löslicher Form hergestellt werden; es war jedoch kein charakteristisches Maximum der Absorptionsdifferenz im CO-Differenzspektrum sichtbar. Zusammenfassend konnte CYP72A1 als Fusionsprotein nicht in aktiver Form in *E. coli* hergestellt werden.

Es wurde dann eine andere Herangehensweise verfolgt und untersucht, ob die CYP72A1 durch Modifikation der N-terminalen Sequenz in *E. coli* hergestellt weden kann. Zur Anpassung der nativen N-terminalen Sequenz der CYP72A1 an die geänderten Bedingungen in *E. coli* wurde zunächst eine Analyse der Aminosäuresequenz durchgeführt und mit den Sequenzen der CYP72A224 und CYP76A26 aus dem Seco-Iridoid-Pfad verglichen. Das auffälligste Merkmal der CYP72A1 und CYP72A224 ist das Fehlen der an die Membrandomäne grenzenden prolinreichen Region ([P/I]PX[P/G]XP), die mit großer Häufigkeit bei mikrosomalen P450 auftritt und unter anderem mit der Proteinfaltung in Verbindung gebracht wird.[344,345] Die berechneten pI-Werte der CYP72A1 und CYP72A224 weisen insbesondere im Vergleich zu *C. roseus*-P450 aus dem späteren Verlauf der TIA-Biosynthese einen eher basischen Charakter auf. Dieser beruht auch auf der erhöhten Frequenz positiv geladener Aminosäuren (Arginin und Lysin) am Carboxy-Ende der TM-Domäne, die häufig bei microsomalen P450 zu finden ist.[308,309] In diesem Zusammenhang ist die Ladung, Ladungsverteilung und Hydrophobizität bei der Faltung und Stabilität von Proteinen eine wichtige physikalische Größe und kann bereits früh während der Proteinbiosynthese Wechselwirkungen mit dem Ribosom mitigieren.[346,325,347] Mit den Informationen aus der Analyse des N-Terminus wurden 18 unterschiedliche CYP72A1-Varianten (Tabelle 2.1) erzeugt, in *E. coli* hergestellt und die erhaltenen *E. coli*-Zelllysate untersucht (Abbildung 2.4). Auf Grundlage der aufgenommenen CO-Differenzspektren konnten aus allen untersuchten Varianten nur die Variante B_CYP72A1 und K_CYP72A1 in aktiver Form hergestellt werden. Auf sämtlichen CO-Differenzspektren war jedoch eine *Soret*-Bande bei 420 nm sichtbar, die auf denaturierte P450 hinweist. Bereits geringe Unterschiede am N-Terminus im Vergleich zu Variante K_CYP72A1 – wie bei Variante D_CYP72A1 und E_CYP72A1 – führten zum Verlust der korrekten Koordination der Häm-b-Gruppe.

Aufgrund der Ähnlichkeit der N-terminalen Sequenz der CYP72A224 und der Sequenz der CYP72A1 (siehe Abbildung 2.1) wurde die CYP72A224 zur Herstellung in *E. coli* Modifikationen unterzogen, die an die K_CYP72A1 angelehnt sind. Bei der CYP72A224_V1 wurde ein Sequenzabschnitt mit sechs teilweise polaren Aminosäuren (ELNFKS) gegen sechs Aminosäuren (ALLLAV) der *B. taurus* CYP17A1-Sequenz ausgetauscht. Analog zur K_CYP72A1, blieb die vohergesagte TM-Domäne und alle angrenzenden unpolaren Aminosäuren unverändert. In bemerkenswerter Ähnlichkeit zur K_CYP72A1 war nur bei dieser Variante ein Signal bei 450 nm auf dem aufgezeichneten CO-Differenzspektrum sichtbar (Abbildung 2.6, A). CYP72A224_V2 unterscheidet sich von CYP72A224_V1 nur durch die Substitution zweier zusätzlicher unpolarer Aminosäuren am Beginn der TM-Domäne

(ELNFKSII gegen ALLLAVFL). Die Auswertung der CO-Differenzspektren deutet jedoch unter den üblichen Kriterien auf Protein hin, welches in denaturierter Form vorliegt. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen aus der Untersuchung der CYP72A1-Varianten, bei der geringe Sequenzunterschiede am N-Terminus eine große Wirkung auf den Erfolg der Expression hatten. Es ist schwierig, eine Aussage über mögliche Ursachen zu treffen. Betrachtet man nur die Faktoren, die zur Fehlfaltung eines Proteins führen können, dann sind diese bereits von außerordentlich komplexer Natur und können während unterschiedlicher Stadien der Proteinbiosynthese relevant sein.[348] Lässt man Wirtseinfluss außer Acht, können unterschiedliche Wechselwirkungen während der Proteinfaltung – beispielsweise mit dem Ribosom, mit Faltungshelfern oder dem Cytosol – die zu Unterschieden bei der Stabilisierung der entstehenden hydrophoben Membrandomäne führen, ursächlich für die Unterschiede zwischen den Varianten der CYP72A224 oder CYP72A1 sein, die hier bei der Herstellung in *E. coli* beobachtet wurden.[348,349]

CYP76A26, welche im Unterschied zu CYP72A1 und CYP72A224 die literaturbekannte[215,217,216] konservierte prolinreiche Sequenz besitzt, wurde durch Einführung einer positiv geladenen Aminosäuresequenz und Trunkierung in *E. coli* hergestellt. Die eingeführten Veränderungen der Varianten CYP76A26_V2 und V3 sind der Sequenz einer modifizierten CYP2C3 nachempfunden (MAKKTSSKGK, Tabelle 2.3).[246] Der Vergleich der Varianten V2 und V3 (Tabelle 2.3 und Abbildung 2.7, A) der CYP76A26 lässt die Vermutung zu, dass geringe Sequenzunterschiede am N-Terminus toleriert werden. Für die Membrandomänen der CYP72A1 und CYP72A224 wurde zuvor eine Anzahl von 22 und 24 Aminosäuren berechnet (Abbildung 2.1). Dies ist eine für pflanzliche TM-Proteine durchschnittliche Anzahl Aminosäuren.[350] Die berechnete hydrophobe Sequenz der CYP76A26 hingegen, liegt mit 17 Aminosäuren etwas unter dem Durchschnitt. Möglicherweise kann die etwas kürzere hydrophobe Region der CYP76A26 besser stabilisiert werden. Auch eine Involvierung der prolinreichen Region ist hier wahrscheinlich.[345]

Um die K_CYP72A1 in höherer Konzentration und Reinheit zu erhalten wurde eine hexahistidin-markierte Variante, die K_CYP72A1_C6His in *E. coli* hergestellt (Kapitel 2.1.6). Auf dem SDS-Polyacrylamidgel der SDS-PAGE-Analye der Proteinreinigung war in der Eluatfraktion ein Bandenmuster zu sehen, welches auf eine fehlende Wechselwirkung des Zielproteins mit dem chelatgebundenen Nickel deutete. Als mögliche Ursachen wurden Faktoren wie fehlende Translation, geringe Affinität oder Maskierung des Hexahistidin-Tags im Inneren des Proteins untersucht. Um die Bindung des Zielproteins an Ni-NTA zu verbessern, wurde die Zugabe fünf verschiedener Detergenzien bei der Zellhomogenisierung evaluiert, um

die Löslichkeit der K_CYP72A1_C6His zu steigern (Kapitel 2.1.7). Mittels SDS-PAGE und Western Blot mit Immunodetektion (Abbildung 2.10, Abbildung 2.11) konnte festgestellt werden, dass der solvatisierende Effekt bei CHAPS – einem zwitterionischen Detergens mit der höchsten CMC aus den getesteten Detergenzien – am stärksten ausgeprägt war. Auch zeigten sich Intensitätsunterschiede bei der mit dem Zielprotein korrelierenden Bande (Abbildung 2.11, B). Die höchste Intensität war bei der CHAPS-Probe sichtbar. Die Bindung des Zielproteins durch Anti-His_6-Körpern nach dem Western Blot in Kombination mit der Massenreferenz belegt eine vollständige Translation des Zielproteins inklusive C-terminalem His-Tag. Jedoch konnte weder als Resultat einer Inkubation im Batch-Verfahren (Abbildung 2.11, A), noch mittels Tischsäule (Abbildung 2.12) eine Reinigung oder Aufkonzentrierung bei vorheriger Zugabe von CHAPS erreicht werden. Zusammenfassend war bei IMAC-Reinigungen der K_CYP72A1_C6His keine spezifische Bindung an metallionenbasierten Säulenmaterialien zu beobachten. Bei Affinitätsmarkern, die auf MBP basieren (Kapitel 2.1.8 und weitere) konnte keine katalytisch aktive CYP72A1 hergestellt werden.

Als alternative Möglichkeit zur Aufkonzentrierung von K_CYP72A1-Zellhomogenat ohne Affinitätsmarker wurde eine fraktionierte Fällung durch Zugabe von Ammoniumsulfat untersucht. Bei 40 % der Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration wurde die K_CYP72A1 zusammen mit etwa 30 % der Gesamtproteine (Abbildung 2.15) vollständig als Niederschlag abgeschieden. Die SDS-PAGE-Analyse zusammen mit der starken farblichen Veränderung des wieder in Lösung gebrachten Niederschlags unterstützt diese Schlussfolgerung. Durch Ammoniumsulfat kann folglich eine Trennung der K_CYP72A1 von in Lösung verbleibenden Protein-Verunreinigungen, die mehr als 70 % der Gesamtproteine darstellen, erzielt werden.

Die Bande bei etwa 28 kDa (Abbildung 2.15, Probe 4 und Probe 20%) auf dem SDS-Polyacrylamidgel ist erwähnenswert, da ein Protein oder Fragment ähnlicher Masse bei Untersuchung der Detergenzien (Abbildung 2.12, A Probe 1 und 2) per Immunodetektion sichtbar wurde. Es ist deshalb anzunehmen, dass diese Bande hier der K_CYP72A1 zugeordnet werden kann. Auf Basis des Western-Blots könnte es sich folglich um ein C-terminales Fragment der K_CYP72A1 handeln (C-terminaler Hexahistidin-Tag). Weiterhin legt der Vergleich hohe Anteil des Proteins in der Probe der unlöslichen Fraktion (4) zusammen mit einer Präzipitation bei 20 % Ammoniumsulfat eine reduzierte Löslichkeit des Fragments nahe. Die Ammoniumsulfat-Fällung konnte auch in größerem Maßstab zur Erzeugung konzentrierter K_CYP72A1-Lösungen aus geklärtem Zellhomogenat angewendet werden (Abbildung 2.16). Das beste Ergebnis aus einer Präparation mit Ammoniumsulfat war eine Verfünffachung der

K_CYP72A1-Ausgangskonzentration auf eine Endkonzentration von etwa 12,5 µM K_CYP72A1 (Abbildung 2.16, A Re_AS). Durch Umsetzungen konnte bereits ohne eine Entsalzung enzymatische Aktivität bestätigt werden (Kapitel 8.2.6). Es sind jedoch gegebenenfalls weitere Entsalzungsschritte – z. B. eine Dialyse – erforderlich, wenn die K_CYP72A1 in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt werden soll. Die Fällung mit Ammoniumsulfat stellt deshalb eine Möglichkeit dar, um die Konzentration von K_CYP72A1 gegenüber der Konzentration in Zell-Lysat zu erhöhen und etwa zwei Drittel der Protein-Verunreinigungen zu entfernen.

3.2 Biochemische Charakterisierung der K_CYP72A1

Um die katalytische Aktivität der K_CYP72A1 wiederherzustellen, müssen dem aktiven Zentrum zur Aktivierung und Spaltung molekularen Sauerstoffes jeweils zwei Elektronen zugeführt werden. Bei der Deckung dieses intrinsischen Elektronenbedarfs geht es nicht nur um die Übertragung von Elektronen, sondern die Wahl der Redoxpartner kann aufgrund der notwendigen Interaktion mit der P450 einen signifikanten Einfluss auf die katalytischen Eigenschaften[351,352] ausüben und in seltenen Fällen die Art[353] der katalysierten Reaktion beeinflussen.

Da die native CPR aus dem Sekundärstoffwechsel von *C. roseus*[297,298] nicht in *E. coli* hergestellt werden konnte, wurde eine Auswahl flavinhaltiger Surrogat-RP in Kombination mit der K_CYP72A1 getestet. Es konnte mit der K_CYP72A1 in Kombination mit allen getesteten, nicht-physiologischen RP Aktivität gegenüber Loganin (Abbildung 2.18) demonstriert werden. Bezugnehmend auf die Produktausbeute, wurde die höchste Secologanin-Bildung durch die bakteriellen, flavinhaltigen Redoxpartner FpR und YkuN erzielt. Es ist auffällig, dass die K_CYP72A1 mit der ATR2, einer CPR die eine Sequenzidentität von mehr als 70 % zur *C. roseus* CPR besitzt, insgesamt die niedrigste Produktausbeute erwirkte. Es gibt eine Zahl von Beispielen für P450, deren physiologische Redoxpartner zu höherer Ausbeute führen als nicht-physiologische.[354] Instabilität, niedrige Expressionsniveaus oder Unbekanntheit der nativen RP sind eine Auswahl möglicher Gründe.[327,328] Während der Marnerol-Synthese wurde durch eine modifizierte CYP71A16 aus *A. thaliana* mehr Produktbildung mit nicht-physiologischen RP beobachtet.[329] Die 11β-Hydroxylase-Aktivität der humanen CYP11B1 konnte durch Koexpression von Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase in *Schizosaccharomyces pombe* gegenüber dem physiologischen RP-System um mehr als das Dreifache gesteigert werden.[355] Während der Rekonstitution der K_CYP72A1-Aktivität wurde – mit gewisser Ähnlichkeit zum Beispiel der modifizierten CYP71A16 aus *A. thaliana* – in Kombination mit YkuN und FpR im Vergleich zur ATR2 eine höhere Umsetzung beobachtet.

Obgleich eine begrenzte Anzahl RP untersucht wurde, ist auffällig, dass mit der K_CYP72A1 diejenigen RP, die auf Fusionen basieren, generell niedrigere Ausbeuten erzielten als das System mit Einzelproteinen. Die Rolle der ER-Membran während P450-CPR-Wechselswirkungen ist ein hochkomplexes Thema und besitzt darüberhinaus – beispielsweise durch den Einfluss auf die Orientierung der membrangebundenen Proteine zueinander – Relevanz für die katalytische Aktivität und Substratinteraktion.[356–358] Es erscheint deshalb plausibel, dass die Größe, Form und Flexibilität des Surrogat-Elektronendonors in Abwesenheit der vermittelnden Einwirkung der Membran, entscheidend ist. Eine Zahl von insgesamt sechs RP-Wechselwirkungssequenzen (*redox partner interaction sites*) an der proximalen Oberfläche von P450 sind bekannt. Es wurde postuliert, dass je nach Klasse der P450 (Kapitel 1.5.4) eine unterschiedliche Anzahl an RPIS an der P450-RP-Wechselwirkung beteiligt ist.[359] Unter diesem Aspekt könnte die mögliche erhöhte Flexibilität mit YkuN und FpR eine Erklärung dafür sein, warum die Einzelproteine das Fusionsprotein YR-P5 während der Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 übertreffen, obwohl YR-P5 eine verbesserte Stabilität[330] besitzt. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die FAD- und FMN-Einzeldomänen der ATR2 ebenfalls bessere Ausbeuten erzielen als die ATR2.

Zusammengefasst konnte die Aktivität der hergestellten K_CYP72A1 gegenüber Loganin erfolgreich *in vitro* wiederhergestellt werden. Mit YkuN und FpR in Kombination mit der K_CYP72A1 wurde das Secologanin-Signal detektiert. Es wurde demonstriert, dass sowohl die Art der Redoxpartner als auch das Konzentrationsverhältnis der eingesetzten RP einen Einfluss auf die Secologanin-Bildung ausüben.

Bei einer umfassenderen Untersuchung des P450 zu RP-Verhältnisses wurde bis zu einem etwa zwanzigfachen molaren Überschuss von RP eine ungefähr proportionale Abhängigkeit der Secologanin-Konzentration und der eingesetzten RP-Konzentration beobachtet (Abbildung 2.19). Folglich wurde bis zu einem hohen molaren RP-Überschuss keine Sättigung des zur Umsetzung von Loganin benötigten Elektronenbedarfs erreicht. Eine niedrige Kopplungseffizienz oder geringe Geschwindigkeit der Elektronenübertragung sind naheliegende Ursachen. Bei Untersuchungen durch Jenkins und Waterman von *E. coli* FpR und Fld mit der CYP17A1 aus *B. taurus* wurde festgestellt, dass die Reduktion von Fld langsamer abläuft als die Elektronenübertragung auf die P450 (Geschwindigkeit von 2,4 min^{-1}) und dieser Limitierung wurde dort durch einen fünfzigfachen RP-Überschuss entgegengewirkt.[360]

Im hier untersuchten System wurden bereits bei einem vierzigfachen molaren Überschuss von YkuN und FpR Sättigungseffekte im Bezug auf die gemessene Secologanin-Konzentration

beobachtet. Es ist denkbar, dass *Crowding*-Effekte[361] oder Faktoren wie Enzymstabilität bei hohem RP-Überschuss dominieren.

Bei einem nicht-äquimolaren Verhältnis von YkuN und FpR wurde ein größerer Einfluss auf die gemessene Produktkonzentration durch die FpR-Konzentration als durch die YkuN-Konzentration beobachtet. Ein Erklärungsszenario ist, dass YkuN nicht schnell genug reduziert wird und dadurch auch die folgende Übertragung von Elektronen auf die K_CYP72A1 limitiert ist. Ein Gegenargument ist, dass bei Umsetzungen von Tetradecansäure durch CYP109B1 aus *B. subtilis* unterstützt durch YkuN aus *E. coli* und FpR aus *B. subtilis* ein erheblicher Konzentrationseffekt von YkuN auf die Umsetzung verzeichnet wurde und der Effekt der FpR-Konzentration im Vergleich vernachlässigbar war.[327] Als mögliche Ursache wurde dort eine Ineffizienz des Elektronentransfers von YkuN auf die CYP109B1 vorgeschlagen. Es gibt weitere literaturbekannte Studien mit unterschiedlichen P450, bei denen YkuN jeweils im Überschuss eingesetzt wurde.[328] Ursachen für die Unterschiede im Vergleich zu dieser Arbeit liegen wahrscheinlich bei der pflanzlichen Herkunft der CYP72A1.

In einem anderen Erklärungszenario liegt nicht genug YkuN in reduzierter Form vor, weil aufgrund einer niedrigen Kopplungseffizienz Elektronen mit einer hohen Geschwindigkeit unproduktiv verbraucht werden. Möglicherweise ist nicht die Geschwindigkeit der Elektronenübertragung durch YkuN auf die K_CYP72A1 oder andere im Lysat befindliche Elektronenakzeptoren limitierend, sondern die Kopplungseffizienz. Diese Erklärung wird durch die niedrige ermittelte Kopplungseffizienz (Kapitel 2.2.10) im vorliegenden System unterstützt.

Zusammenfassend ist die katalytische Leistungsfähigkeit der K_CYP72A1 in Kombination mit diesem untersuchten artifiziellen RP-System stark von der Konzentration und dem eingesetzten RP-Verhältnis abhängig. Ein Hauptgrund ist eine niedrige Kopplungseffizienz, der teilweise durch Einsatz hoher RP-Konzentrationen entgegengewirkt werden kann. Unter Einbeziehung der Reaktionsökonomie (Abbildung 2.20) ist die Zugabe hoher RP-Konzentrationen zur Optimierung nicht zwingend zielführend. Der Effekt erhöhter Secologanin-Ausbeuten bei erhöhter RP-Konzentration steht bei den höchsten getesteten RP-Konzentrationen in keinem proportionalen Verhältnis.

Durch die Untersuchung des Zeitverlaufs der Umwandlung von Loganin bei verschiedenen Reaktionstemperaturen (Abbildung 2.22) wurde ersichtlich, dass der überwiegende Teil von Secologanin in den ersten zwei Stunden nach Beginn der Reaktion synthetisiert wird, wie bereits während vorangegangener Experimente beobachtet (Abbildung 2.18) wurde. Innerhalb der Zeitintervalle wurde mit fortschreitender Reaktionsdauer jeweils ein geringerer Anstieg des

Secologanin-Signals detektiert. Dieser Effekt war bei höherer Reaktionstemperatur jeweils deutlicher ausgeprägt und auch das Ende der Zunahme von Secologanin wurde früher detektiert. Bei 35 °C wurde bereits nach etwa 20 Minuten das maximale Secologanin-Signal erreicht. Der Zeitverlauf der Umwandlung von Loganin durch K_CYP72A1 war folglich von der Reaktionstemperatur abhängig und ist durch eine mögliche temperaturabhängige Inaktivierung der K_CYP72A1 oder RP erklärbar. Der Unterschied der Loganin- und Secologanin-Konzentrationen bei 35 °C nach zwei Stunden und nach zwanzig Stunden (Abbildung 2.23) legen eine alternative Erklärung nahe, bei der temperaturabhängige Nebenreaktionen ausgehend von Secologanin Relevanz besitzen. Der Umsatz von Loganin war bei 15 bis 35 °C nur in geringem Maße temperaturabhängig. Diese Beobachtung spricht gegen eine Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung der K_CYP72A1.

Der Zeitpunkt, bei dem die Reaktion augenscheinlich zum Erliegen kommt (Abbildung 2.22), wird vermutlich durch verschiedene Faktoren wie der temperaturabhängigen Reaktionsgeschwindigkeit, der *total turnover number* und einer temperaturabhängigen, konkurrierenden Nebenreaktion bestimmt. Weitere Faktoren, wie die Stabilität der FpR können ebenfalls einen Faktor darstellen. Die Reduktase neigt in reduzierter Hydrochinon-Form zur Denaturierung. Bei niedrigem pH-Wert (pH 6,5 – 7,5) und Temperaturen unterhalb von 30 °C ist diese Denaturierung verlangsamt.[335]

Folglich ist die gemessene Secologanin-Konzentration insbesondere bei Reaktionstemperaturen über 25 °C und Inkubationszeiten von mehr als 2 Stunden als das Resultat konkurrierender Reaktionen, der Umwandlung von Loganin zu Secologanin und einer vermutlich von Secologanin ausgehenden Nebenreaktion zu interpretieren. Es ist an dieser Stelle erwähnenswert, dass keine Umsetzung von Secologanin durch K_CYP72A1 beobachtet wurde, wenn die K_CYP72A1 mit Secologanin und Loganin (Abbildung 2.24) oder nur mit Secologanin eingesetzt wurde. Es ist denkbar, dass eine solche Wechelwirkung nur mit Produkt möglich ist, das nach der Umsetzung von Loganin nahe am aktiven Zentrum ist.

Dugé de Bernonville *et al.* 2015[154] demonstrierten, dass verschiedene CYP72A1-Isoformen als Nebenprodukt das Secologanin-Oxidationsprodukt Secoxyloganin bildeten. Secoxyloganin wurde – möglicherweise bedingt durch technische Limitierungen – während der hier durchgeführten Experimente nicht oder nur in Spuren detektiert. Auch Nebenprodukte ausgehend von Secologanin, die aus einer möglichen Hydrolyse oder Bildung von Schiff-Basen hervorgehen, konnten nicht nachgewiesen werden. Denkbar ist, dass auch Nebenprodukte – z. B. im Reaktionsmedium in Gegenwart von Zell-Lysat – instabil sind oder umgesetzt werden.

Bei der literaturbekannten Wildtyp CYP72A1 aus *S. cerevisiae* Zellextrakten[154] und der hier in *E. coli* hergestellten K_CYP72A1 sind Gemeinsamkeiten zu erkennen. Insbesondere bei den niedrigen Secologanin-Ausbeuten, dem frühen Ende der Secologanin-Neubildung und dem Rückgang der Secologanin-Konzentration mit fortlaufender Reaktion, sind Parallelen vorhanden.[154] Die Beobachtungen dieser Arbeit basieren also vermutlich nicht auf den N-terminalen Modifikationen am Enzym, sondern sind Eigenschaften der CYP72A1.

Der Anteil aktivier K_CYP72A1 während der Synthese von Secologanin wurde untersucht, indem die P450-Konzentration im Reaktionsansatz mittels CO-Differenzspektrum und die Produktkonzentratzion in der Reaktionslösung überwacht (Abbildung 2.25) wurde. Auf Basis der CO-Differenzspektren war nach 180 Minuten immernoch die Hälfte der eingesetzten K_CYP72A1 katalytisch aktiv. In den folgenden Zeitintervallen wurde jedoch nur jeweils eine geringe – oder keine – Erhöhung der Secologanin-Menge detektiert, obwohl noch potenziell aktive K_CYP72A1 vorhanden war. Obgleich zu Anfang Loganin am schnellsten umgesetzt wurde, war über die gesamte Reaktionsdauer eine langsame Abnahme der Loganin-Menge zu erkennen. Da eine Instabilität von Loganin bei Voruntersuchungen ausgeschlossen (Kapitel 8.2.3) worden war, setzte die K_CYP72A1 also weiterhin Loganin um. Bei K_CYP72A1, die unter identischen Bedingungen zeitgleich in Puffer inkubiert wurde, waren kaum Unterschiede bei den Absorptionsdifferenzen bei 450 nm auf den CO-Differenzspektren zu sehen. Während der Umwandlung von Loganin fanden also keine Veränderungen der Koordinationssphäre des Häm-Eisens statt, die per CO-Differenzspektrum erkennbar sind. Es existieren jedoch Szenarien, bei denen P450 durch eine mechanismusbasierte Inhibition, durch Reaktion mit einem reaktiven Reaktionsprodukt, mit ROS oder anderen Liganden inaktiviert werden.[362–364] Bei CYP4A11 beispielsweise ist die inhibierende Wirkung einer Oxidation des Häm-Thiolatliganden durch H_2O_2 nach Zugabe von Natriumdithionit umkehrbar.[365,366] Inhibitoren wie Schwefel-basierte Liganden mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten wären ebenfalls auf den CO-Differenzspektren unauffällig.[367] Bei der Untersuchung des Logannin- und Secologanin-Einflusses (Abbildung 2.24) konnte keine Substrat- oder Produktinhibition festgestellt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass nur entstehendes Secologanin oder Secoxyloganin diese Wirkung entfaltet. Tiefergehende Analysen wie Substratbindespektren mit gereinigtem Präparat könnten zur Klärung dieser offenen Fragen beitragen.

Mit dem Ziel die Secologanin-Produktkonzentration zu maximieren, wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Synthese von Secologanin untersucht (Abbildung 2.26). Bei pH 7 konnte jeweils die größte Secologanin-Konzentration detektiert werden. Der ursprünglich verwendete

50 mM Tris-Puffer (pH 7,5 bei 4 °C) entspricht demnach bereits nach Einbeziehung der Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes näherungsweise dem optimalen pH-Wert.

Im Trend wurde bei den Reaktionen in Phosphatpuffer weniger Secologanin detektiert als in der Referenz. Ein Grund kann der Einfluss der erhöhten Salzkonzentration auf die Flavodoxin-P450-Interaktion sein. Diese kann durch die Ionenkonzentration in der Lösung beeinflusst werden.[360]

Es ist bekannt, dass der optimale pH-Wert für FpR-Aktivität im basischen (pH 9,5) liegt. Im Vergleich wurde die höchste enzymatische Stabilität bei niedrigem pH-Wert (pH 6,5-7,5) beobachtet.[335] Aufgrund dieser pH-Abhängigkeit ist es möglich, dass das beobachtete pH-Optimum der K_CYP72A1 durch FpR-spezifische Eigenschaften beeinflusst wird.

Ein Gegenargument ist, dass der in der Literatur[335] dokumentierte pH-Einfluss auf die Stabilität und Aktivität der FpR innerhalb des im Versuch untersuchten pH-Bereichs gering und bei pH=7 minimal ist. Das beobachtete pH-Optimum der K_CYP72A1 liegt zwischen den literaturbekannten Werten für *C. roseus* LAMT (pH 7,5)[141] und *C. roseus* STR (pH 6,5-7)[177,178].

Es wurden die kinetischen Reaktionsparameter der in *E. coli* exprimierten, löslichen K_CYP72A1 zusammen mit YkuN und FpR und dem natürlichen Substrat Loganin ermittelt (Abbildung 2.28). Ein Vergleich der berechneten Parameter (Kapitel 3.3.9) (K_m = 389 µM, k_{cat} = 1,842 ± 0,052 min^{-1}) mit Literaturwerten anderer Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus der frühen TIA Biosynthese ist mit Einschränkungen möglich. Die verfügbaren Literaturwerte stammen vornehmlich aus mikrosomalen Präparationen eukaryotischer Herkunft ohne präzise Angabe der eingesetzten Enzymkonzentration. Für CYP76B6, die erste P450 der TIA-Biosynthese und ein *Bottleneck*[75] der Strictosidin Biosynthese, wird aus Untersuchungen mit *Spodoptera frugiperda* Zellkulturen ein K_m-Wert von 15,81 µM und kcat von 7,86 min^{-1} mit dem Substrat Geraniol angegeben.[368] Die ermittelte Substrataffinität der K_CYP72A1 zu Loganin ist im Vergleich eine Größenordnung niedriger. Die ermittelte Wechselzahl ist um ein Vierfaches niedriger, besitzt jedoch dieselbe Größenordnung. Dies deutet (mit Einschränkungen: artifizielles RP-System, modifizierter N-terminus, heterologe Präparation, *in vitro* Reaktion) darauf hin, dass CYP72A1 in ähnlichem Ausmaß limitierend auf TIA Biosynthese wirken könnte wie CYP76B6. Gleichermaßen unterstreicht diese Beobachtung die Relevanz der Secologanin-Synthase als Ziel für weitreichende Untersuchungen und Optimierungen.

Die Ergebnisse aus den Experimenten zur Kopplungseffizienz (Tabelle 2.5) bestätigen die Erkenntnisse aus der RP-Optimierung. Die bakteriellen RP, FpR und YkuN, sind als Einzelproteine gegenüber den fusionierten ATR2 und YR-P5 zu bevorzugen. Eine Erhöhung

der Konzentrationen von YkuN und FpR bewirkte eine höhere NADPH-Verbrauchsrate zugleich niedrigere Kopplungseffizienz. Die niedrige Kopplungseffizienz von ATR2 (>0.1 %, Tabelle 2.5) steht im Einklang mit dem zuvor beobachteten, vergleichsweise geringen Secologanin-Signal, wenn ATR2 eingesetzt wurde (Abbildung 2.18, Abbildung 2.19). Bei den Proben 10YR-P5| 1K und 10F | 10Y |1 K stehen jeweils etwa die gleiche Anzahl FAD und FMN-haltiger Domänen zur Übertragung von Elektronen zur Verfügung. Der NADPH-Verbrauch ist jeweils ähnlich, aber die berechnete Kopplungseffizienz ist bei den Einzelproteinen um etwa das Vierfache höher als beim Fusionsprotein. Bei der Umsetzung von Tetradecansäure durch eine bakterielle CYP109B1 aus *B. subtilis* wurde mit YR-P5 fast eine Verdopplung der Kopplungseffizienz im Vergleich zu den Einzelproteinen erzielt.[330] Die niedrige Kopplungseffizienz, die bei der Charakterisierung der K_CYP72A1 beobachtet wurde, kann plausibel durch die pflanzliche Herkunft und die N-terminalen Modifikationen erklärt werden. Die Modifikationen können die katalytische Aktivität durch veränderte P450-RP-Interaktion, Membranwechselwirkung und Lipidumgebung beeinflussen.[356,358]

Es ist an dieser Stelle wichtig anzumerken, dass die Ergebnisse aus der Bestimmung der kinetischen Parameter und der Kopplungseffizienz unter der Annahme gültig sind, dass Reaktionen – wie eine mögliche Überoxidation von Secologanin – die zu einer Herabsetzung der Secologanin-Konzentration und zu einer Unterschätzung der kinetischen Parameter führen, vernachlässigbar sind. Basierend auf den Experimenten zum zeitlichen Ablauf der Umwandlung von Loganin (Kapitel 2.2.4) wurde dieser Problematik in beiden Experimenten mit einer niedrigen Inkubationszeit begegnet.

Zusammenfassend konnte die katalytische Aktivität der K_CYP72A1 *in vitro* mit geeigneten RP rekonstituiert werden. Darüber hinaus wurde eine Optimierung der P450-RP-Wechselwirkungen und eine biochemische Charakterisierung der K_CYP72A1 durchgeführt.

3.3 Kaskade zur biokatalytischen Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin

Es wurde eine *in vitro* Kaskade zur Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin erreicht, indem die gleichzeitige katalytische Aktivität von insgesamt sechs Enzymen kombiniert wurde. An dieser Kaskade wurden bereits in der ersten Fassung (Abbildung 2.29) einige Optimierungen und Anpassungen im Vergleich zur Biosynthese in *C. roseus* vorgenommen. Zur Deckung des Elektronenbedarfs und Rekonstitution der Aktivität der modifizierten K_CYP72A1 wurden zwei lösliche heterologe Redoxpartner YkuN und FpR anstatt einer

membranständigen Diflavinreduktase eingesetzt. Eine STR aus *R. serpentina,* die über eine höhere Temperaturstabilität[177] verfügt, wurde anstatt der homologen STR aus *C. roseus* eingesetzt. Notwendige Kofaktoren, wie NAD(P)H und SAM, die *in vivo* aus dem Metabolismus des Wirtsorganismus entstammen, wurden durch ein System zur Regeneration der Kofaktoren auf Basis einer GDH aus *B. megatherium* und durch Zugabe von SAM im Überschuss ausgegeglichen.

Anhand der Chromatogramme (Abbildung 2.30) war ersichtlich, dass eine abgeschlossene Reaktionsfolge von Loganinsäure bis hin zu Strictosidin hergestellt werden konnte und alle eingesetzten Enzyme auch in Kombination trotz der Unterschiede zur Biosynthese von Strictosidin katalytisch aktiv waren. Entgegen den Erwartungen wurde auch in Abwesenheit von LAMT in geringer Menge Strictosidin erzeugt. Eine plausible Ursache sind *E. coli*-Proteine wie Methyltransferasen, die ein Bestandteil des Zell-Lysats sein und Loganinsäure methylieren könnten. In Puffer wurde eine Hintergrundmethylierung von Loganinsäure nicht beobachtet (Abbildung 2.31). Obgleich identische Konzentrationen verschiedener Analyten – bedingt durch variierende Ionisierbarkeiten – stark unterschiedliche Signalflächen liefern, erlauben die vorliegenden Ergebnisse eine Abschätzung der relativen Effizienz der Bildung und Umwandlung der einzelnen Intermediate. In Gegenwart der getesteten Katalysatorkonzentrationen (1 µM LAMT, 0,5–2 µM µM K_CYP72A1 und 0,5 µM STR) wurde jeweils abhängig von der eingesetzten K_CYP72A1-Konzentration in unterschiedlichem Ausmaß das Zwischenprodukt Loganin detektiert. Es wurde folglich über die Dauer der Reaktion mehr Loganin gebildet, als durch K_CYP72A1 umgesetzt wurde. Zugleich wurde auch jeweils das gesamte Secologanin umgewandelt. Selbst bei der höchsten untersuchten K_CYP72A1-Konzentration (Abbildung 2.30, (1)) wirkte die Umwandlung von Loganin durch K_CYP72A1 als Engpass für die Synthese von Strictosidin. Diese Aussage ist mit den Einschränkungen gültig, dass dieses Experiment eine Momentaufnahme liefert und keine Aussage darüber erlaubt, ob über die gesamte Inkubationsdauer die Umwandlung schneller abläuft als die Synthese von Secologanin. Die beobachtete geringe Aktivität ist in Übereinstimmung mit den in der Literatur[75,154] verfügbaren Daten zur CYP72A1 aus *C. roseus*.

Im Folgenden wurden die Auswirkungen der LAMT auf die Kaskadenreaktion (Abbildung 2.33) und auf die Umsetzung von Loganinsäure untersucht (Abbildung 2.31). Bei der Umsetzung von Loganinsäure mit LAMT in Puffer wurde 150 µM Loganinsäure selbst mit 4 µM LAMT nicht vollständig umgesetzt. Ohne LAMT wurde zudem keine Methylierung von Loganinsäure beobachtet.

Unter Kaskaden-Reaktionsbedingungen wurde 250 µM Loganinsäure bereits mit der niedrigsten LAMT-Konzentration (1 µM LAMT) vollständig umgesetzt (Abbildung 2.33). Eine Produktinhibierung[141] durch Loganin als Ursache für die beobachteten Unterschiede ist unwahrscheinlich, da bei der Kaskade eine ähnliche oder höhere Loganin-Konzentration gemessen wurde. Als Ursache für die höhere Aktivität der LAMT ist eine mögliche stabilisierende Wirkung[369] durch die im Lysat enthaltenen Proteine denkbar; jedoch ist NADPH mit großer Wahrscheinlichkeit für die Aktivitätsunterschiede verantwortlich. Reduktionsmittel wie DTT oder NADPH in Kombination mit FAD, können die LAMT-Aktivität um ein Vielfaches steigern.[342]

Es konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der zur Kasakdenreaktion eingesetzen LAMT-Konzentration und der Endkonzentration von Strictosidin besteht, obwohl Loganinsäure unabhängig von der LAMT-Konzentration vollständig umgesetzt wurde. Eine schnellere Umsetzung von Loganinsäure könnte somit einen Einfluss auf die gesamte Kaskadenreaktion ausüben, indem Folgereaktionen wie die Spaltung des Loganin-Fünfringes – begünstigt werden. Ein relevantes Beispiel für den Einfluss von Nebenreaktionen auf den Stoffwechselfluss ist die Nepetalactol-Produktion in *S. cerevisiae*, bei der eine wichtige Anpassung durch *metabolic engineering* die Unterdrückung unproduktiver Nebenreaktionen durch die Iridoid Synthase war.[370] Anders als bei der LAMT wurde bei der K_CYP72A1 (Abbildung 2.25) eine Abhängigkeit der Produktkonzentration von der eingesetzten Substratkonzentration beobachtet. Mit Blick auf den zeitlichen Verlauf der Umsetzung von Loganin (Abbildung 2.22 und Abbildung 2.25) erscheint es plausibel, dass eine schnellere Umsetzung von Loganinsäure zu Loganin durch die LAMT auch die folgende Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 begünstigt. Die STR könnte prinzipiell auf ähnliche Weise von den Vorreaktionen abhängig sein. Aufgrund der Beobachtung, dass in Umsetzungen durch die STR unter vergleichbaren Bedingungen Secologanin immer vollständig verbraucht und Loganin unter den Produkten detektiert wurde, ist dies sehr unwahrscheinlich.

Zusammenfassend wurde keine Limitierung der *in vitro* Kaskadenreaktion durch die LAMT festgestellt. Vielmehr liefert die Untersuchung der Kaskadenreaktion mit verschiedenen LAMT-Konzentrationen weitere Hinweise darauf, dass die Aktivität der K_CYP72A1 entscheidend für die Synthese von Strictosidin ist. Es wurde keine Limitierung durch die LAMT erwartet, da bei Umsetzungen mit Methyltransferasen *in vivo* üblicherweise die Verfügbarkeit des SAM-Kofaktors begrenzend wirkt. Dies wurde für eine Zahl *E. coli*-basierter Biosynthesen[371–373] berichtet. Bei der vorliegenden *in vitro* Synthese wurde einer Verknappung durch Einsetzen von SAM im Überschuss entgegengewirkt. Sollte die vorliegende

Kaskadenreaktion *in vivo* realisiert werden, so müsste auch die SAM-Biosynthese als potenzieller Engpass bedacht werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass im vorliegenden System bei Zugabe von 5 µM LAMT die optimale Konzenztration des Zielproduktes Strictosidin erreicht wurde.

Die Effektivität der Umsetzung von Secologanin durch die STR war während der Untersuchung der Einzelreaktion (Abbildung 2.29, Reaktion III) in Puffer so hoch, dass 1000 µM Secologanin die vierfache übliche in der Kaskade eingesetzte Substratmenge und 1000 µM Tryptamin durch 500 µM STR in zwei Stunden vollständig umgesetzt wurden (Abbildung 2.32). Die beobachtete stoffmengenmäßige Effizienz, mit der die Reaktion abläuft, kann mit den literaturbekannten Michaelis-Menten-Konstanten der verwendeten *R. serpentina* STR (6,2-7,2 µM für Tryptamin, K_m = 39 µM für Secologanin)[174–176] erklärt werden. Im Vergleich zur literaturbekannten Michaelis-Menten-Konstante der LAMT (K_m = 315 µM, Loganinsäure)[153] und den ermittelten Werten für die K_CYP72A1 (K_{mapp} = 389 µM, Loganin, Kapitel 2.2.9) besitzt die STR eine hohe Substrataffinität. Besonders mit Blick auf die durch K_CYP72A1 und LAMT katalysierten Reaktionen und untersuchten Reaktionsbedingungen ist auffällig, dass das eingesetzte Secologanin nach maximal zwei Stunden bereits ab einer Enzymkonzentration von 50 nM STR quantitativ umgewandelt wurde (Abbildung 2.32, B). Erst bei einem Enzym-zu-Substrat-Verhältnis von 1 zu 10000 (25 nM STR und 250 µM Secologanin) wurde Secologanin nicht vollständig umgewandelt. Diese Ergebnisse sind im Einklang zu literaturbekannten Kinetik-Daten zur STR, welche dem Enzym innerhalb der Reaktionsfolge (LAMT: k_{cat} = 0,31 s^{-1},[153] K_CYP72A1: k_{cat} = 1,842 ± 0,052 min^{-1}, diese Arbeit) eine auffällig hohe Reaktionsgeschwindigkeit zusprechen (STR: k_{cat} [174] = 78000 min^{-1}). Die STR bewirkt durch die hohe Aktivität und Substrataffinität bei gleicher Enzymkonzentration – im Vergleich zur LAMT und K_CYP72A1 – somit effektiv eine sofortige Umwandlung des im Reaktionsansatz befindlichen Secologanins. Dies war auch am Zusammenhang zwischen eingesetzer STR-Konzentration und jeweils detektierter Strictosidin-Konzentration zu erkennen (Abbildung 2.34). Da Secologanin unter allen Bedingungen durch STR vollständig umgesetzt wurde, führte wahrscheinlich die beschleunigte Umwandlung von Secologanin während der Umsetzungen mit jeweils erhöhter STR-Konzentration zu mehr Zielprodukt. Eine denkbare Erklärung ist eine Abhängigkeit der K_CYP72A1-Aktivität von der Secologanin-Konzentration (Produkthemmung) – beispielsweise durch den Einfluss der Secologanin-Konzentration auf die Dissoziation des Enzym-Produkt-Komplexes. Secologanin im Reaktionsansatz hatte jedoch keinen Einfluss auf die Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 (Abbildung 2.24). Eine andere Erklärung ist eine Unterdrückung möglicher

konzentrationsabhängiger Neben- oder Zerfallsreaktionen ausgehend von Secologanin, indem dieses unmittelbar nach dem Entstehen durch STR umgewandelt wird.

Strictosidin-Aglycon wurden proteinvernetzende Eigenschaften nachgewiesen. Die Substanz sowie die vorherige Freisetzung von Strictosidin werden mit der Verteidigung – insbesondere gegen Fraßfeine und Mikroorganismen – in Zusammenhang gebracht. Bei Untersuchungen von Vakuolen aus *C. roseus*-Blattzellen stieg die Konzentration von Strictosidin in Antwort auf entsprechende Signalstoffe um etwa das Zehnfache.[107] Insofern aus *in vitro* Umsetzungen mit einer orthologen STR aus *R. serpentina* solche Rückschlüsse auf *in vivo* Systeme zulässig sind, wäre es denkbar, dass die Beobachtungen aus der Untersuchung der Kaskade wie die Geschwindigkeitsunterschiede bei der Umsetzung von Loganin und Secologanin, die eine Anreicherung von Loganin bewirken – auf die Regulation der Synthese von Strictosidin zurückzuführen sind.

Zusammenfassend wurde unter den gegebenen Reaktionsbedingungen in Gegenwart von STR das durch K_CYP72A1 produzierte Secologanin (Abbildung 2.32) in weniger als 2 Stunden vollständig umgewandelt. Die Aktivität der STR wirkte nicht limitierend auf die Gesamtreaktion. Es konnte gezeigt werden, dass in der Kaskade bei der höchsten untersuchten STR-Konzentration von 500 nM, die höchste Konzentration des Zielproduktes erreicht wurde. Mögliche Limitierungen der Synthese von Strictosidin durch andere Bestandteile der Kaskadenreaktion als die K_CYP72A1 sind schwierig zu untersuchen, da mögliche Auswirkungen auf die Ziel- und Zwischenprodukte durch die im Vergleich geringe Aktivität der K_CYP72A1 abgeschwächt werden. Zur Optimerung der Kaskade wurde eine Reihe von Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, RP) mit dem Ziel getestet, den aktiven Zeitraum der K_CYP72A1 bestmöglich auszunutzen oder zu verlängern (Kapitel 2.3.7). Anhand der Endkonzentration des Zielprodukts spiegeln die Ergebnisse der Untersuchung der Kaskade die gleichen Tendenzen wider, die bereits während der Charakterisierung der K_CYP72A1 beobachtet wurden. Dazu gehört der Einfluss einer Feineinstellung der RP-Konzentrationen (vgl. Abbildung 2.38, 2 mit Abbildung 2.19), der Einfluss der Reaktionstemperatur (vgl. Abbildung 2.38, 4 mit Abbildung 2.23) und der Einfluss einer Abweichung vom pH-Wert-Optimum (vgl. Abbildung 2.38, 3 mit Abbildung 2.26).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die zeitliche Abfolge, in der die Katalysatoren auf die Reaktion wirken, die Konzentration der Reaktionsprodukte beeinflusst (Abbildung 2.39). Bei verspäteter Zugabe von STR wurde weniger Zielprodukt gemessen als bei der Referenzreaktion. Dies kann wie bei der Untersuchung der STR-Konzentration durch den Einfluss der Secologanin-Konzentration im Reaktionsmedium oder ungünstige

Wechselwirkungen der K_CYP72A1 mit Secologanin erklärt werden. Bei einem möglichen rationalen Proteindesign der K_CYP72A1 sind die an der Dissoziation des K_CYP72A1-Secologanin-Komplexes beteiligten Aminosäuren ein vielversprechender Ansatzpunkt.

Die etwas erhöhte Strictosidin-Endkonzentration nach verzögerter Zugabe von K_CYP72A1 und STR (Abbildung 2.39, c) kann auf Einflüsse zurückgeführt werden, die bereits während der Untersuchung der zur Kaskade eingesetzten LAMT-Konzentration diskutiert wurden. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch durch Steigerung der eingesetzten LAMT-Konzentration (siehe Abbildung 2.33) erreicht, jedoch bei einem geringeren experimentellen Aufwand. Bei der Produktion von Strictosidin in *S cerevisiae* wurde über eine Anreicherung von Loganin (0,8 mg/L Loganin bei 0,5 mg/L Strictosidin) berichtet, welche auch durch Erhöhung der CYP72A1-Genexpression nicht reduziert werden konnte.[75] In dieser Arbeit wurde während der Charakterisierung der K_CYP72A1 und bei der Optimierung der Kaskade die größte Menge Loganin umgesetzt, wenn die maximal mögliche K_CYP72A1-Konzentration in Kombination mit einer abgestimmten RP-Konzentration eingesetzt wurde. Möglicherweise sind in *S cerevisiae* Einflüsse wie Zelltoxizität zu adressieren, die *in vitro* keine Rolle spielen.

Unter den besten ermittelten Bedingungen (Kapitel 2.3.8) für die *in vitro* Kaskade wurden bei einer Verdopplung der eingesetzten K_CYP72A1-Konzentration etwa 75 % der vorgelegten Menge Loganinsäure zu Strictosidin umgesetzt. Dabei wurden Strictosidin-Konzentrationen von etwa 190 µM erreicht. Diese entsprechen einer Menge von etwa 100 mg Strictosidin in einem theoretischen Reaktionsvolumen von 1L. Die beobachtete Abhängigkeit der *in vitro* Kaskade von der Aktivität der K_CYP72A1 untermauert die Einordnung der K_CYP72A1 als einen Engpass der Biosynthese von Strictosidin und – bedingt durch die Präkursor-Rolle von Strictosidin – auch für die TIA-Biosynthese.

4 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine *in vitro* Kaskade etabliert, welche die katalytische Aktivität pflanzlicher und mikrobieller Enzyme aus insgesamt fünf verschiedenen Organismen beinhaltet. Zu diesem Zweck wurde durch Modifikation des N-Terminus eine heterologe Herstellung der pflanzlichen CYP72A1 in *E. coli* in katalytisch aktiver und löslicher Form erreicht. Die katalytische Aktivität der K_CYP72A1 konnte mit geeigneten RP rekonstituiert werden. *E. coli* als Wirt erlaubte dabei ohne eine vorherige Proteinreinigung eine selektive und zuverlässige Konzentrationsbestimmung der K_CYP72A1. Für die *in vitro* Durchführung der Umsetzung von Loganin und die biochemische Charakterisierung der K_CYP72A1 war dies ein entscheidendes Befähigungskriterium. Aus der biochemischen Charakterisierung der K_CYP72A1 ging unter anderem hervor, dass die K_CYP72A1 eine niedrige und zeitabhängige Aktivität aufweist, welche die Synthese von Strictosidin in der Kaskade limitieren kann. Die niedrige Aktivität der K_CYP72A1 konnte auch auf eine geringe Kopplungseffizienz zurückgeführt werden.

Als Teil einer Kaskade und in Form von einstufigen Umsetzungen wurde die synthetisch nutzbare katalytische Aktivität der auf die beschriebene Weise hergestellten LAMT, K_CYP72A1 und STR untersucht und angewendet. Durch die Modularität, Flexibiliät und Kontrolle, die eine *in vitro* Reaktionsführung bietet, konnte sowohl in der Kaskade als auch bei einstufigen Umsetzungen eine zeiteffektive Feineinstellung der Reaktionsparameter vorgenommen und eine fokussierte Optimierung demonstriert werden.

Es ist nicht selten, dass eine niedrige katalytische Aktivität die industriellen Anwendungsmöglichkeiten einer P450 limitiert. Neben einer Steigerung der katalytischen Aktivität wird eine wichtige Herausforderung für die Nutzbarkeit von Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus Pflanzen zur Biokatalyse auch zukünftig die heterologe Herstellung und Handhabung der Enzyme darstellen. Bei der Bewältigung dieser Problematik kann die vorliegende Arbeit als ein fundiertes Modell zur Expression, Charakterisierung und Optimierung weiterer P450 aus dem Sekundärstoffwechsel von *C. roseus* dienen.

Lösliche Präparationen der K_CYP72A1 sind insbesondere für eine Erzeugung von Pharmazeutika von potenziellem Wert. Zum Beispiel um Produktausbeuten existierender und zukünftiger Ansätze zur Synthese von TIA mittels Biokatalyse zu optimieren. Der Grund dafür ist auch die Sonderstellung der CYP72A1 innerhalb der TIA-Biosynthese. Nicht nur katalysiert CYP72A1 mit der oxidativen Ringöffnung von Loganin eine ungewöhnliche Reaktion, sondern das Enzym ist die letzte P450 und der letzte Engpass vor Strictosidin. Nach der

Deglycosylierung von Strictosidin divergiert die TIA-Biosynthese stark und folgt nicht mehr einem einzelnen Pfad. Eine höhere Effizienz der Umwandlung von Loganin hat also nicht nur Auswirkungen auf die Synthese von Strictosidin sondern potenziell auf sämtliche Reaktionszweige, die zu unterschiedlichen TIA führen. Nach demselben Prinzip könnte ein verbreitertes Substratspektrum zu einer Vielzahl von TIA-Wirkstoffderivaten führen. K_CYP72A1 bietet hier eine wertvolle Ausgangsplattform, um durch ein zukünftiges Protein-Engineering Mutanten mit erhöhter Aktivität, Stabilität und einem breiteren Substratspektrum zu erzeugen.

Die hier etablierte *in vitro* Kaskaden kann dabei als Werkzeug zur Untersuchung möglicher K_CYP72A1-Mutanten mit verbesserten katalytischen Eigenschaften verwendet werden. Darauf aufbauend ist auch eine *upstream*-Erweiterung und Optimierung der *in vitro* Kaskade denkbar. Ein naheliegendes Ziel wäre die Ankopplung an kostengünstige Vorstufen wie Geraniol oder S-Citronellal. Die gesamte optimierte Reaktionsfolge könnte in einem späteren Arbeitsschritt in Form einer Ganzzellkatalyse *in vivo* oder – in Anbetracht der Toxizität einiger Zwischenstufen, wie Strictosidin-Aglykon[107] und Monoterpenen[374] – als zellfreier Ansatz realisiert werden. Als solches könnte sie als ein *Build module* der synthetischen Biochemie verwendet werden und als Teil enzymatischer oder auch chemo-enzymatischer Synthesen Anwendung finden, um neue Syntheserouten zur Erzeugung von Secoiridoid-Derivaten oder TIA-Derivaten zu entwickeln.

Die vorliegende Arbeit und die resultierenden Erkenntnisse können einen wichtigen Beitrag für zukünftige Arbeiten an der pharmakologisch relevanten TIA-Biosynthese leisten. Die etablierte Kaskade ist ein wertvolles Werkzeug zur Erforschung und Optimierung biokatalytischer TIA-Synthesen und kann als Basis zur Erschließung alternativer Syntheserouten herangezogen werden.

5 Materialien

Alle verwendeten Chemikalien dieser Arbeit wurden, insofern nicht anders deklariert, von Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, U. S. A), Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), VWR International (Radnor, Pennsylvania, U. S. A.) oder Extrasynthese (Genay, Frankreich) bezogen.

5.1 Puffer und Lösungen

1 M Tris-Puffer (pH 7,5)
31 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ad 250 mL ddH_20, pH 7,5 mit HCl

50 mM Tris-Puffer, pH 7,5
6,06 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ad 1000 mL ddH_20, pH 7,5 mit HCl

1M Tris-Puffer, pH 6,8
6,06 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ad 50 mL ddH_20, pH 6,8 mit HCl

TAE-Puffer(50x)
242 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
100 mL 0,5 mol/L Ethylendiamintetraacetat, pH 8,0
57 mL Essigsäure
ad 1000 mL ddH_20

Agarosegel in TAE-Puffer (0,8 %)
5,6 g Agarose (molekularbiologische Qualität)
694,4 mL TAE-Puffer (1x)

5x DNA-Probenpuffer
2 g Saccharose
10 mg Orange G
ad 5 mL ddH_20

5x Probenpuffer (SDS-PAGE)
4,5 mL Glycerin
4,5 mL 1M Tris-Puffer (pH 6,8)
2 g Natriumdodecylsulfat
0,77g DL-Dithiothreitol
0,475 g Magnesiumchlorid
4,5 mg Bromphenolblau
ad 20 mL ddH_20

Lower-Tris-Puffer
45,6 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
2,5 g Natriumdodecylsulfat
ad 250 mL dH_20, pH 8,5 mit HCl

Upper-Tris-Puffer
15 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 g	Natriumdodecylsulfat
ad	250 mL dH_20, pH 6,8 mit HCl

Sammelgel (4 %)

2,47 mL	ddH_20
1 mL	Upper-Tris-Puffer
0,52 mL	Rotiphorese® Gel 30[d] (Art. Nr. 3029, Carl Roth)
40 µL	10 Gew.-% Ammoniumperoxodisulfat in ddH_20
4 µL	Tetramethylethylendiamin zur Polymerisation

Trenngel (12,5 %)

3,33 mL	Rotiphorese® Gel 30[1] (Art. Nr. 3029, Carl Roth)
2,67 mL	ddH_20
2 mL	Lower-Tris-Puffer
40 µL	10 Gew.-% Ammoniumperoxodisulfat in ddH_20
4 µL	Tetramethylethylendiamin zur Polymerisation

5x Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)

30 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
144 g	Glycin
10 g	Natriumdodecylsulfat
ad	2000 mL dH_20

Färbelösung (SDS-PAGE)

300 mL	Methanol
100 mL	Essigsäure
2,5 g	Coomassie Brilliant Blue R-250
ad	1000 mL dH_20

Entfärbelösung (SDS-PAGE)

300 mL	Methanol
100 mL	Essigsäure
ad	1000 mL dH_20

IMAC-Puffer A

6,06 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
8,77 g	Natriumchlorid
ad	1000 mL ddH_20, pH 7,5 HCl, Sterilfiltration

IMAC-Puffer B

6,06 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
8,77 g	Natriumchlorid
34,04 g	Imidazol
ad	1000 mL ddH_20, pH 7,5 mit HCl, Sterilfiltration

Lagerpuffer

1,52 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
2,19 g	Natriumchlorid
5 Vol.-%	Glycerin

[d] wässrige Lösung von Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1

ad	250 mL ddH_20, pH 7,5 mit HCl, Sterilfiltration

TBS-Puffer

6,06 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
8,77 g	Natriumchlorid
ad	1000 mL ddH_20, pH mit 7,5 HCl

TBST-Puffer

1 mL	Tween 20
ad	1000 mL ddH_20

Blockier-Puffer

0,5 g	Magermilchpulver
ad	50 TBST-Puffer

Transfer-Puffer

3,03 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
11,25 g	Glycin
100 mL	Methanol
ad	1000 mL dH_20, pH 8,3 mit HCl

Antikörper-Lösung

5 µl	Anti-His6-Körper
4 U	Anti-His_6-Peroxidase, *M. musculus* IgG1 (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz)
50 ml	Blocking-Puffer

5x Natriumacetat Puffer (pH 3,7)

1 mL	1 mol/L Natriumacetat in ddH_2O
9 mL	1 mol/L Essigsäure in ddH_2O

Waschpuffer (StageTips)

7,5 mL	Wasser (LC/MS-Qualität)
2,5 mL	Methanol (LC/MS-Qualität)

FSME-Stammlösung (1 mol/L, Stammlösung für den internen Standard)

0,792 g	Methanol (LC/MS-Qualität)
208,2 mg	Ferulasäure Methylester

FSME-Lösung (0,005 mol/L, interner Standard)

5 µL	FSME-Stammlösung
995 µL	Wasser (LC/MS-Qualität)

DNPH-Lösung

15 mg	2,4-Dinitrophenylhydrazin
5 mL	Acetonitril (LC/MS-Qualität)

TfbI-Lösung

32,9 g	Glycerin
2,42 g	Rubidiumchlorid
2 g	Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat
0,59 g	Kaliumacetat

ad 200 mL ddH_20, pH 5,8 mit Essigsäure, Sterilfiltration

TfbII-Lösung

19,7 g Glycerin
1,1 g Calciumchlorid
0,21 g 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
0,12 g Rubidiumchlorid
ad 100 mL ddH_20, pH 6,6 mit NaOH, Sterilfiltration

0,2 M Phosphatpuffer (pH 6–8)

Tabelle 5.1 – Phosphatpuffer von pH 6 bis 8.

Puffer*	m(KH_2PO_4)	m(Na_2HPO_4*7 H_20)
0,2 M Phosphatpuffer pH 6	1050 mg	330 mg
0,2 M Phosphatpuffer pH 6,5	822 mg	845 mg
0,2 M Phosphatpuffer pH 7	468 mg	1630 mg
0,2 M Phosphatpuffer pH 7,5	194 mg	2250 mg
0,2 M Phosphatpuffer pH 8	64 mg	2540 mg

*jeweils ad 50 mL ddH_20

5.2 Antibiotika und Nährmedien

5.2.1 Antibiotika

Die aufgeführten Antibiotika wurden zur Präparation der jeweiligen Stammlösung in ddH_2O gelöst und durch Filtration sterilisiert.

Tabelle 5.2 – Antibiotikakonzentrationen zur Kultivierung mikrobieller Stämme.

Antibiotikum	Endkonzentration [µg/mL]	Stammlösung [mg/mL]
Streptomycinsulfat	50	50
Kanamycinsulfat	50	50
Ampicillin Natriumsalz	100	100

5.2.2 Nährmedien

4000x Trace elements Lösung

2,7 g $FeCl_3$ x 6 H_2O
0,2 g $ZnCl_2$ x 4 H_2O
0,2 g $CoCl_2$ x 6 H_2O
0,2 g Na_2MoO_4 x 2 H_2O
0,2 g $CaCl_2$ x 2H_2O
0,1 g $CuCl_2$
0,05 g H_3BO_3
10 mL HCl
ad 10 mL ddH_20, Sterilfiltration

LB-Medium

5 g	NaCl
10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
ad	1000 mL dH_20, Autoklavieren

LB- Agarplatten

3,5 g	NaCl
7 g	Trypton
3,5 g	Hefeextrakt
10,5 g	Agar
ad	700 mL dH_20

Phosphatpuffer(x10)

23,6 g	Kaliumdihydrogenphosphat
164,3 g	Dikaliumhydrogenphosphat
ad	1000 mL dH_20, pH 7, Autoklavieren

TB-Medium

12 g	Trypton
24 g	Hefeextrakt
4 ml	Glycerin
ad	900 mL dH_20, Autoklavieren

Vor der Verwendung als Nährmedium wurden unter sterilen Bedingungen 100 mL Phosphatpuffer(x10) zu 900 mL TB-Medium zugegeben.

5.3 Verwendete Enzyme, Kits und Geräte

Verwendungsfertige, kommerzielle Enzyme, Puffer, Kits und Primer sind im folgenden Abschnitt aufgelistet. Alle für die Erzeugung der verwendeten Vektoren benötigten Materialien wurden, wenn nicht anders deklariert, von Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, U.S.A.), New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, U.S.A), Macherey-Nagel (Düren, Deutschland), Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Zymo Research (Irvine, Californien, U.S.A.) bezogen. Verwendete molekularbiologische Enzyme, und Präparationen.

Tabelle 5.3 – Auflistung verwendeter, gebrauchsfertiger Enzyme und Präparationen.

Enzym	Hersteller	Art.-Nr./Kat.-Nr.
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific	F530N
Fast AP	Thermo Fisher Scientific	EF0654
DpnI	Thermo Fisher Scientific	ER1701
FastDigest NcoI	Thermo Fisher Scientific	FD0573
FastDigest HindIII	Thermo Fisher Scientific	FD0504
FastDigest NdeI	Thermo Fisher Scientific	FD0583

PmeI	Thermo Fisher Scientific	ER1341
T5 Exonuklease	New England Biolabs	M0363S
Taq DNA-Ligase	New England Biolabs	M0208S
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific	EL0014
Generuler 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	SM1331
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	26616
PageRuler™ *Unstained Protein Ladder*	Thermo Fisher Scientific	26614
BM Blue POD-Substrate, soluble	Roche Diagnostics	11 484 281 001

Tabelle 5.4 – Auflistung molekularbiologischer kommerzieller Puffer.

Puffer	Hersteller	Art.-Nr./Kat.-Nr.
Phusion HF Buffer Pack	Thermo Fisher Scientific	F518L
Phusion GC Buffer Pack	Thermo Fisher Scientific	F519L
Buffer B (10X)	Thermo Fisher Scientific	BB5
T4-DNA-Ligase-Buffer	Thermo Fisher Scientific	B69
FastDigest Buffer	Thermo Fisher Scientific	B64

5.3.1 Kits, Säulen und Zubehör

Tabelle 5.5 – Auflistung verwendeter Kits, Säulen und Zubehör.

Kit	Hersteller	Art.-Nr./Kat.-Nr.
GeneJET Gel-Extraktionskit	Thermo Fisher Scientific	K0691
ZR Plasmid Miniprep - Classic	Zymo Research	D4054
Protino® Columns 14 mL	Macherey-Nagel	745250.10
Vivaspin® Turbo 15	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)	VS15T41
PD MidiTrap G-25	GE Healthcare (Chicago, Illinois, U.S.A)	28918008
DC-Fertigfolie Polygram® Sil G	Carl Roth	N735.1
Amylose Resin	New England Biolabs	E8021S
Protino® Ni-NTA Agarose	Macherey-Nagel	745400.25
Roti®-Quant (5x)	Carl Roth	K015.1

5.3.2 Verwendete Geräte und Apparaturen

Tabelle 5.6 – Auflistung verwendeter Geräte und Apparaturen.

Verwendete Bezeichnung	Herstellerbezeichnung	Hersteller
Thermocycler	TProfessional basic	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Elektrophoresekammer	Mini-Sub® Cell GT Cell	Bio Rad Laboratories Inc. Hercules (Kalifornien, U.S.A.)
UV-Transilluminator	G Box Chemi HR 16	Syngene (Cambridge, UK)
Einstrahlphotometer	Ultrospec® 10	Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK)

Orbitalschüttler-Inkubator	Multitron	Infors AG (Basel, Schweiz)
Ultraschall Homogenisator	Sonifier 250	Branson (Danbury, Conneticut, U.S.A)
Sonotrode	Branson Ultrasonics™ Microtips	Branson (Danbury, Conneticut, U.S.A)
Mikrotiterplatten-Lesegerät	SpectraMax 384 Microplate Reader	Molecular Devices (San Jose, Kalifornien, U.S.A)
Western Blot - Kammer	Fastblot B33	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Zweistrahlphotometer	Lambda 35 UV/Vis Spektrophotometer	Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, U.S.A.)
Thermomixer	Eppendorf ThermoMixer® C	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Lyophille	Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LDplus mit Trockenrechen für Weithalsflaschen	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland)
Hochdruck Homogenisator	CF1	Constant Systems Ltd, (Daventry, UK)

5.4 Verwendete Plasmide, Primer und Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Polynukleotide, wie Primer und synthetisierte Gene, wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) erworben. Die Gene der *C. roseus* CYP76A26, *C. roseus* CYP72A224, *C. roseus* LAMT, *C. roseus* CYP72A1 und *R. serpentina* STR wurden in codon-optimierter Form erhalten und durch Eurofins Genomics synthetisiert. Das Konstrukt pET28a_MBP_EmrE_ApoAI* wurde von Mizrachi *et al.* dankend erhalten. Das Konstrukt pET22b_ATR2 wurde von Dr. S. Kranz-Finger dankend erhalten und die Erzeugung der rekombinanten DNA ist an anderer Stelle[329] beschrieben. Die Konstrukte pET22b76A26V1, pET22b76A26V1, pET22b76A26V1 wurden von Dr. O. Mahmoud dankend erhalten. Die Konstrukte pET16b(+)_YkuN und pET16b(+)_FpR entstammen der Plasmidsammlung der Arbeitsgruppe und die Konstruktion ist an anderer Stelle beschrieben.[327] Die Richtigkeit der Sequenzen erzeugter und erhaltener Konstrukte wurde jeweils durch Sequenzierungen (GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland) verifiziert.

5.4.1 Plasmide

Tabelle 5.7 – Auflistung kommerzieller Plasmide.

Plasmid	Nr.	Herkunft	Eigenschaften
pET-28a(+)	E1	Novagen	5369 bp; T7 Promotor; T7 Terminator; Hexahistidin-Tag kodierende Sequenz; T7-Tag kodierende Sequenz; *lacI* kodierende Sequenz; Kanamycin Resistenz; pBR322 Replikationsursprung; f1 Replikationsursprung

pET-22b(+)	E2	Novagen	5493 bp; T7 Promotor; T7 Terminator; pelB kodierende Sequenz; *bla* kodierende Sequenz; Hexahistidin-Tag kodierende Sequenz; pBR322 Replikationsursprung; *lacI* kodierende Sequenz; f1 Replikationsursprung; Ampicillin Resistenz
pET-16b(+)	E3	Novagen	5711 bp; T7 Promotor; T7 Terminator; *bla* kodierende Sequenz; Hexahistidin-Tag kodierende Sequenz; pBR322 Replikationsursprung; *lacI* kodierende Sequenz; Ampicillin Resistenz
pEX-K4	E4	Eurofins Genomics	2507 bp; lac Promotor, pUC Replikationsursprung; Kanamycin-Resistenz
pCDFDuet-1	E5	Novagen	3781 bp; CDF Replikationsursprung; T7 Promotor-1, MCS1; T7 Promotor-2, MCS2; T7 Terminator; Hexahistidin-Tag kodierende Sequenz; S-Tag kodierende Sequenz; *lacI* kodierende Sequenz; Streptomicin/Spectinomycin Resistenz

Tabelle 5.8 – Auflistung verwendeter Plasmide mit Veränderungen.

Plasmid	Nr.	Herkunft/Kapitel	Eigenschaften
pEX-K4_CYP72A1_optimized	P1	Eurofins Genomics	pEX-K4 :: cyp72A21
pEx-K4-CPR_CR_optimized	P2	Eurofins Genomics	pEX-K4 :: cpr
pEX-K4-STR_Rs_optimized	P3	Eurofins Genomics	pEX-K4 :: str
pEX-K4-CYP72A224_optimized	P4	Eurofins Genomics	pEX-K4 :: cyp72A224
pEX-K4-LAMT_optimized	P5	Eurofins Genomics	pEX-K4 :: lamt
pEX-K4_CYP76A26Crcopt	P6	Eurofins Genomics	pEX-K4 :: cyp76A26
pET28a_A_CYP72A1	P7	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*
pET28a_B_CYP72A1	P8	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_C_CYP72A1	P9	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_D_CYP72A1	P10	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_E_CYP72A1	P11	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_F_CYP72A1	P12	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_G_CYP72A1	P13	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_H_CYP72A1	P14	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_I_CYP72A1	P15	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_J_CYP72A1	P16	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_K_CYP72A1	P17	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_L_CYP72A1	P18	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_M_CYP72A1	P19	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_N_CYP72A1	P20	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_O_CYP72A1	P21	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_P_CYP72A1	P22	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$

pET28a_Q_CYP72A1	P23	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_R_CYP72A1	P24	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_T_CYP72A1	P25	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET22b_ATR2	P26	Dr. S. Kranz-Finger[329]	pET-22b(+) :: *atr2*$^{-}$
pET22b76A26V1	P27	Dr. O. Mahmoud	pET-22b(+) :: *cyp76A26*$^{-}$
pET22b76A26V2	P28	Dr. O. Mahmoud	pET-22b(+) :: *cyp76A26*$^{-}$
pET22b76A26V3	P29	Dr. O. Mahmoud	pET-22b(+) :: *cyp76A26*$^{-}$
pCDFDuet-1_CYP72A224_V1	P30	6.1.9	pCDFDuet-1 *:: cyp72A224*$^{-}$
pCDFDuet-1_CYP72A224_V2	P31	6.1.9	pCDFDuet-1 *:: cyp72A224*$^{-}$
pCDFDuet-1_CYP72A224_V3	P32	6.1.9	pCDFDuet-1 *:: cyp72A224*$^{-}$
pCDFDuet-1_CYP72A224_V4	P33	6.1.9	pCDFDuet-1 *:: cyp72A224*$^{-}$
pCDFDuet1_GST_d72CPR	P34	6.1.9	pCDFDuet-1 *:: cyp72A224*$^{-}$
pCDFDuet1_17A1d25CYP72A1_ GST_d72CPR	P35	6.1.9	pCDFDuet-1_GST_d72CPR :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_STR_N6His	P36	6.1.9	pET-28a(+) :: *str*$^{-}$
pET28a_N6His_LAMT	P37	6.1.9	pET-28a(+) :: *lamt*$^{-}$
pET16b(+)_YkuN	P38	[327]	*YkuN* liegt zwischen *XhoI* und *BamHI*
pET16b(+)_FpR	P39	[327]	*FpR* liegt zwischen *NcoI* und *BamHI*
pET28a_K_CYP72A1_C6His	P40	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_K_CYP72A1_hiC6His	P41	6.1.9	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_MBP_EmrE_ApoA1*	P42	D. Mizrachi[238]	pET-28a(+) :: *cyp72A1*$^{-}$
pET28a_MBP_EmrE_ApoA1*_QPCR#2	P43	6.1.9	pET-28a(+) :: *malE:EmrE:ApoAI*$^{-}$,
pET28a_MBP_WT_CYP72A1_ApoAI*	P44	6.1.9	pET-28a(+) :: *malE:cyp72A1*$^{-}$ *:ApoAI*$^{-}$
pET28a_MBP_C_CYP72A1_ApoAI*	P45	6.1.9	pET-28a(+) :: *malE:cyp72A1*$^{-}$ *:ApoAI*$^{-}$
pET28a_MBP_K_CYP72A1_ApoAI*	P46	6.1.9	pET-28a(+) :: *malE:cyp72A1*$^{-}$ *:ApoAI*$^{-}$
pET28a_MBP_D9_CYP72A1_ApoAI*	P47	6.1.9	pET-28a(+) :: *malE:cyp72A1*$^{-}$ *:ApoAI*$^{-}$

5.4.2 Primer

Tabelle 5.9 – Auflistung verwendeter Primer.

Bezeichnung	Nr.	Sequenz
FWpCDFDuet1_NdeI_ PmeI_GST_CPR	#1	GGAATTCCATATGTTTAAACGGATCCACCAGCAG CGGCAGCGGCAAAAAAG
BWpCDFDuet1_CPR_ XhoI	#2	CCGCTCGAGTTACCACACATCGCGCAGATAACGG

CPRint_FW	#3	GCCTGCATGCGGATAAAG
CPRint_BW	#4	CTTTATCCGCATGCAGGC
FWd25_17A1CYP72A1	#5	TATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATGG CCATCCTCGCGGCGATCTTCGCGCTCGTCGTAGCTA CCGCTACCCGTGTGCTGGATTGGGCCTG
BW72A1Cor	#6	CTCAACCACTTTTTTGCCGCTGCCGCTGCTGGTGGA TCCGCTTTCCAGTTTTTTGTAGATCACATGGCTACC
a_CW128WT	#7	CATGCCATGGAAATGGATATGGATACGATTCGCAAAGCC
b_CW128WTE1A	#8	CATGCCATGGCAATGGATATGGATACGATTCGCAAAGCC
c_CW131_trc	#9	CATGCCATGGCAACCCCGAAACGCATTGAGAAACG
d_CW0131_17A1d5s	#10	CATGCCATGGCACTGCTCCTGGCTGTCTTTCTGACGATTC GCAAAGCCATTGCCG
e_CW12817A1d11s	#11	CATGCCATGGCACTGCTCCTGGCTGTCTTTCTGGCCGCGA CGATTTTCGCGCTGGTTAT
f_CW0131_17A1d16s	#12	CATGCCATGGCACTGCTCCTGGCTGTCTTTCTGGCGCTGG TTATGGCGTGGGCGTGGC
g_CW0131_17A1d21s	#13	CATGCCATGGCACTGCTCCTGGCTGTCTTTCTGTGGGCGT GGCGTGTGCTGGATTGGG
h_CW0131_17A1d26s	#14	CATGCCATGGCACTGCTCCTGGCTGTCTTTCTGCTGGATT GGGCCTGGTTCACCCCGA
i_CW0131_17A1d29s	#15	CATGCCATGGCACTGCTCCTGGCTGTCTTTCTGGCCTGGTT CACCCCGAAACGCATTG
j_ CW12817A1d32s	#16	CATGCCATGGCACTGCTCCTGGCTGTCTTTCTGGGCCTATC ATGCCTCCTACTGCTTTCGCTTTGGACCCCGAAACGCATTG AGAAACGCC
k_CW12817A1d9sG	#17	CATGCCATGGCTCTGCTCCTGGCTGTCTTTCTGGGCGCCAT TGCCGCGACGATTTTCGCGC
n_CW0131_2C3d32s	#18	CATGCCATGGCAAAGAAAACGAGCTCTAAAGGGAAGACC CCGAAACGCATTGAGAAACGCC
p_CW1282C3d32	#19	CATGCCATGGCAAAGAAAACGAGCTCTAAAGGGAAGCTC CCACCTGGCCCGACCCCGAAACGCATTGAGAAACGCC
q_ CW01282C3d41S	#20	CATGCCATGGCAAAGAAAACGAGCTCTAAAGGGAAGCTC CCACCTGGCCCGAGTCTGCGTCAGCAAGGCTTCCGTGGCA
r_CW0131_2C3d50+S	#21	CATGCCATGGCAAAGAAAACGAGCTCTAAAGGGAAGCTC CCACCTGGCCCGAGTCCGTACCGCTTCCTGGTGGGCGATG
t_CW1282C3d29s	#22	CATGCCATGGCACATCATCACCATCACCACGCCATTGCCG CGACGATTTTCGCGCTGGTT
L1_CW0131_52A13	#18	GTACCACTCGCTTTGATTGCTTATAGAGTCCTCGACTACTT CTATACCCCGAAACGCATTGAGAAACGCC
M1_CW0131_52A17	#19	GTGCCAGTGTTGTACATCATCAAACAACTCCTTGCATACAC AAAGACCCCGAAACGCATTGAGAAACGCC

L2_CW0131_52A13	#25	CATGCCATGGCAACTGTACACGATATTATCGCCACATACTT CACCAAATGGTACGTGATAGTACCACTCGCTTTGATTGCTT ATAGAGTCCT
M2_CW0131_52A17	#26	CATGCCATGGCAATTGAACAACTCCTAGAATATTGGTATGT CGTTGTGCCAGTGTTGTACATCATCAAACAACTC
BWCYP72A1	#27	CCCAAGCTTTTAGCTTTCCAGTTTTTTGTAGATCACATGGCT AC
BWCYP72A1_GSTC6H	#28	CCCAAGCTTTTAGTGGTGATGGTGATGATGGGTGCTTCCGC TTTCCAGTTTTTTGTAGATCACATGGCTA
K_C72A1_P9G	#29	AAAACCATGGCTCTGCTCCTGGCTGTCTTTCTGGGCGCCAT TGCCGCGACGATTTTCGCG
BWCYP72A1_28aC6H	#30	CCCAAGCTTGCTTTCCAGTTTTTTGTAGATCACATGGCTA
F_NHi_LAMT_NdeI	#31	GGAATTCCATATGGTGGCGACGATT
B_NHi_LAMT_XhoI	#32	CCGCTCGAGTTAATTGCCTTTGCGT
FWSTRNdeI	#33	GGAATTCCATATGCCGATTCTGAAAGAGATCCTGATTGA
BWSTRHindIII	#34	CCCAAGCTTAGTGGCTGCTCACGAAGCTATTG
QC_HindIIIFW	#35	ATTGTCACGAAGCACACCACATGAAAGCTTCCATACGCTGA AACTGCTGGATA
QC_HindIIIBW	#36	TATCCAGCAGTTTCAGCGTATGGAAGCTTTCATGTGGTGTGC TTCGTGACAAT
WT_FW_SMPx	#37	GCAATTCCATATGGAAATGGATATGGATACGATTCG
K_FW_SMPx	#38	GCAATTCCATATGGCTCTGCTCCTGGCTG
C_FW_SMPx	#39	GGCAATTCCATATGGCAACCCCGAAACGCATTGAGAAACG
D9_FW_SMPx	#40	GCAATTCCATATGGCCATTGCCGCGACGATTTT
72A1__BW_SMPx	#41	CCCAAGCTTTCGCTTTCCAGTTTTTTGTAGATCACATG
SimplexSeq1	#42	ATCTCGACGCTCTCCCTTATG
SimplexSeq2	#43	AAGTCACCGTTGAGCATCC
SimplexSeq3	#44	ACCGATTACTCCATCGCAG
SimplexSeq4	#45	ATTGAGAAACGCCTGCGTC
SimplexSeq5	#46	ACAGGGTAGCCATGAAGTG
SimplexSeq6	#47	ATTCTGTACGAGGTGCTGC
SimplexSeq7	#48	TTCCAGAAGAAGTGGCAGG
SimplexSeq8	#49	ATGTCCGCTTTCTGGTATGC
pET-RP*	#50	CTAGTTATTGCTCAGCGG
T7	#51	TAATACGACTCACTATAGGG
FWC72A224_V1	#52	AAAAACCATGGCACTGCTCCTGGCTGTCATTATCTTCCTG GTGTTCGTGAGCC
FWC72A224_V2	#53	AAAAACCATGGCACTGCTCCTGGCTGTCTTTCTGTTCCTG GTGTTCGTGAGCCTGACCCTG
FWC72A2242C3_V3	#54	AAAAACCATGGCTAAGAAAACGAGCTCTAAAGGCAAGGA CTGGGTGTGGTTCAAACCGAA

FWC72A2242C3_V4	#55	AAAAACCATGGCTAAGAAAACGAGCTCTAAAGGCAAGCC GAAAAAACTGGAGAAATGTCTGC
BWC72A224	#56	TTTTTAAGCTTTTACAGTTTGTGCAGAATCAGATGCGCGCC A
DuetDOWN1	#57	GATTATGCGGCCGTGTACAA
ACYCDuetUP1	#58	GGATCTCGACGCTCTCCCT
DuetUP1	#59	TTGTACACGGCCGCATAATC
T7_Rev	#60	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
o_CW1282C3d29s	#61	CATGCCATGGCAAAGAAAACGAGCTCTAAAGGGAAGGCC TGGTTCACCCCGAAACGCATTG

5.4.3 Stämme

Tabelle 5.10 – Auflistung verwendeter Stämme.

Stamm	Herkunft	Genotyp
E. coli DH5α	Clontech (Heidelberg, Deutschland)	F^- φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(r_K^-, m_K^+) *pho*A *sup*E44 λ^- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1
E. coli BL21(DE3)	Novagen (San Diego, Californien, U.S.A)	F^- *omp*T *hsd*S_B (r_B–, m_B–) *gal dcm* (DE3)
E. coli C41(DE3)[253]	Lucigen (Middleton, Wisconsin, U.S.A)	F^- *ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm* (DE3)
E. coli C43(DE3)[3]	Lucigen (Middleton, Wisconsin, U.S.A)	F^- *ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm* (DE3)

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

6.1.1 Auftrennung, Isolierung und Quantifizierung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese

DNA-Stränge wurden bei der Agarosegelelektrophorese unter Einfluss eines elektrischen Feldes anhand ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurde ein Volumen Agarosegel in TAE-Puffer (0,8 %), mit einer 1 Vol.-% Ethidiumbromidlösung versetzt. Anschließend wurde das Agarosegel in die vorgesehene Elektrophoresekammer (Tabelle 5.6) gegossen und für etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur ausgehärtet. Als Größenreferenz diente ein Komigrationsstandard (GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder), der in eine separate Tasche aufgetragen wurde. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese im Verhältnis vier zu eins mit fünffach DNA-Probenpuffer vermischt. Nach Auffüllen der Elektrophoresekammer mit einfach TAE-Puffer erfolgte die elektrophoretische Trennung der DNA durch Anlegen einer Spannung von 120 Volt über 35 Minuten. Die aufgetrennte DNA wurde durch einen UV-Transilluminator (Tabelle 5.6) visualisiert. DNA-Stränge können selektiv aus einem präparativen Agarosegel gereinigt werden. Dazu wurde das kommerzielle GeneJET Gel-Extraktionskit (Tabelle 5.5) nach Herstellerangaben verwendet. Unter analytischen Bedingungen wurde eine definierte Menge der DNA-Größenreferenz hinzugegeben und als Referenz zur densitometrischen Quantifizierung der aufgetrennten DNA mit Hilfe der Software GeneTools (Syngene, Cambridge, UK) verwendet.

6.1.2 Isolierung plasmidischer DNA mittels alkalischer Lyse

Aus einer Vorkultur von *E. coli* DH5α-Zellen wurde die Plasmid-DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse unter Zuhilfenahme eines kommerziellen Kits Plasmid Miniprep™ Classic (Tabelle 5.5) nach Herstellerangaben isoliert.

6.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction,* PCR) wurde ein Temperaturzyklus mehrfach durchlaufen. Der Temperaturwechsel wurde durch einen Thermocycler (Tabelle 5.6) generiert. In dieser Arbeit wurde die PCR, insofern nicht anders angegeben, wie in Tabelle 6.1 angesetzt und der Temperaturzyklus nach Tabelle 6.2 durchgeführt.

Tabelle 6.1 – Reaktionsansatz einer PCR.

Komponente	Endkonzentration oder Menge
Vorlage-DNA	10-50 ng Plasmid
5x Phusion HF oder GC Puffer	10 µL
Forward- und *Reverse* Primer	Je 10-25 pmol
dNTPs	je 200 µM
DMSO	0-3 Vol.-%
Phusion DNA-Polymerase	0,02 U/µL
ddH_2O	*ad* 50 µL

Tabelle 6.2 – Temperaturzyklus einer PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	# Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	120 s	1
Denaturierung	98 °C	10 s	30-35
Hybridisierung	Tm*+3 °C	30 s	30-35
Elongation	72 °C	30 s je 10^3 bp	30-35
Elongation	72 °C	300	1
Kühlen	16 °C	∞	1

*Tm = geringste Schmelztemperatur beider Primer

6.1.4 Restriktionsverdau von DNA-Strängen mittels Restriktionsendonukleasen

Bei der Restriktion werden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, um einen DNA-Doppelstrang an spezifischen palindromischen Erkennungssequenzen meist selektiv zu spalten. Wenn durch PCR zwei endständige Restriktionsstellen eingeführt wurden, dann wurden – wenn möglich – beide in einem einzelnen Arbeitsgang verdaut. Dabei wurden die Herstellerangaben für den mehrfachen Restriktionsverdau befolgt. Falls im Anschluss eine Ligation durchgeführt werden sollte, wurde die verdaute plasmidische DNA durch Zugabe von 1 U FastAP nach Herstellerangaben dephosphoryliert. Nach Überprüfung des Erfolgs der Restriktion mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde das DNA-Fragment wie beschrieben gereinigt (Kapitel 6.1.1).

6.1.5 Ligation von Nukleinsäuren

Bei der Ligation werden doppelsträngige DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden, durch eine Ligase verknüpft. In Rahmen dieser Arbeit wurde zu diesem Zweck die T4 Ligase verwendet. Dazu wurden 100 ng Vector-DNA und PCR-Fragment in fünffachem molarem Überschuss eingesetzt (Tabelle 6.3).

Tabelle 6.3 – Reaktionsansatz für die Ligation von Vector-DNA und PCR-Fragment.

Komponente	Menge
Linearisierte Vector-DNA	20-100 ng
Insert DNA	fünffacher molarer Überschuss zur Vector-DNA
10X T4-DNA-Ligase-Buffer	2 µL
T4 DNA-Ligase	5 U
ddH_2O	*ad* 20 µL

Der Ligationsansatz wurde für eine Stunde bei 22 °C inkubiert und im Anschluss einer Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 10 Minuten unterzogen. Nach der Ligation wurde das erzeugte Konstrukt wie beschrieben in *E. coli* DH5a Zellen transformiert (Kapitel 6.2.4).

6.1.6 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese mittels PCR wurde nach dem Prinzip der QuikChange®-PCR durchgeführt. Nach einem abgewandelten Protokoll wurden die *Forward*- oder *Reverse*-Primer (Tabelle 6.4) jeweils in getrennten PCR-Reaktionsansätzen vorgelegt und in einem Thermocycler inkubiert (Tabelle 6.5)

Tabelle 6.4 – Reaktionsansatz einer QC-PCR.

Komponente	Endkonzentration oder Gesamtmenge
Vorlage-DNA	10-50 ng Plasmid-DNA
5X Phusion HF Puffer	einfache Pufferkonzentration
Forward-Primer oder *Reverse*-Primer	10 pmol
dNTPs	je 200 µM
DMSO	2 Vol.-%
Phusion DNA-Polymerase	0,02 U/µL
ddH_2O	*ad* 50 µL

Tabelle 6.5 – Temperaturzyklus einer QC-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	#Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1
Denaturierung	98 °C	10 s	5
Primerhybridisierung	Tm*	20 s	5
Elongation	72 °C	30 s je 10^3 bp	5
Zusammenführung	Tm*	Pause	1
Denaturierung	98 °C	10 s	18
Primerhybridisierung	Tm*	20 s	18
Elongation	72 °C	30 s je 10^3 bp	18
Elongation	72 °C	600 s	1
Kühlen	16 °C	∞	

*Tm = Schmelztemperatur des Primers

Nach Hitzeinaktivierung wurden 100 µL chemisch kompetente *E. coli* DH5α-Zellen mit 10 µL QC-PCR-Ansatz transformiert. Die plasmidische DNA stichprobenartig ausgewählter Einzelkolonien wurde aus Übernachtkulturen isoliert und der Erfolg der QC-PCR durch Restriktionsverdau und analytische Agarose-Gelelektrophorese und mittels Sanger-Sequenzierung verifiziert.

6.1.7 Isothermale Verknüpfung von DNA-Fragmenten mittels *Gibson Assembly*®

Als *Gibson Assembly*®[375] wird eine Methode zur Verknüpfung von endständig komplementären DNA-Fragmenten bezeichnet. Der Zielvektor wurde vorbreitet, indem dieser durch eine Restriktionsendonuklease wie beispielsweise *PmeI* linearisiert wurde. Die Vorbereitung der endständig komplementären DNA-Fragmente erfolgte im Vorfeld mittels PCR unter Verwendung überhängender Primer und anschließende Reinigung durch präparative Agarose Gelelektrophorese. Bei der Assemblierungsreaktion wird durch die Aktivität einer 5‘-Exonuklease, einer Polymerase und einer Ligase die Assemblierung von fast beliebig vielen DNA-Fragmenten in einem Reaktionsgefäß ermöglicht. Die Reaktion wurde dazu wie durch Gibson *et al.* 2009 beschrieben durchgeführt. Es wurden 15 µL *Gibson-Assembly*-Mischung und ein Volumen von 5 µL, welches die zusammenzufügende DNA-Fragmente enthält, vorgelegt. Es wurden jeweils 10 bis 100 ng linearisierter Vektor und ein zwei- bis fünffacher molarer Überschuss von PCR-Fragmenten eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei 50 °C für 60 Minuten inkubiert und 10 µL zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen (Kapitel 6.2.4) verwendet.

6.1.8 Sanger Sequenzierung

Die Verifizierung der DNA-Sequenzen erfolgte durch Sanger Sequenzierung, welche durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) durchgeführt wurde. Dabei wurden zur Verifikation von Konstrukten auf pET-Vektoren, die beim Anbieter erhältlichen Standardprimer T7 und pET-RP* oder individuelle Sequenzierungsprimer verwendet (Tabelle 5.9). Zur Auswertung der Sequenzen wurde das Auswertungsprogramm ApE – A plasmid editor (Version 2.0.48 bis 2.0.54, http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/, letzter Zugriff am 16.08.2019) verwendet.

6.1.9 Konstruktion der rekombinanten Plasmide zur Herstellung der *C. roseus* CYP72A1, CYP72A224, LAMT und *R. serpentina* STR in *E. coli*

Mittels PCR wurden zur Erzeugung der verwendeten rekombinanten Plasmide im ersten Schritt lineare DNA-Fragmente von Plasmid-DNA (Tabelle 6.6) amplifiziert, welche das jeweilige Zielgen trägt. Durch Einsatz geeigneter Primer (Tabelle 6.6) wurden PCR-Produkte erzeugt,

welche – wenn nicht anders beschrieben – das Zielgen inklusive der benötigten Restriktionststellen enthielten. Alle PCR-Produkte wurden jeweils aus horizontaler Agarose-Gelelektrophorese isoliert und die DNA-Konzentration ermittelt (Kapitel 6.1.1). Im Folgenden wurde die Restriktionsspaltung (Kapitel 6.1.4) der DNA-Fragmente oder Plasmid-DNA mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen (Tabelle 6.6) durchgeführt. Die Ligation (Kapitel 6.1.5) der DNA-Fragmente und der linearisierten dephosphorylierten Vektoren (pET-28a(+), pCDFDuet-1, pCDFDuet-1_GST_d72CPR, pET28a_MBP_EmrE_ApoA1*_QPCR#2) erfolgte unter Verwendung einer T4-Ligase. Das Ligationsprodukt wurde zur Transformation (Kapitel 6.2.4) von *E. coli DH5α*-Zellen verwendet. Die Plasmid-DNA wurde aus der Übernachtkultur (Kapitel 6.2.2) einer Einzelkolonie isoliert und die Sequenzidentität durch Sanger-Sequenzierung (Kapitel 6.1.8) verifiziert.

Da die für *EcoRI* codierende Sequenz (GAATTC) auf pET28a_MBP_EmrE_ApoAI* auch auf dem CYP72A1-Gen liegt, wurde die Restriktionssschnittstelle durch Insertion von drei Nukleotiden (AGC) mittels ortsgerichteter Mutagenese (Kapitel 6.1.6) in *HindIII* (GAAAGCTTC) umgewandelt. Um pET28a_MBP_EmrE_ApoAI*_QPCR#2 mit der *HindIII* Schnittstelle zu erhalten, wurden bei der PCR die Primer #35 und #36 (Tabelle 5.9) und pET28a_MBP_EmrE_ApoAI* (Tabelle 5.8, P42) als Matrize eingesetzt.

Um das rekombinante Plasmid pCDFDuet1_17A1d25CYP72A1_ GST_d72CPR mit dem Fusionsgen der Gene der CYP72A1 und CPR zu erhalten, wurde ein DNA-Frament mit dem CYP72A1-Gen unter Verwendung der Primer #5 und #6 (Tabelle 5.9) und der Matrize pEX-K4_CYP72A1_optimized amplifiziert. Dieses wurde mittels *Gibson Assembly*® (Kapitel 6.1.7) mit dem linearisierten Plasmid pCDFDuet1_GST_d72CPR (Tabelle 5.8, P34) verknüpft, um zirkuläre DNA zu erhalten.

Tabelle 6.6 – Auflistung zur Konstruktion der rekombinanten Plasmide verwendeteter Plasmid-DNA mit dem Zielgen als Matrize, Primer und Restriktionsendonukleasen.

Rekombinantes Plasmid	Matrize	Primer (PCR)	Restriktions-endonukleasen
pCDFDuet-1_GST_d72CPR	P2	#1, #2	*NdeI, XhoI*
pET28a_A_CYP72A1[b]	P1	#7, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_B_CYP72A1	P1	#8, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_C_CYP72A1	P1	#9, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_D_CYP72A1	P1	#10, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_E_CYP72A1	P1	#11, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_F_CYP72A1	P1	#12, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_G_CYP72A1	P1	#13, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_H_CYP72A1	P1	#14, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_I_CYP72A1	P1	#15, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_J_CYP72A1	P1	#16, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_K_CYP72A1	P1	#17, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_N_CYP72A1	P1	#18, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_O_CYP72A1	P1	#61, #27	*NcoI, HindIII*

pET28a_P_CYP72A1	P1	#19, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_Q_CYP72A1	P1	#20, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_R_CYP72A1	P1	#21, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_T_CYP72A1	P1	#22, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_L_CYP72A1	P1	PCR1: #23, #27	
	PCR1[a]	PCR2: #25, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_M_CYP72A1	P1	PCR1: #24, #27	
	PCR1[a]	PCR2:#26, #27	*NcoI, HindIII*
pET28a_K_CYP72A1_C6His	P1	#17, #28	*NcoI, HindIII*
pET28a_K_CYP72A1_hiC6His	P1	#29, #30	*NcoI, HindIII*
pET28a_N6His_LAMT	P5	#31, #32	*NdeI, XhoI*
pET28a_STR_N6His	P3	#33, #34	*NdeI, HindIII*
pCDFDuet-1_CYP72A224_V1	P4	#52, #56	*NcoI, HindIII*
pCDFDuet-1_CYP72A224_V2	P4	#53, #56	*NcoI, HindIII*
pCDFDuet-1_CYP72A224_V3	P4	#54, #56	*NcoI, HindIII*
pCDFDuet-1_CYP72A224_V4	P4	#55, #56	*NcoI, HindIII*
pET28a_MBP_WT_CYP72A1_ApoAI*	P1	#37, #41	*NdeI, HindIII*
pET28a_MBP_C_CYP72A1_ApoAI*	P1	#39, #41	*NdeI, HindIII*
pET28a_MBP_K_CYP72A1_ApoAI*	P17	#38, #41	*NdeI, HindIII*
pET28a_MBP_D9_CYP72A1_ApoAI*	P1	#40, #41	*NdeI, HindIII*

[a]: gereinigtes Amplifikat aus PCR1 ist Matrize bei PCR2;[b]:WT_CYP72A1; [c]: Ligation mit P43

6.2 Mikrobiologische Methoden

6.2.1 Stammhaltung

Die Lagerung der verwendeten Stämme wurde in Form von Glycerin-Dauerkulturen bei -80 °C oder auf LB-Agarplatten bei 4 °C gewährleistet. Zur Erzeugung von Dauerkulturen wurden 500 µL einer sterilen 50 Vol.-% Glycerin-Lösung mit 500 µL Bakteriensuspension aus Übernachtkulturen in ein steriles Kryo-Gefäß überführt. Eine selektierte Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte oder ein Abstrich aus einer Glycerin-Dauerkultur wurde zur Beimpfung von Anzuchtkulturen verwendet.

6.2.2 Anzuchtkulturen

Anzuchtkulturen oder auch Übernachtkulturen dienen zur Vorbereitung der Kultivierung von *E. coli*-Zellen. Dazu wurden 5 mL LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmedium versetzt und (Tabelle 5.2) aus einer Lagerkultur (Kapitel 6.2.1) angeimpft. Die Zellsuspension wurde über Nacht bei 37 °C und 180 RPM in einem Orbitalschüttler-Inkubator (Tabelle 5.6) inkubiert.

6.2.3 Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine Anzuchtkultur des jeweiligen Stammes erzeugt. Am Folgetag wurden 50 mL LB-Medium in einem sterilen 500 mL Erlenmeyerkolben mit 500 µL Zellsuspension aus der Übernachtkultur inokuliert und bei 37 °C und 180 RPM bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) (siehe Kapitel 6.2.5) von 0,5 inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung für 15 Minuten auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 3200 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 mL TfbI-Lösung resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis gekühlt.

Danach wurde die Suspension bei 3200 xg für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 2 mL TfbII-Lösung resuspendiert. Nach Inkubation für 15 Minuten auf Eis wurden die chemisch kompetenten Zellen aliquotiert und bei -80 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

6.2.4 Transformation mittels Hitzeschock

Die Transformation mittels Hitzeschock dient zur Einbringung von Fremd-DNA in kompetente Bakterienzellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hitzeschock-Transformation verwendet, um plasmidische DNA in chemisch kompetente *E. coli* Zellen einzuschleusen.

Bei der Methode wurden 20 bis 100 ng plasmidischer DNA in sterilen Mikrozentrifugenröhrchen auf Eis vorgelegt. Zur DNA wurden 50 bis 100 µL einer Suspension kompetenter Zellen gegeben. Der Ansatz wurde für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde für etwa 60 Sekunden auf 42 °C erhitzt und eine Minute auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurde 1 mL LB-Medium zur Zellsuspension gegeben und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde für eine Minute bei 2500 RPM zentrifugiert und das Zellpellet in 100 µL LB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde unter Selektionsbedingungen auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6.2.5 Bestimmung der Optischen Dichte bei 600 nm

Über die Bestimmung der Optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) kann die Zellkonzentration von Mikroorganismen in einem Kulturmedium abgeschätzt werden. Um den Wert zu bestimmen wurde ein Einstrahlphotometer (Tabelle 5.6) verwendet. Dazu wurden Proben in Küvetten vorgelegt und vermessen. Zur Berechnung der optische Dichte einer Probe wurde die Differenz des Messwertes der Probe und einer unmittelbar zuvor bestimmten Hintergrundmessung mit sterilem Medium gebildet.

6.2.6 Zellernte

Im Anschluss an eine heterologe Genexpression wurden alle Folgeschritte, insofern möglich, auf Eis durchgeführt. Zur Ernte der *E. coli*-Zellen aus einer Bakterienkultur wurde die Zellsuspension in für das jeweilige Volumen geeignete Gefäße zur Zentrifugation überführt. Die Zellsuspension wurde für 20 Minuten bei 3000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem gleichen Volumen 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) resuspendiert. Die Zentrifugation wurde zur Reinigung wiederholt. Der Überstand wurde entfernt und verworfen.

6.2.7 Zellhomogenisierung und Gewinnung von löslichem Zellextrakt

Das aus der Zellernte erhaltene Pellet wurde gewogen und in 5 mL 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit einem

Proteasehemmer, Phenylmethylsulfonylfluorid (Endkonzentration 0,1 bis 0,5 mM) versetzt. Für Volumina unterhalb von 500 mL (bis 30 mL Zellsuspension) wurden die Zellen mittels Ultraschall Homogenisator (Tabelle 5.6) homogenisiert. Kavitationskräfte bewirken ein Aufbrechen der Zellmembranen. Dazu wurde die Spitze der Sonotrode mittig bis zum unteren Drittel der in Zentrifugenröhrchen befindlichen Zellsuspension eingetaucht. Die Zellen wurden für mindestens drei und maximal fünf Zyklen (1 Zyklus: je 60 s Ultraschall, 40 % Tastgrad, 30-40 % Intensität gefolgt von 30 s Unterbrechung) mit Ultraschall behandelt, bis eine optische Klärung der Probe sichtbar wurde. Die Zellen wurden während des gesamten Vorgangs auf Eis gekühlt. Die Intensität der Ultraschall-Pulse wurde gegebenenfalls zur Reduktion der Schaumbildung angepasst. Für größere Kulturvolumina ab 500 mL Kulturmedium wurde die Zellhomogenisierung mittels Hochdruck-Homogenisator (Tabelle 5.6) durchgeführt. Dabei werden Scherkräfte erzeugt, indem eine Zellsuspension unter Hochdruck durch einen Mikrokanal gepresst wird. Falls das erhaltene Homogenat im Folgeschritt für eine Reinigung mittels IMAC vorgesehen war, wurde das Volumen der Bakteriensuspension vor der Reinigung durch Zugabe von 50 mM Tris-Puffer verdoppelt. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C auf einen Druck von 1200 bar (cytosolisches Zielprotein) oder 1800 bar (membranständiges Zielprotein) komprimiert. Unabhängig vom Verfahren zum Zellaufschluss wurden die erhaltenen Homogenate bei 25000 xg und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Der resultierende Überstand – das Zell-Lysat – wurde entweder aliquotiert und bei -20 °C gelagert oder im Anschluss für weitere Schritte verwendet.

Tabelle 6.7 – Detergenzien.

Detergens	Molare Masse	CMC*	Zugabe je 5 mL**
Fos-Choline-14	379,5 (l)	0,12 mM	0,8 mg
Triton X-100	647 (l)	0,23 mM	1,5 µL
CHAPS	614 (s)	8 mM	90 mg
Igepal CO-520	441 (l)	2,5 mM	13,5 mg
Emulgen 120	362,5 (s)	0,58 mM	1,23 mg

*CMC: kritische Mizellenkonzentration; **3,5-fache CMC

Um den Einfluss von Detergenzien bei der Homogenisierung und Reinigung zu testen, wurde das Zellpellet nach der Zellernte in 5 mL 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) je g Feuchtgewicht resuspendiert. Die Suspension wurde in sechs gleiche Volumina (je 4mL) geteilt. Die Masse an jeweiligem Detergens, die für das Erreichen der dreieinhalbfachen kritischen Mizellenkonzentration (3,5-fach CMC) benötigt wird, wurde jeweils in 1mL 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) vorgelegt (Tabelle 6.7).

Anschließend wurde jeweils eine Präparation der Detergenzien in Tris-Puffer und je ein Volumen Zellsuspension vereinigt. Die Zellsuspensionen mit Detergenzien wurden für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden alle Suspensionen jeweils, wie beschrieben, durch Ultraschall homogenisiert und die lösliche Proteinfraktion von der unlöslichen Fraktion durch Zentrifugation getrennt.

6.2.8 Heterologe Genexpression in *E. coli*

In diesem Abschnitt ist die allgemeine Vorgehensweise bei der heterologen Genexpression beschrieben. Es folgt jeweils eine Beschreibung der spezifischen Expressionsbedingungen zur Herstellung der einzelnen verwendeten Enzyme.

Zur Vorbereitung der Hauptkulturen wurde, ein Volumen TB-Medium in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit mindestens einem fünffachen Fassungsvolumen vorgelegt. Die Kultivierung wurde jeweils unter Selektionsbedingungen durchgeführt (Tabelle 5.2). Das Nährmedium wurde aus einer zuvor erzeugten Anzuchtkultur des jeweiligen *E. coli*-Expressionsstammes, welcher mit dem Expressionsplasmid transformiert worden war, im Verhältnis 1:200 beimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 140 RPM in einem Orbitalschüttler-Inkubator unter kontinuierlicher Überwachung der optischen Dichte bei 600 nm bis zu einem definierten OD_{600}-Wertebereich inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte nach Erreichen der gewünschten Zelldichte durch Zugabe eines Induktors wie Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Gegebenenfalls wurden weitere Nährstoffe zugesetzt, um die Bildung des Zielproteins zu unterstützen. Mit dem Zeitpunkt der Induktion erfolgte üblicherweise eine Reduktion der Inkubationstemperatur und der Rotationsgeschwindigkeit für die Dauer der Inkubationszeit. In diesem Zeitraum erfolgte in regelmäßigen Intervallen eine Entnahme von Proben zur Analyse der Expression und Bestimmung der OD_{600}.

6.2.8.1 CYP72A1-CPR Fusion 17A1d25CYP72A1_ GST_d72CPR

Die heterologe Produktion der mit einer CPR aus *C. roseus* fusionierten CYP72A1 wurde unter Verwendung des Expressionsstammes *E. coli* C43(DE3), ausgehend von pCDFDuet1_17A1CYP72A1_d72CPR (Tabelle 5.8, P35) durchgeführt.

Es wurde eine Hauptkultur mit 400 mL TB-Medium in einem 2,0 L Erlenmeyer-Kolben mit 5 mL Anzuchtkultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 140 RPM in einem Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte, als ein OD_{600}-Wert von 0,6–0,8 erreicht war, durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM), 5-Aminolävulinsäure (5-Ala) (Endkonzentration 1 mM) und Eisen(II)-Sulfat

(Endkonzentration 0,1 mM). Nach der Induktion der Genexpression wurden die Kulturen für 72 Stunden bei 120 RPM und 20 °C in einem Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert.

6.2.8.2 CYP72A1-Varianten mit N-terminalen Modifikationen

Die heterologe Expression zur Untersuchung aller erzeugten Varianten der CYP72A1 (Kapitel 6.1.9) wurde unter Verwendung des Expressionsstammes *E. coli* C43(DE3), ausgehend vom Expressionsplasmid pET-28a(+) (Tabelle 5.8, P7 bis 25) durchgeführt.

Es wurde eine Hauptkultur mit 50 mL TB-Medium in einem 500 mL Erlenmeyer-Kolben mit Anzuchtkultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 120 RPM in einem Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte, als ein OD600-Wert von 0,8–1,0 erreicht war, durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM), 5-Aminolävulinsäure (5-Ala) (Endkonzentration 1 mM) und Eisen(II)-Sulfat (Endkonzentration 0,1 mM). Nach der Induktion der Genexpression wurden die Kulturen für 48 Stunden bei 120 RPM und 20 °C in einem Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert.

6.2.8.3 K_CYP72A1, K_CYP72A1_C6His und K_CYP72A1_hiC6His

Nachdem K_CYP72A1 als beste Variante der CYP72A1 identifiziert worden war, fand die heterologe Produktion der K_CYP72A1 im Weiteren unter optimierten Bedingungen statt. Dazu wurden auf empirischem Wege optimale Expressionsbedingungen für die K_CYP72A1-Variante (Tabelle 5.8, P17) ermittelt. Die heterologe Produktion der Variante K_CYP72A1 und die Varianten mit Hexahistidin-Tag (Tabelle 5.8, P17, P40 und P41) wurde unter Verwendung des Expressionsstammes *E. coli* C43(DE3), ausgehend vom Expressionsplasmid pET-28a(+) (Tabelle 5.7, E1) durchgeführt. Es wurde eine Hauptkultur mit 50 mL TB-Medium in einem 500 mL Erlenmeyer-Kolben mit Anzuchtkultur angeimpft. Zur Erzeugung größerer Mengen Proteins wurde die Anzahl Hauptkulturen erhöht. Die Kulturen wurden bei 30 °C und 160 RPM in einem Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD_{600} von 0,8–1,0 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM), 5-Aminolävulinsäure (5-Ala) (Endkonzentration 1 mM), Thiamin-Lösung (Endkonzentration 0,25 mM) und *Trace elements* Lösung (Endkonzentration einfach). Nach der Induktion der Genexpression wurden die Kulturen für 40 Stunden bei 140 RPM und 20 °C in einem Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert.

6.2.8.4 MBP-CYP72A1-ApoA1*-Fusionen

Die heterologe Produktion der (Kapitel 6.1.9) MBP-CYP72A1-ApoA1*-Fusionen (Tabelle 5.8, P44 bis P47) wurden unter Verwendung des Expressionsstammes *E. coli* C43(DE3), ausgehend vom Expressionsplasmid pET-28a(+) (Tabelle 5.7, E1) durchgeführt.

Es wurde eine Hauptkultur mit 50 mL TB-Medium in einem 0,5 L Erlenmeyer-Kolben mit Anzuchtkultur angeimpft. Die Kulturen wurden unter Selektionsbedingungen bei 37 °C und 140 RPM in einem Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte, als ein OD_{600}-Wert von 0,8–1,0 erreicht war, durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM), 5-Aminolävulinsäure (5-Ala) (Endkonzentration 1 mM), Thiamin (Endkonzentration 0,33 mM) und Eisensulfat (Endkonzentration 0,1 mM). Nach der Induktion der Genexpression wurden die Kulturen für 24 oder 48 Stunden bei 160 RPM und 20 °C in einem Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert.

6.2.8.5 CYP76A26

Die heterologe Produktion Varianten der CYP76A26 (Tabelle 5.8, P27 bis 29) wurde unter Verwendung des Expressionsstammes *E. coli* C43(DE3), ausgehend vom Expressionsplasmid pET-22b(+) (Tabelle 5.7, E2) durchgeführt.

Es wurde eine Hauptkultur mit 100 bis 400 mL TB-Medium in einem 0,5 bis 2,0 L Erlenmeyer-Kolben mit Anzuchtkultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 180 RPM in einem Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte, als ein OD_{600}-Wert von 0,8–1,0 erreicht war, durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM), 5-Aminolävulinsäure (5-Ala) (Endkonzentration 0,6 mM) und und Thiamin-Lösung (Endkonzentration 1 mM). Nach der Induktion der Genexpression wurden die Kulturen für 40 Stunden bei 140 RPM und 20 °C in einem Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert.

6.2.8.6 CYP72A224

Die heterologe Produktion der erzeugten (Kapitel 6.1.9) Varianten der CYP72A224 (Tabelle 5.8, P30 bis 33) wurde unter Verwendung des Expressionsstammes *E. coli* C43(DE3), ausgehend vom Expressionsplasmid pCDFDuet-1 (Tabelle 5.7, E5) durchgeführt.

Es wurde eine Hauptkultur mit 50 mL TB-Medium in einem 0,5 L Erlenmeyer-Kolben mit Anzuchtkultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 180 RPM in einem Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte, als ein OD_{600}-Wert von 0,6–0,8 erreicht war, durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM), 5-Aminolävulinsäure (5-Ala) (Endkonzentration 1 mM), Thiamin-Lösung (Endkonzentration 1 mM) und *Trace elements* Lösung (Endkonzentration einfach). Nach der Induktion der Genexpression wurden die Kulturen für 40 Stunden bei 160 RPM und 20 °C in einem Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert.

6.2.8.7 LAMT und STR

Die heterologe Produktion von LAMT (Tabelle 5.8, ausgehend von Expressionsplasmid P37) und STR (Tabelle 5.8, Expressionsplasmid P36) wurde jeweils unter identischen Expressionsbedingungen durchgeführt.

Es wurde eine Hauptkultur mit 500 mL TB-Medium in einem 2,0 L Erlenmeyer-Kolben mit Anzuchtkultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 160 RPM in einem Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte, als ein OD_{600}-Wert von 0,6-0,8 erreicht war, durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM). Nach der Induktion der Genexpression wurden die Kulturen über Nacht bei 160 RPM und 24 °C in einem Orbitalschüttler-Inkubator inkubiert.

6.2.8.8 YkuN, FpR, ATR2 und YR-P5

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme FpR und YkuN[327] (Tabelle 5.8, ausgehend von Expressionsplasmid P38 und P39) sowie ATR2[329] (Tabelle 5.8, ausgehend von Expressionsplasmid P26) wurden wie in den genannten Publikationen beschrieben, hergestellt und über IMAC (Kapitel 6.3.4) gereinigt. Die Bestimmung der Enzymkonzentrationen erfolgte photometrisch. Präparationen von YR-P5 wurden von Dr. P. Bakkes erhalten.[330]

6.3 Proteinbiochemische Methoden

6.3.1 Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration.

Proteine werden durch den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 gebunden und dadurch wird das Absorptionsmaximum des gebundenen Farbstoffs von 465 zu 595 nm verschoben. Diese zur Proteinkonzentration proportionale Absorptionsänderung bei 595 nm kann dazu ausgenutzt werden, um die Gesamtproteinkonzentration einer Probe zu bestimmen.[376]

Es wurde eine Standardverdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) (0-100 µg/mL BSA) in ddH_2O hergestellt. Ein Volumen der zu analysierenden Probe wurde in ddH_2O so verdünnt, dass die Konzentration etwa im Bereich von 0 bis 100 µg/mL Protein lag. Nach Herstellerprotokoll wurden 50 µL der Probe und die Kalibrierlösungen in jeweils mehrfacher Ausführung in unterschiedlichen Kavitäten einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurden 200 µL Roti® -Quant (1x) zugegeben und die Probe fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät (Tabelle 5.6) bestimmt. Die Proteinkonzentration der Probe wurde anhand der gemessenen Kalibriergerade ermittelt.

6.3.2 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) erlaubt eine Analyse der Proteinzusammensetzung einer Probe.[377] Die Methode bewirkt die größenmäßige Auftrennung von Peptiden entlang eines elektrischen Feldes. Als Matrix wurde ein SDS-Polyacrylamidgel, bestehend aus einem Trenngel (12,5 %) und Sammelgel (4 %), verwendet (Kapitel 5.1). Bei der Methode wurde jeweils eine definierte Gesamtmenge Protein je Probe analysiert. Bei Analyse von Zellhomogenaten oder Fraktionen aus Zellhomogenaten wurde der Proteingehalt durch Bradford-Test ermittelt (Kapitel 6.3.1). Auf Basis der ermittelten Proteinkonzentration wurde die Konzentration so verdünnt, dass nach Zugabe von 10 µL fünffacher Probenpuffer (SDS-PAGE) eine Endkonzentration von 1 µg/µL in einem Volumen von 50 µL erreicht wurde. Bei Zellsuspensionen wurde die Proteinkonzentration über den OD_{600}-Wert abgeschätzt. Eine Proteinkonzentration von 1 µg/µL Protein wurde in guter Näherung erreicht, indem 1 mL einer Zellsuspension mit einer OD_{600} = 0,25 zentrifugiert (3500 xg für 2 Minuten) und das Pellet in 50 µL einfach Probenpuffer (SDS-PAGE) resuspendiert wurde. Die Proben in SDS-Probenpuffer wurden für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Taschen im Sammelgel wurden mit jeweils 10 µL Probe beladen. Zum Größenvergleich wurde ein Komigrationsstandard (PageRuler™ *Unstained Protein Ladder* bei SDS-PAGE; PageRuler™ *Prestained Protein Ladder* bei Western-Blot) aufgetragen. Das Polyacrylamid Gel wurde in einer Elektrophoresekammer (Tabelle 5.6) vollständig in Elektrophoresepuffer getaucht und ein elektrisches Feld angelegt. Die Feldstärke wurde so eingestellt, dass jeweils für 25 Minuten eine elektrische Stromstärke von 15 mA und folgend für 45-60 Minuten eine Stromstärke von 25 mA erreicht wurden. Anschließend wurde das SDS-Polyacrylamidgel etwa eine Stunde mit Färbelösung und danach mit Entfärbelösung inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar waren. Wenn im Anschluss ein Western-Blot durchgeführt werden soll, wurde die SDS-PAGE in zweifacher Ausführung durchgeführt und nur eines der Duplikate mit Färbelösung behandelt.

6.3.3 Western Blot und Immunodetektion

Bei einem Western-Blot werden die während der SDS-PAGE nach Größe aufgetrennten Proteine – hier im Semi-Dry-Verfahren – aus der Polyacrylamid-Matrix auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (geblottet). Die auf der Membranoberfläche fixierten Proteine können selektiv von entsprechenden Antikörpern gebunden werden. Die *in situ* Visualisierung des Zielproteins erfolgt durch Farb- oder Chemolumineszenzreaktion. Zur Vorbereitung der Western Blot-Kammer (Tabelle 5.6) wurden zehn Blätter 0,34 mm Whatman-Filterpapier (Whatman, Buckinghamshire, UK) auf die Größe des zu blottenden

SDS-Polyacrylamidgels zurechtgeschnitten. Anschließend wurden die Filterpapier-Zuschnitte, das ungefärbte SDS-Polyacrylamidgel und ein Zuschnitt aus Nitrocellulose Membran (Roti®-NC 0,2µM, Carl Roth GmbH & co. KG Karlsruhe, Deutschland) fünf Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Fünf Zuschnitte wurden auf der Kathode der Western Blot-Kammer gestapelt. Auf diese wurde die Nitrozellulosemembran, das SDS-Polyacrylamidgel und zuletzt die verbleibenden Filterpapierzuschnitte platziert. Nach dem Schließen der Western-Blot-Kammer wurden die Proteine durch Anlegen einer Spannung auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Die Spannung wurde dafür so gewählt, dass ein Stromfluss von 2 mA pro cm^2 für 30 Minuten erreicht wurde. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran für eine Stunde in Blockier-Puffer inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Membran für 90 Minuten in Antikörper-Lösung inkubiert. Daraufhin folgten drei Waschschritte für jeweils fünf Minuten in TBST-Puffer. Das auf der Nitrozellulosemembran gebundene Zielprotein wurde durch Auftragen von 2 mL BM Blue POD-Substrat visualisiert.

6.3.4 Reinigung von Proteinen

Bei der Reinigung mittels *Immobilized Metal Affinity Chromatography* wird ein Protein selektiv aus einer wässrigen Lösung extrahiert. Dazu wird das Protein durch Wechselwirkung des Affinitätsmarkers (hier Hexahistidin-Tag) mit dem Säulenmaterial (hier Nickel-NTA Agarose) immobilisiert und beispielsweise von Verunreinigungen getrennt.

Für die Reinigung wurde das *E. coli* Zell-Pellet in 5 mL IMAC-Puffer A pro g Zellpellet resuspendiert und homogenisiert. In Vorbereitung der Reinigung wurden die löslichen und unlöslichen Bestandteile des Zellextrakts durch Zentrifugation bei 20000 xg für 45–60 Minuten getrennt. Der Überstand der Zentrifugation wurde dekantiert und durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,45 µM) filtriert. In Vorbereitung der Reinigung der ATR2 wurde das filtrierte Lysat jeweils mit 1 µL pro mL einer 10 mM FAD- und FMN-Lösung versetzt und für 45 Minuten auf Eis inkubiert.

Durch Mischen von IMAC-Puffer A und IMAC-Puffer B wurden Lösungen erzeugt, die Imidazol-Konzentrationen von 20 mM, 50 mM und 200 mM zum Waschen und zur Elution enthalten. Alle im Folgenden verwendeten und erzeugten Lösungen wurden vor und während der Reinigung auf Eis gekühlt. Eine Polypropylen-Säule mit Fritte (Protino® Columns 14 mL) wurde mit 2,5 bis 3,5 mL Protino® Ni-NTA-Agarose-*Slurry* beladen. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit 3–5 Säulenvolumen IMAC-Puffer A gespült. Zur Bindung des Proteins wurde die filtrierte Proteinlösung auf die Säule aufgetragen. Der Säulendurchfluss wurde aufgefangen und der Vorgang wiederholt. Zum Herausspülen von Verunreinigungen wurde die Säule mit je 3–5 Säulenvolumen der zuvor Hergestellten Lösungen mit 20 mM Imidazol und

50 mM Imidazol durchspült. Bei der Reinigung der ATR2 wurde nur ein einzelner Waschschritt mit 10 mM Imidazol durchgeführt. Zur Elution des Zielproteins wurden 7,5 mL IMAC-Puffer A in einem 50 mL *Falcon-Tube* vorgelegt. Das Protein wurde durch Zugabe von 7,5 mL der Lösung mit 200 mM Imidazol (150 mM für Reinigungen von P450) eluiert. Das Volumen des Eluats wurde mit Hilfe einer Ultrazentrifugationseinheit (Vivaspin® Turbo 15, Ausschlussgröße je nach Zielprotein 10-50 MWCO) bei 3000 xg und 4 °C auf 1 mL reduziert. Die konzentrierte Lösung wurde mittels Entsalzungssäule (PD Miditrap G25, Tabelle 5.5) nach Herstellerangaben durch Größenausschlusschromatographie entsalzt und mit Lagerpuffer eluiert. Das gereinigte Protein wurde aliquotiert und in 1,5 mL Zentrifugenröhrchen bei -20 °C gelagert.

6.3.5 Reinigung von Proteinen im *Batch*-Verfahren

Ein Ni-NTA Slurry mit einem Volumen von 1,5 mL wurde äquilibriert, indem er in einem 2 mL Zentrifugenröhrchen zunächst mit 1mL ddH_2O und anschließend zwei Mal mit je 1 mL 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) gewaschen wurde. Dazu wurde die Suspension jeweils 30 s bei 3000 xg zentrifugiert und der Überstand durch Pipettieren entfernt. Es wurde eine Suspension der *Beads* in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) erzeugt, in gleiche Volumina aufgeteilt und jeweils in 1,5 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Entfernen des Puffers durch Zentrifugation und Pipettieren wurden jeweils 750 µL Lysat aus Zellen einer Expression K_CYP72A1_C6His in *E. coli* C43(DE3), die vor der Homogenisierung mit Detergenzien behandelt wurden, in die vorbereiteten Zentrifugenröhrchen mit Ni-NTA-*Beads* gegeben. Es wurden Suspensionen erzeugt und für eine Stunde bei Raumtemperatur bei 300 RPM in einem Termomixer inkubiert. Die Suspensionen wurden jeweils 30 s bei 3000 xg zentrifugiert und jeweils der Überstand durch Pipettieren in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurden 250 µL 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) mit 500 mM Imidazol zugegeben und das Eluat durch Zentrifugation bei 3000 xg und Pipettieren in ein 1,5 mL Zentrifugenröhrchen gewonnen. Die Proben der Expression, die Lysate, der Durchfluss und die Eluate wurden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

6.3.6 Konzentrationsbestimmung von LAMT und STR

Die Konzentration der Stammlösung gereinigter LAMT oder STR wurde densitometrisch bestimmt. Die Gesamtproteinkonzentration der Proteinlösung wurde im ersten Schritt per Bradford Test ermittelt und dann eine SDS-PAGE-Analyse einer bekannten Proteinmenge durchgeführt. Mit Hilfe des Programms zur Bildanalyse, Image J[378], wurden die Signalintensitäten aller Proteinbanden auf einer Bahn dem SDS-Polyacrylamidgel (12,5%)

bestimmt. Die Konzentration des Zielproteins wurde über das Verhältnis der Bandenintensität des Zielproteins und der Gesamtintensität aller Banden berechnet.

6.3.7 Konzentrationsbestimmung von Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Die Konzentrationsbestimmung von P450-haltigen Lösungen wurde mit Hilfe von CO-Differenzspektren durchgeführt.[187,322] Bei dieser Methode werden die Absorptionseigenschaften einer Probe gegen eine Referenz mit einem Zweistrahlphotometer (Tabelle 5.6) analysiert.

Ausgehend von einer verdünnten P450-haltigen Lösung wurden jeweils identische Volumen von 950 µL in zwei Küvetten überführt (Probe und Referenz). Im Anschluss wurde die Probe mit Kohlenmonoxid begast und mittels Zweistrahlphotometer ein Nullabgleich von Probe und Referenz durchgeführt. Zu jeder Küvette wurden zur Reduktion des Häm-Eisens 50 µL einer Natriumdithionit-Lösung (Endkonzentration 50 mM) zugegeben. Es wurden zeitnah mindestens fünf aufeinanderfolgende Differenzspektren im Wellenlängenbereich von 400 bis 500 nm aufgenommen.

Für den Fall, dass während einer Umsetzung der P450-Gehalt im Reaktionsansatz bestimmt werden sollte, wurden die beschriebenen Schritte in einem reduzierten Volumen von 200 µL in geeigneten Küvetten (UV-Küvetten, Kat. Nr. 7592 10, BRAND GmbH, Wertheim, Deutschland) durchgeführt. In diesem Fall wurden zur Messung 150 µL 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5), 40 µL Probe und Referenz und je 10 µL 1M NaS_2O_4 vorgelegt.

Die Konzentration P450-Konzentration [P450] wurde jeweils mit Hilfe der aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz abgeleiteten Formel (1) errechnet.

Die Konzentration inaktiver P450 (K420) wurde unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten bei 420 nm[379,380] nach Formel (2) berechnet.

$$[P450] = \frac{\Delta A_{450nm-490nm} \cdot \nu}{\varepsilon_{450} \cdot d} \quad (1)$$

$$[P450] = \frac{\Delta A_{420nm-490nm} \cdot \nu}{\varepsilon_{420} \cdot d} \quad (2)$$

$\Delta A_{450nm-490nm}$	Absorptionsdifferenz zwischen 450 und 490 nm
$\Delta A_{420nm-490nm}$	Absorptionsdifferenz zwischen 420 und 490 nm
ν	Verdünnungsfaktor
d	Schicktdicke der Küvette (hier 1 cm)
ε_{450}	Extinktionskoeffizient (ε_{450} = 91cm^{-1}*mM^{-1})
ε_{420}	Extinktionskoeffizient (ε_{420} = 175,6 cm^{-1}*mM^{-1})

6.3.8 Konzentrationsbestimmung von ATR2, YkuN und FpR

Die Konzentration der flavinhaltigen RP wurden spektralphotometrisch anhand publizierter Exktinktionskoeffizienten bestimmt (Tabelle 6.8).

Tabelle 6.8 – Extinktionskoeffizienten

Protein	Extinktionskoeffizient	Referenz
FpR	ε_{456nm} = 7,1 $mM^{-1}cm^{-1}$	[381]
YkuN	ε_{461nm} = 10 $mM^{-1}cm^{-1}$	[382,383]
ATR2	ε_{453nm} = 13,7 $mM^{-1}cm^{-1}$	[329]
	ε_{381nm} = 12,6 $mM^{-1}cm^{-1}$	
YR-P5	ε_{456nm} = 16,9 $mM^{-1}cm^{-1}$	[330]

6.3.9 Einfluss der Ammoniumsulfat-Konzentration auf die Löslichkeit der K_CYP72A1

Um die optimale Sättigungskonzentration zur Fällung der K_CYP72A1 mit Ammoniumsulfat- zu bestimmen, wurde zu einem Volumen von 1 mL Lysat einer Expression schrittweise Ammoniumsulfat zugegeben (Tabelle 6.9) (20 %, 40 %, 60 %, 80 %, bezogen auf die Sättigungskonzentration).

Tabelle 6.9 - Ammoniumsulfat Fällung.
Masse Ammoniumsulfat zur Erhöhung der Ammoniumsulfat-Konzentration bezogen auf 100 % Sättigungskonzentration.

Ammoniumsulfat Anteil	Zugabe $(NH_4)_2SO_4$	Ausgangsvolumen	Endvolumen
Von 0 % auf 20 %	0,11 g	1000 µL	1060 µL
Von 20 % auf 40 %	0,12 g	1060 µL	1120 µL
Von 40 % auf 60 %	0,14 g	1120 µL	1190 µL
Von 60 % auf 80 %	0,16 g	1190 µL	1270 µL

Nach jeder Erhöhung der Konzentration wurde die Probe für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend der gebildete Niederschlag durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 20000 xg getrennt. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment durch Zugabe von 200 µL 50 mM Tris-Puffer (pH=7,5 bei 4 °C) gelöst. Der Proteingehalt der Lösungen wurde mittels Bradford-Test quantifiziert.

6.4 Analytische Methoden

6.4.1 Derivatisierung von Secologanin mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

Eine Derivatisierung von Secologanin mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (2,4-DNPH) bewirkt eine Verbesserung der Extrahierbarkeit aus wässrigen Medien und des Trennverhaltens. Es wurde der pH-Wert jeder Probe mittels Zugabe von 25 µL 5x Natriumacetat Puffer je 100 µL Probenvolumen auf einen pH-Wert von 3,7 eingestellt. Anschließend wurden 5 µL

FSME-Lösung und 25 µL DNPH-Lösung zugegeben. Die Proben wurden für zwei Stunden bei 40 °C und 300 RPM in einem Thermomixer inkubiert.

6.4.2 Festphasenextraktion mit StageTips

Diese Methode der Probenpräparation bietet im Vergleich zur alternativ verwendeten Gefriertrocknung dann Vorteile, wenn eine große Anzahl von Proben vorliegt. Mit den verfügbaren Materialien können die hydrophilen Analyten Loganinsäure und Loganin nicht extrahiert werden.

Zur Festphasenextraktion von Proben mittels StageTips wurden Pipettenspitzen mit 5 Scheiben C18 Material, das aus aus 3M™ Empore™ C18 Extraktionsscheiben (Katalog-Nr. 66883-U, 3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) ausgestanzt wurde, beladen.[384,385] Das Ausstanzen des Extraktions-Materials und das Beladen der Pipettenspitzen wurde mit einer Vorrichtung erreicht, die aus einer geschärften Hamilton™ Kanüle (Katalog-Nr. 90516, Hamilton, Nevada, U.S.A.), einem Draht (Ø = 1mm, Länge ca. 10 bis 12 cm), einer 5 mL Einmalspritze mit Luer-Lock Anschluss (Katalog-Nr. 309649, Becton Dickinson, New Jersey, U.S.A.) sowie einer Metallfeder (Außendurchmesser 0,9 cm, Länge 4 cm) zusammengesetzt war. Die Extraktionsschritte zur Probenvorbereitung wurden mit Hilfe einer Zentrifuge und 2 mL Mikrozentrifugenröhrchen durchgeführt, in denen jeweils der Durchfluss gesammelt wurde. Zur Vorbereitung der StageTips wurden diese mit 100 µL Methanol (LC/MS Qualität) und anschließend 100 µL Probenpuffer gewaschen, indem mit 5200 xg zentrifugiert wurde.

Zur Extraktion der Probe, zum Spülen und zur Elution wurde bei 6200–6500 xg zentrifugiert. Vor dem Beladen der StageTips wurden die zu extrahierenden Proben für fünf Minuten bei 20000 xg zentrifugiert und 100 µL des Überstandes mittels StageTips extrahiert. Nach der Extraktion wurde mit 100 µL 25 % Methanol in Wasser (jeweils LC/MS-Qualität) gewaschen und mit 65 µL Methanol eluiert. Das Eluat wurde mittels LC/MS analysiert (Kapitel 6.4.4).

6.4.3 Probenvorbereitung durch Gefriertrocknung

Bei der Probenvorbereitung mittels Gefriertrocknung wurden die wässrigen Proben bis zur Trockene eingeeingt und die Analyten in Methanol gelöst. Diese Methode ist dazu geeignet, salzhaltige Proben hydrophiler Substanzen wie hier Loganinsäure und Loganin auf die Analyse mittels LC/MS vorzubereiten.

Die Proben wurden nach der Derivatisierung für fünf Minuten bei 20000 xg zentrifugiert und 100 µL des Überstandes in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei -20 °C gefroren und am Folgetag mit Hilfe einer Lyphille (Tabelle 5.6) gefriergetrocknet. Die Analyten wurden durch Zugabe von 100 µL Methanol (LC/MS-Qualität)

und Schütteln gelöst. Die Proben wurden zehn Minuten bei 20000 xg zentrifugiert und 65 µL des Überstandes per LC/MS analysiert.

6.4.4 LC/MS-Analyse

Die Probenanalyse wurde auf einer LC/MS-2020 (Shimadzu, Duisburg, Germany) mit einer Chromolith® Performance RP-18e Säule (100 × 4.6 mm, Merck, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Alle Lösungsmittel wurden in LC/MS-Qualität eingesetzt. Zur Trennung der Analyten wurde ein Gradient von Methanol in Wasser mit 0.1 % Ameisensäure mit einer Flussrate 0.5 mL/min angewendet. Die Säulentemperatur betrug 30 °C. Der Methanol-Anteil wurde in zwei Stufen, von anfänglich 5 % auf 30 % über 6 Minuten, und von 30 % auf 95 % über 11,2 Minuten, erhöht. Im nächsten Schritt folgte eine isokratische Elution mit 95 % Methanol für 3 Minuten. Zur Reäquilibrierung der Säule wurde nach jeder Analyse für 6 Minuten bei 5 % Methanol gespült. Die Ionisierung erfolgte im dualen Ionisierungsmodus (DUIS) nach dem Prinzip der *Elektrospray*-Ionisierung (ESI) und chemischer Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI). Die Flussrate des Zerstäubergases betrug 1,5 L/min und die des Trocknungsgases 15 L/min. Die Heizblocktemperatur der ESI-Quelle betrug 400 °C und die Temperatur der *desolvation line* 250 °C. Die *Interface*-Spannung betrug 4,5 kV bei einer Temperatur von 300 °C. Sowohl im positiven als auch im negativen Scan-Modus wurden Teilchen mit einem Masse-zu-Ladungs Verhältnis von 160 bis 700 m/z detektiert.

6.4.5 Quantifizierung von Loganinsäure, Secologanin, Loganin und Strictosidin

Zur Quantifizierung der Analyten Loganinsäure, Loganin und Secologanin wurden Referenzsubstanzen in einem bekannten Konzentrationsbereich von 0 bis 600 µM vorgelegt. Da Secologanin von STR unter den beschriebenen Bedingungen (Abbildung 2.32) quantitativ umgesetzt wird, wurden die Lösungen für die Quantifizierung von Strictosidin aus einer Umsetzung von Secologanin durch STR durchgeführt. Dazu wurden 0 bis 300 µM Secologanin und 1 mM Tryptamin vorgelegt und durch STR in Strictosidin umgewandelt. Für alle Proben wurden Kalibrierungen für die beschriebenen Prozeduren zur Probenvorbereitung durchgeführt und die Proben per LC/MS analysiert. Die Kalibrierung wurde durchgeführt, indem die Quotienten der Peakfläche der jeweiligen Analyten und der Peakfläche des internen Standards im *Selected ion monitoring* Modus (SIM(+), siehe Tabelle Tabelle 6.10) mit der eingesetzten Konzentration korreliert wurden. Es ergab sich jeweils ein linearer Zusammenhang zwischen den ermittelten Quotienten und der eingesetzten Analytkonzentration. Über diesen Zusammenhang wurden die Konzentrationen der Analyten, beispielsweise nach Umsetzungen, bestimmt.

Tabelle 6.10 – typische Parameter einer Kalibrierung.
Die Tabelle zeigt repräsentative Werte einer Kalibrierung der Analyten und die resultierenden R^2-Werte

Substanz	SIM(+)-Addukte und m/z		R^2-Wert der Kalibriergeraden
Loganinsäure	$[M+NH_4]^+$; m/z = 394	$[M+Na]^+$; m/z = 399	0,996
Loganin	$[M+NH_4]^+$; m/z = 308	$[M+Na]^+$; m/z = 413	0,996
Secologanin-DNPH	$[M+Na]^+$; m/z = 591		0,995
Strictosidin	$[M+H]^+$; m/z = 531		0,989

6.5 *In vitro* Umsetzungen

Im folgenden Kapitel wird die Durchführung der biokatalytischen Transformationen beschrieben. Zur Regeneration der Reduktionsäquivalente wird Glucose-Dehydrogenase in Form von Lysat verwendet. Ebenso wurde K_CYP72A1 in Form von *E. coli* -Lysat eingesetzt. Die Enzyme ATR2, YkuN, FpR, LAMT und STR wurden jeweils in gereinigter Form verwendet. Es wurden jeweils Negativkontrollen mitgeführt, deren Daten teilweise aus illustrativen Gründen nicht abgebildet sind. Die Negativkontrollen wurden unter identischer Behandlung und Zusammensetzung angesetzt, wobei die Biokatalysatoren durch identische Volumina Leervektor-Lysat oder Puffer ersetzt wurden.

6.5.1 Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1

Alle Reaktionen wurden in 2 mL Reaktionsgefäßen in einem Reaktionsvolumen von 100 µL angesetzt. Insofern nicht anders beschrieben wurde 50 mM Tris-Puffer mit pH 7,5 (bei 4 °C) als Puffer verwendet. Wenn keine abweichenden Angaben vorhanden sind, wurden Substanzen und Proteine üblicherweise in Endkonzentrationen von 250 µM Loganin, 1 mM NADPH, 10 mM Glucose, 2 U GDH, 1 µM K_CYP72A1, 10 µM YkuN und 10 µM FpR vorgelegt. Die Reaktionen wurden, insofern nicht anders beschrieben, für 20 Stunden bei 25 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch zeitgleiche Zugabe von Natriumacetat-Puffer gestoppt und durch 2,4-DNPH derivatisiert (Kapitel 6.4.1). Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Proben gefriergetrocknet (Kapitel 6.4.3) und die Konzentration der Analyten per LC/MS-Analyse quantifiziert (Kapitel 6.4.5). Alle Abweichungen von diesem Standardprotokoll sind im Folgenden aufgeführt.

Zur Rekonstitution der Aktivität der K_CYP72A1 (Kapitel 2.2.1) wurden Umsetzungen von 500 µM Loganin durch jeweils 1 µM, 4µM und 10 µM ATR2, YR-P5 und FpR & YkuN durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden für 2 Stunden oder 20 Stunden inkubiert. Die Präparation der Proben für die anschließende LC/MS-Analyse erfolgte durch Extraktion mit

StageTips. Die Evaluation der Reaktionen erfolgte über die aus den LC/MS Chromatogrammen ermittelten Integrale der Secologanin-DNPH Signalflächen (m/z=591) im SIM(+)-Modus. Alle Werte sind jeweils auf (10):10:1 ATR2 nach 2h normiert.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs der Absorptionsdifferenz in CO-Differenzsprektren und der katalytischen Aktivität der K_CYP72A1 (Kapitel 2.2.3) wurden 500 µM Loganin und 10 µM ATR2 eingesetzt. Die Reaktionen wurden für über einen Zeitraum von 2 Stunden bei 25°C inkubiert und mit StageTips extrahiert.

Für die Untersuchung der Stabilität der K_CYP72A1 während einer Umsetzung (Kapitel 2.2.6) von 300 µM Loganin wurden als Referenzproben Ansätze unter identischen Bedingungen mitgeführt, die 1µM K_CYP72A1 in 50 mM Tris-Puffer enthielten. Die Reaktionen wurden über einen Zeitraum von 0 bis 1200 Minuten bei 25 °C inkubiert. Für die Aufnahme der CO-Differenzspektren wurden die Reaktionen nach Ablauf der gewünschten Zeit auf Eis gekühlt und der K_CYP72A1-Gehalt nach der Methode in einem reduzierten Probenvolumen sofort bestimmt. Die dargestellten Werte für Secologanin und Loganin sind aus Illustrationsgründen normierte Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten.

Für die Untersuchung des pH-Wert-Einflusses auf die Umsetzung von Loganin (Kapitel 2.2.7) wurde der pH-Wert durch Zugabe von 50 µL 0,2 M Phosphatpuffer (Tabelle 5.1) (Endkonzentration von 100 mM) auf pH-Werte von 6 bis pH 8 angepasst. Die Vergleichsreaktion wurde wie üblich mit 50 µL 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5 bei 4 °C) auf das Reaktionsvolumen von 100 µL aufgefüllt. Alle pH-Werte der Reaktionsansätze wurden nach Zugabe des Phosphatpuffers durch Auftragen von 2 µL der Reaktionslösung auf Indikatorpapier kontrolliert.

Zur Bestimmung kinetischer Parameter der K_CYP72A1 (Kapitel 2.2.9) wurden Reaktionen mit 0 bis 1000 µM Loganin, 1 mM NADPH, 10 mM Glucose, 2U GDH, 1 µM K_CYP72A1 und jeweils 20 µM FpR und 10 µM YkuN angesetzt. Alle Reaktionen wurden gleichzeitig gestartet und für 45 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Reaktionsdauer wurde möglichst sekundengenau dokumentiert. Nach der Quantifizierung der Produktbildung mittels LC/MS-Analyse wurde die Produktbildungsgeschwindigkeit aus dem Quotienten der Produktkonzentration und der Reaktionszeit in Sekunden errechnet. Um die kinetischen Parameter zu ermitteln, wurde Produktbildungsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration aufgetragen und die Daten mittels nichtlinearer Regression basierend auf der Michaelis-Menten-Gleichung Formel (3) ausgewertet. Für die nichtlineare Regression und die Bestimmung der kinetischen Parameter wurde das Programm Prism (GraphPad Software, San Diego, Californien, U.S.A., Version 5.00) verwendet.

$$v = \frac{v_{max} * [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
[S]	Substratkonzentration
v	Produktbildungsgeschwindigkeit

Zur Ermittlung der Kopplungseffizienz der K_CYP72A1 und unterschiedlichen Redoxpartnern (Kapitel 2.2.10) wurde die gebildete Secologanin Stoffmenge bei Verbrauch einer bekannten NADPH-Stoffmenge bestimmt. Bei der Umsetzung Loganin durch K_CYP72A1 wurde dazu eine bekannte Menge NADPH eingesetzt. Alle Umsetzungen wurden in einem Reaktionsvolumen von 100 µL in 96-Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Es wurden 250 µM Loganin, 1000 µM NADPH, 1 µM K_CYP72A1 jeweils entweder 0 bis 40 µM FpR und YkuN oder 10 µM ATR2 oder 10 µM YR-P5 ohne Kofaktor-Regeneration vorgelegt. Der NADPH-Verbrauch während der Umsetzung wurde durch ein Mikrotiterplatten-Lesegerät (Tabelle 5.6) verfolgt, indem jeweils in 10 s Abständen die Absorption bei 340 nm ermittelt wurde. Die NADPH-Verbrauchsgeschwindigkeit wurde in einem linearen Bereich des Graphen der NADPH-Absorption ermittelt. Der Endpunkt der Reaktion wurde als der Zeitpunkt festgelegt, ab dem mindestens fünf Minuten keine Absorptionsänderung bei 340 nm detektiert werden konnte. Die Kopplungseffizienz wurde aus dem Quotienten der eingesetzten NADPH-Stoffmenge und der mittels LC/MS-Analyse quantifizierten Stoffmenge Secologanin-DNPH errechnet. NADPH-Konzentrationen zur Berechnung der Anfangskonzentration und der Verbrauchsgeschwindigkeit wurden spektralphotometrisch unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten (ε_{340} = 6,22 $cm^{-1}*mM^{-1}$) gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet.

6.5.2 Mehrstufige Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin

Alle Reaktionen wurden in 2 mL Reaktionsgefäßen in einem Reaktionsvolumen von 100 µL angesetzt. Alle Konzentrationsangaben sind Endkonzentrationen und auf das Reaktionsvolumen von 100 µL bezogen. Insofern nicht anders beschrieben, wurde 50 mM Tris-Puffer mit pH 7,5 (bei 4 °C) als Puffer verwendet. Wenn keine abweichenden Angaben vorhanden sind, wurden Substanzen und Enzyme üblicherweise in Endkonzentrationen von 250 µM Loganinsäure, 1 mM SAM, 500 µM Tryptamin, 1 mM NADPH, 10 mM Glucose, 2U GDH, 1 µM K_CYP72A1, 5 µM LAMT, 500 nM STR und jeweils 10 µM FpR und

10 µM YkuN eingesetzt und die Reaktionen für 20 Stunden bei 25 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch zeitgleiche Zugabe von Natriumacetat-Puffer gestoppt und durch 2,4-DNPH derivatisiert (Kapitel 6.4.1). Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Proben gefriergetrocknet (Kapitel 6.4.3) und die Konzentration der Analyten per LC/MS-Analyse quantifiziert (Kapitel 6.4.5). Bei der Etablierung der Umsetzung von Loganinsäure zu Strictosidin Kapitel (2.3.1) wurden, 0-2 µM K_CYP72A1 mit FpR und YkuN in jeweils zehnfachem molarem Überschuss eingesetzt. Die im Sim(+)-Modus aufgezeichneten Chromatogramme wurden zur Evaluation verwendet. Für die Untersuchung der mehrstufigen Synthese von Strictosidin unter optimierten Bedingungen (Kapitel 2.3.8) wurden 250 µM Loganinsäure, 1 mM SAM, 0,5 mM Tryptamin, 1 mM NADPH, 10 mM Glucose, 2U GDH, 2 µM K_CYP72A1, 5 µM LAMT, 0,5 µM STR und jeweils 40 µM FpR und 20 µM YkuN eingesetzt und die Reaktionen bei 5 °C oder 25 °C für 3 bis 40 Stunden inkubiert.

6.5.3 Umsetzungen von Loganinsäure mit LAMT

Die Reaktionsansätze wurden in 2 mL Reaktionsgefäßen in einem Reaktionsvolumen von 100 µL vorgelegt. Für die Untersuchung des LAMT-Einflusses wurden 150 bis 300 µM Loganinsäure, 0 bis 4 µM LAMT und 1 mM SAM eingesetzt. Alle Reaktionen wurden jeweils zugleich gestartet und für 20 Stunden bei 25 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch zeitgleiche Zugabe von Natriumacetat-Puffer gestoppt und durch 2,4-DNPH derivatisiert (Kapitel 6.4.1) obgleich keine Synthese von Secologanin zu erwarten war. Die Proben wurden gefriergetrocknet (Kapitel 6.4.3) und die Konzentration der Analyten per LC/MS-Analyse quantifiziert (Kapitel 6.4.5).

6.5.4 Umsetzungen von Secologanin durch STR

Die Reaktionsansätze wurden in 2 mL Reaktionsgefäßen in einem Reaktionsvolumen von 100 µL vorgelegt. Für die Untersuchung des STR-Einflusses wurden Konzentrationen von 250 µM Secologanin, 1 mM Tryptamin und 25 bis 500 nM STR eingesetzt. Für die Untersuchung des Secologanin-Einflusses wurden Konzentrationen von 125 bis 1000 µM Secologanin, 1 mM Tryptamin und 250 nM STR eingesetzt. Die Reaktionen wurden jeweils zugleich gestartet und für zwei Stunden bei 25 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch zeitgleiche Zugabe von Natriumacetat-Puffer gestoppt und durch 2,4-DNPH derivatisiert (Kapitel 6.4.1) obgleich keine Synthese von Secologanin zu erwarten war. Die Proben wurden gefriergetrocknet (Kapitel 6.4.3) und per LC/MS-Analyse untersucht (Kapitel 6.4.5). Zur Evaluation des Einflusses der Secologanin-Konzentration wurde die Signalintensität der Analyten als das Verhältnis der Signalfläche des Strictosidin-Peaks zur Signalfläche des internen Standards im SIM(+)-Modus ausgewertet. Bei der Untersuchung der

STR-Konzentration wurde die Konzentration der Analyten per LC/MS-Analyse quantifiziert (Kapitel 6.4.5). Proben, welche mehr als 300 µM Strictosidin enthalten, wurden vor der Analyse so mit Methanol (LC/MS-Qualität) verdünnt, dass eine Konzentration 300 µM Strictosidin nicht überschritten wurde. Bei der Auswertung wurde der Verdünnungsfaktor berücksichtigt.

6.5.5 Biokatalytische Synthese von Strictosidin

Strictosidin wurde auf biochemischem Wege aus der Kondensationsreaktion von Secologanin und Tryptamin durch die Strictosidin-Synthase hergestellt. Die Synthese von Strictosidin wurde in bis zu zehn Ansätzen mit einem Reaktionsvolumen von je 0,875 mL in 2 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt jeweils Endkonzentrationen von 3 mM Secologanin, 6 mM Tryptamin und eine Endkonzentration von 0,3 µM (2 µg) STR. Die Reaktionsansätze wurden bei 30 °C und bei 300 RPM für 20 Stunden inkubiert. Zum Beenden der Umsetzung wurden die Ansätze jeweils drei Mal mit je 1 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann durch einen Rotationsverdampfer eingeengt. Die präparative Reinigung von Strictosidin erfolgte über Dünnschichtchromatographie (DC). Dazu wurden die eingeengten Extrakte linienförmig auf einem Zuschnitt einer DC-Platte (Kieselgel auf Aluminium) über eine Länge von etwa 7 cm aufgetupft. Zur chromatographischen Trennung wurde eine mobilen Phase, bestehend aus Ethylacetat, Methanol und Wasser in einem Mischungsverhältnis von 38,5:7,5:4[386] und einem Tropfen Triethylamin pro 20 mL Laufmittel eingesetzt. Das Ergebnis der chromatographischen Separation auf der DC-Platte wurde mit UV-Licht (256 nm) visualisiert. Das Kieselgel im Bereich des Strictosidin-Flecks wurde mit einem Spatel vom Aluminium-Trägermaterial gelöst und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von Methanol, Schütteln und Zentrifugation bei 3000 xg für zehn Minuten wurde das Produkt eluiert. Anschließend erfolgte die Verifikation der exakten Masse und Summenformel durch Hochauflösende ESI Massenspektrometrie (UHR-QTOF maXis 4G, Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, U.S.A.) durch die Abteilung für Massenspektrometrie der Wissenschaftichen Einrichtung Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHUCeMSA). Die Produktausbeute wurde mittels LC/MS-Analyse quantifiziert (Kapitel 6.4.4).

7 Literaturverzeichnis

(1) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the last 25 Years. *Journal of Natural Products* **2007**, *70*, 461–477.

(2) Cragg, G. M.; Newman, D. J. Natural Products: a Aontinuing Source of Novel Drug Leads. *Biochimica et Biophysica Acta* **2013**, *1830*, 3670–3695.

(3) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* **2016**, *79*, 629–661.

(4) Patridge, E.; Gareiss, P.; Kinch, M. S.; Hoyer, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today* **2016**, *21*, 204–207.

(5) Datta, A.; Srivastava, P. S. Variation in Vinblastine Production by *Catharanthus roseus*, During *in vivo* and *in vitro* Differentiation. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 135–137.

(6) Noble, R. L. The discovery of the vinca alkaloids--chemotherapeutic agents against cancer. *Biochemistry and Cell Biology* **1990**, *68*, 1344–1351.

(7) Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C. *Industrial Biotransformations*, 2nd edition, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.

(8) Patel, R. N. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, *26*, 1252–1274.

(9) Sun, H.; Zhang, H.; Ang, E. L.; Zhao, H. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, *26*, 1275–1284.

(10) Zimmerman, J. B.; Anastas, P. T.; Erythropel, H. C.; Leitner, W. Designing for a green chemistry future. *Science* **2020**, *367*, 397–400.

(11) Trost, B. M. The Atom Economy–A Search for sSynthetic Efficiency. *Science* **1991**, *254*, 1471–1477.

(12) Li, C.-J.; Anastas, P. T. Green Chemistry: present and future. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 1413–1414.

(13) Li, C.-J.; Trost, B. M. Green chemistry for chemical synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 13197–13202.

(14) Anastas, P. und Warner, J. *Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press*, New York, **1998**.

(15) Hughes, G.; Lewis, J. C. Introduction: Biocatalysis in Industry. *Chemical Reviews* **2018**, *118*, 1–3.

(16) Pellis, A.; Cantone, S.; Ebert, C.; Gardossi, L. Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. *New Biotechnology* **2018**, *40*, 154–169.

(17) Fryszkowska, A.; Devine, P. N. Biocatalysis in drug discovery and development. *Current Opinion in Chemical Biology* **2020**, *55*, 151–160.

(18) Bommarius, A. S.; Riebel, B. R. *Biocatalysis: fundamentals and applications.* 1st ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2004.

(19) Bommarius, A. S. Biocatalysis: A Status Report., *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* **2015**, *6*, 319–345.

(20) Choi, J.-M.; Han, S.-S.; Kim, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances* **2015**, *33*, 1443–1454.

(21) Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **2012**, *485*, 185–194.

(22) Desai, A. A. Sitagliptin Manufacture: A Compelling Zale of Green Chemistry, Process Intensification, and Industrial Asymmetric Catalysis. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 1974–1976.

(23) Savile, C. K.; Janey, J. M.; Mundorff, E. C.; Moore, J. C.; Tam, S.; Jarvis, W. R.; Colbeck, J. C.; Krebber, A.; Fleitz, F. J.; Brands, J.; Devine, P. N.; Huisman, G. W.; Hughes, G. J. Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. *Science* **2010**, *329*, 305–309.

(24) Lennen, R. M.; Pfleger, B. F. Microbial production of fatty acid-derived fuels and chemicals. *Current Opinion in Biotechnology* **2013**, *24*, 1044–1053.

(25) Kalantzi, S.; Mamma, D.; Christakopoulos, P.; Kekos, D. Effect of pectate lyase bioscouring on physical, chemical and low-stress mechanical properties of cotton fabrics. *Bioresource Technology* **2008**, *99*, 8185–8192.

(26) Razzaq, A.; Shamsi, S.; Ali, A.; Ali, Q.; Sajjad, M.; Malik, A.; Ashraf, M. Microbial Proteases Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2019**, *7*, 110.

(27) Fernandes, P. Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on Strategies for Better Biocatalysts. *Enzyme Research* **2010**, 862537.

(28) Araújo, R.; Casal, M.; Cavaco-Paulo, A. Application of enzymes for textile fibres processing. *Biocatalysis and Biotransformation* **2008**, *26*, 332–349.

(29) Cavicchioli, R.; Siddiqui, K. S.; Andrews, D.; Sowers, K. R. Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, *13*, 253–261.

(30) Hönig, M.; Sondermann, P.; Turner, N. J.; Carreira, E. M. Enantioselective Chemo- and Biocatalysis: Partners in Retrosynthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 8942–8973.

(31) Turner, N. J.; Humphreys, L. *Biocatalysis in Organic Synthesis.* The Royal Society of Chemistry, 2018.

(32) Petersen, M.; Kiener, A. Biocatalysis. *Green Chemistry* **1999**, *1*, 99–106.

(33) Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **2001**, *409*, 258–268.

(34) Gross, R. A.; Kumar, A.; Kalra, B. Polymer Synthesis by *in vitro* Enzyme Catalysis. *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 2097–2124.

(35) Nestl, B. M.; Nebel, B. A.; Hauer, B. Recent progress in industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* **2011**, *15*, 187–193.

(36) Jemli, S.; Ayadi-Zouari, D.; Hlima, H. B.; Bejar, S. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Critical Reviews in Biotechnology* **2016**, *36*, 246–258.

(37) Reetz, M. T. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 12480–12496.

(38) Sheldon, R. A.; Brady, D.; Bode, M. L. The Hitchhiker's guide to biocatalysis: recent advances in the use of enzymes in organic synthesis. *Chemical Science* **2020**, *11*, 2587–2605.

(39) Jimenez-Rosales, A.; Flores-Merino, M. V. Tailoring Proteins to Re-Evolve Nature: A Short Review. *Molecular Biotechnology* **2018**.

(40) Lutz, S.; Iamurri, S. M. Protein Engineering: Past, Present, and Future. *Methods in Molecular Biology* **2018**, *1685*, 1–12.

(41) Bornscheuer, U. T.; Pohl, M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, *5*, 137–143.

(42) Korendovych, I. V. Rational and Semirational Protein Design. *Methods in Molecular Biology* **2018**, *1685*, 15–23.

(43) Chen, K.; Arnold, F. H. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, *90*, 5618–5622.

(44) Arnold, F. H. Design by Directed Evolution. *Accounts of Chemical Research* **1998**, *31*, 125–131.

(45) Cobb, R. E.; Chao, R.; Zhao, H. Directed Evolution: Past, Present and Future. *American Institute of Chemical Engineers* **2013**, *59*, 1432–1440.

(46) Xiao, H.; Bao, Z.; Zhao, H. High Throughput Screening and Selection Methods for Directed Enzyme Evolution. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2015**, *54*, 4011–4020.

(47) Reetz, M. T.; Carballeira, J. D.; Vogel, A. Iterative Saturation Mutagenesis on the Basis of B Factors as a Strategy for Increasing Protein Thermostability. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 7745–7751.

(48) Reetz, M. T.; Carballeira, J. D. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nature Protocols* **2007**, *2*, 891–903.

(49) Reetz, M. T.; Wang, L.-W.; Bocola, M. Directed Evolution of Enantioselective Enzymes: Iterative Cycles of CASTing for Probing Protein-Sequence Space. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 1236–1241.

(50) Bommarius, A. S.; Blum, J. K.; Abrahamson, M. J. Status of protein engineering for biocatalysts: how to design an industrially useful biocatalyst. *Current Opinion in Chemical Biology* **2011**, *15*, 194–200.

(51) Koepnick, B.; Flatten, J.; Husain, T.; Ford, A.; Silva, D.-A.; Bick, M. J.; Bauer, A.; Liu, G.; Ishida, Y.; Boykov, A.; Estep, R. D.; Kleinfelter, S.; Nørgård-Solano, T.; Wei, L.; Players, F.; Montelione, G. T.; DiMaio, F.; Popović, Z.; Khatib, F.; Cooper, S.; Baker, D. *De novo* protein design by citizen scientists. *Nature* **2019**, *570*, 390–394.

(52) Huang, P.-S.; Boyken, S. E.; Baker, D. The coming of age of *de novo* protein design. *Nature* **2016**, *537*, 320–327.

(53) Khoury, G. A.; Smadbeck, J.; Kieslich, C. A.; Floudas, C. A. Protein folding and *de novo* protein design for biotechnological applications. *Trends in Biotechnology* **2014**, *32*, 99–109.

(54) Ricca, E.; Brucher, B.; Schrittwieser, J. H. Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2011**, *353*, 2239–2262.

(55) Mayer, S. F.; Kroutil, W.; Faber, K. Enzyme-initiated domino (cascade) reactions. *Chemical Society Reviews* **2001**, *30*, 332–339.

(56) Fogg, D. E.; dos Santos, E. N. Tandem catalysis: a taxonomy and illustrative review. *Coordination Chemistry Reviews* **2004**, *248*, 2365–2379.

(57) Rudroff, F.; Mihovilovic, M. D.; Gröger, H.; Snajdrova, R.; Iding, H.; Bornscheuer, U. T. Opportunities and challenges for combining chemo- and biocatalysis. *Nature Catalysis* **2018**, *1*, 12–22.

(58) Schrittwieser, J. H.; Velikogne, S.; Hall, M.; Kroutil, W. Artificial Biocatalytic Linear Cascades for Preparation of Organic Molecules. *Chemical Reviews* **2018**, *118*, 270–348.

(59) Tietze, L. F.; Beifuss, U. Sequential Transformations in Organic Chemistry: A Synthetic Strategy with a Future. *Angewandte Chemie International Edition* **1993**, *32*, 131–163.

(60) Bruggink, A.; Schoevaart, R.; Kieboom, T. Concepts of Nature in Organic Synthesis: Cascade Catalysis and Multistep Conversions in Concert. *Organic Process Research & Development* **2003**, *7*, 622–640.

(61) Kroutil, W.; Rueping, M. Introduction to ACS Catalysis Virtual Special Issue on Cascade Catalysis. *ACS Catalysis* **2014**, *4*, 2086–2087.

(62) Albery, W. J.; Knowles, J. R. Evolution of Enzyme Function and the Development of Catalytic Efficiency. *Biochemistry* **1976**, *15*, 5631–5640.

(63) Urlacher, V. B.; Schulz, S. Multi-Enzyme Systems and Cascade Reactions Involving Cytochrome P450 Monooxygenases. In *Cascade Biocatalysis*; Riva, S., Fessner, W.-D., Eds.; Wiley-VCH, Weinheim, 2014.

(64) Corsello, M. A.; Kim, J.; Garg, N. K. Indole diterpenoid natural products as the inspiration for new synthetic methods and strategies. *Chemical Science* **2017**, *8*, 5836–5844.

(65) Willstätter, R. III. Synthese des Tropans und Tropidins. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1901**, *317*, 307–374.

(66) Medley, J. W.; Movassaghi, M. Robinson's landmark synthesis of tropinone. *Chemical Communications* **2013**, *49*, 10775–10777.

(67) Robinson, R. LXIII.—A synthesis of Tropinone. *Journal of the Chemical Society, Transactions* **1917**, *111*, 762–768.

(68) Denard, C. A.; Hartwig, J. F.; Zhao, H. Multistep One-Pot Reactions Combining Biocatalysts and Chemical Catalysts for Asymmetric Synthesis. *ACS Catalysis* **2013**, *3*, 2856–2864.

(69) France, S. P.; Hepworth, L. J.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L. Constructing Biocatalytic Cascades: *In Vitro* and *In Vivo* Approaches to *De Novo* Multi-Enzyme Pathways. *ACS Catalysis* **2017**, *7*, 710–724.

(70) Lopez-Gallego, F.; Schmidt-Dannert, C. Multi-enzymatic synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, *14*, 174–183.

(71) Muschiol, J.; Peters, C.; Oberleitner, N.; Mihovilovic, M. D.; Bornscheuer, U. T.; Rudroff, F. Cascade catalysis – strategies and challenges en route to preparative synthetic biology. *Chemical Communications* **2015**, *51*, 5798–5811.

(72) Westfall, P. J.; Pitera, D. J.; Lenihan, J. R.; Eng, D.; Woolard, F. X.; Regentin, R.; Horning, T.; Tsuruta, H.; Melis, D. J.; Owens, A.; Fickes, S.; Diola, D.; Benjamin, K. R.; Keasling, J. D.; Leavell, M. D.; McPhee, D. J.; Renninger, N. S.; Newman, J. D.; Paddon, C. J. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109*, E111-8.

(73) 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.; Lievense, J.; Covello, P. S.; Keasling, J. D.; Reiling, K. K.; Renninger, N. S.; Newman, J. D. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* **2013**, *496*, 528–532.

(74) Kwok, R. Five Hard Truths for Synthetic Biology. *Nature* **2010**, *2010*, 288–290.

(75) Brown, S.; Clastre, M.; Courdavault, V.; O'Connor, S. E. *De novo* production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112*, 3205–3210.

(76) Luo, X.; Reiter, M. A.; d'Espaux, L.; Wong, J.; Denby, C. M.; Lechner, A.; Zhang, Y.; Grzybowski, A. T.; Harth, S.; Lin, W.; Lee, H.; Yu, C.; Shin, J.; Deng, K.; Benites, V. T.; Wang, G.; Baidoo, E. E. K.; Chen, Y.; Dev, I.; Petzold, C. J.; Keasling, J. D. Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature* **2019**, *567*, 123–126.

(77) Hansen, E. H.; Møller, B. L.; Kock, G. R.; Bünner, C. M.; Kristensen, C.; Jensen, O. R.; Okkels, F. T.; Olsen, C. E.; Motawia, M. S.; Hansen, J. *De novo* Biosynthesis of Vanillin in Fission Yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Applied and Environmental Microbiology* **2009**, *75*, 2765–2774.

(78) Asadollahi, M. A.; Maury, J.; Møller, K.; Nielsen, K. F.; Schalk, M.; Clark, A.; Nielsen, J. Production of Plant Sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of ERG9 Repression on Sesquiterpene Biosynthesis. *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, *99*, 666–677.

(79) Zhang, Y.-H. P.; Evans, B. R.; Mielenz, J. R.; Hopkins, R. C.; Adams, M. W. W. High-Yield Hydrogen Production from Starch and Water by a Synthetic Enzymatic Pathway. *PLOS ONE* **2007**, *2*, e456.

(80) Korman, T. P.; Opgenorth, P. H.; Bowie, J. U. A synthetic biochemistry platform for cell free production of monoterpenes from glucose. *Nature Communications* **2017**, *8*, 15526.

(81) Guterl, J.-K.; Garbe, D.; Carsten, J.; Steffler, F.; Sommer, B.; Reiße, S.; Philipp, A.; Haack, M.; Rühmann, B.; Koltermann, A.; Kettling, U.; Brück, T.; Sieber, V. Cell-Free Metabolic Engineering: Production of Chemicals by Minimized Reaction Cascades. *ChemSusChem* **2012**, *5*, 2165–2172.

(82) Moore, S. J.; MacDonald, J. T.; Freemont, P. S. Cell-free synthetic biology for *in vitro* prototype engineering. *Biochemical Society Transactions* **2017**, *45*, 785–791.

(83) Morgado, G.; Gerngross, D.; Roberts, T. M.; Panke, S. Synthetic Biology for Cell-Free Biosynthesis: Fundamentals of Designing Novel *In Vitro* Multi-Enzyme Reaction Networks. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **2018**, *162*, 117–146.

(84) Karim, A. S.; Jewett, M. C. Cell-Free Synthetic Biology for Pathway Prototyping. *Methods in Enzymology* **2018**, *608*, 31–57.

(85) Guo, W.; Sheng, J.; Feng, X. Mini-review: *In vitro* Metabolic Engineering for Biomanufacturing of High-value Products. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2017**, *15*, 161–167.

(86) Oroz-Guinea, I.; García-Junceda, E. Enzyme catalysed tandem reactions. *Current Opinion in Chemical Biology* **2013**, *17*, 236–249.

(87) Bowie, J. U.; Sherkhanov, S.; Korman, T. P.; Valliere, M. A.; Opgenorth, P. H.; Liu, H. Synthetic Biochemistry: The Bio-inspired Cell-Free Approach to Commodity Chemical Production. *Trends in Biotechnology* **2020,** *38*, 766-778.

(88) Hamid, M. H. S. A.; Slatford, P. A.; Williams, J. M. J. Borrowing Hydrogen in the Activation of Alcohols. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2007**, *349*, 1555–1575.

(89) Leonard, J.; Blacker, A. J.; Marsden, S. P.; Jones, M. F.; Mulholland, K. R.; Newton, R. A Survey of the Borrowing Hydrogen Approach to the Synthesis of some Pharmaceutically Relevant Intermediates. *Organic Process Research & Development* **2015**, *19*, 1400–1410.

(90) Huffman, M. A.; Fryszkowska, A.; Alvizo, O.; Borra-Garske, M.; Campos, K. R.; Canada, K. A.; Devine, P. N.; Duan, D.; Forstater, J. H.; Grosser, S. T.; Halsey, H. M.; Hughes, G. J.; Jo, J.; Joyce, L. A.; Kolev, J. N.; Liang, J.; Maloney, K. M.; Mann, B. F.; Marshall, N. M.; McLaughlin, M.; Moore, J. C.; Murphy, G. S.; Nawrat, C. C.; Nazor, J.; Novick, S.; Patel, N. R.; Rodriguez-Granillo, A.; Robaire, S. A.; Sherer, E. C.; Truppo, M. D.; Whittaker, A. M.; Verma, D.; Xiao, L.; Xu, Y.; Yang, H. Design of an *in vitro* biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir. *Science* **2019**, *366*, 1255–1259.

(91) McLaughlin, M.; Kong, J.; Belyk, K. M.; Chen, B.; Gibson, A. W.; Keen, S. P.; Lieberman, D. R.; Milczek, E. M.; Moore, J. C.; Murray, D.; Peng, F.; Qi, J.; Reamer, R. A.; Song, Z. J.; Tan, L.; Wang, L.; Williams, M. J. Enantioselective Synthesis of 4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) via Enzymatic Desymmetrization. *Organic Letters* **2017**, *19*, 926–929.

(92) Springob, K.; Kutchan, T. M. Introduction to the Different Classes of Natural Products. In *Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application*; Osbourn, A. E., Lanzotti, V., Eds.; Springer US: New York, NY, 2009; pp 3–50.

(93) Aniszewski, T. *Alkaloids*. *Chemistry, Biology, Ecology, and Applications*, 2nd edition, Elsevier, Waltham, 2015.

(94) Verpoorte, R.; van der Heijden, R.; Moreno, P. R.H. Chapter 3 Biosynthesis of Terpenoid Indole Alkaloids in *Catharanthus roseus* Cells. In *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press, 1997.

(95) El-Sayed, M.; Verpoorte, R. *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. *Phytochem Rev* **2007**, *6*, 277–305.

(96) Braitmaier, E.; Jung, G. *Organische Chemie*. *Grundlagen, Stoffklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur*, 4., überarb. Aufl.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001.

(97) Verpoorte, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today* **1998**, *3*, 232–238.

(98) *Alkaloids*. *Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications;* Margaret F. Roberts, Margaret F. Ed., 1st Edition, Springer-Verlag 1998.

(99) Pictet, A.; Spengler, T. Über die Bildung von Isochinolin-derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyl-äthylamin, Phenyl-alanin und Tyrosin. *Berichte der Deutschen. Chemischen Gesellschaft* **1911**, *44*, 2030–2036.

(100) *Plant-derived Natural Products*. *Synthesis, Function, and Application;* Anne E. Osbourn, Virginia Lanzotti, Eds., 1st Edition, Springer, New York, 2009.

(101) van der Heijden, R.; Jacobs, D.; Snoeijer, W.; Hallard, D.; Verpoorte, R. The *Catharanthus* Alkaloids:Pharmacognosy and Biotechnology. *Current Medicinal Chemistry* **2004**, *11*, 607–628.

(102) Rueffer, M.; Nagakura, N.; Zenk, M. H. Strictosidine, the Common Precursor for Monoterpenoid Indole Alkaloids with 3 α and 3 β Configuration. *Tetrahedron Letters* **1978**, *19*, 1593–1596.

(103) Nagakura, N.; Rüffer, M.; Zenk, M. H. The Biosynthesis of Monoterpenoid Indole Alkaloids from Strictosidine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1979**, 2308–2312.

(104) A. H. Heckendorf, C. R. Hutchinson. Biosynthesis of camptothecin. II. Confirmation That Isovincoside, Not Vincoside, Is The Penultimate Biosynthetic Precursor of Indole Alkaloids. *Tetrahedron Letters* **1977**, *1977*, 4153–4154.

(105) Hemscheidt, T.; Zenk, M. H. Glucosidases Involved in Indole Alkaloid Biosynthesis of *Catharanthus* Cell Cultures. *FEBS Letters* **1980**, *110*, 187–191.

(106) Geerlings, A.; Ibañez, M. M.-L.; Memelink, J.; van der Heijden, R.; Verpoorte, R. Molecular Cloning and Analysis of Strictosidine β-d-Glucosidase, an Enzyme in Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 3051–3056.

(107) Guirimand, G.; Courdavault, V.; Lanoue, A.; Mahroug, S.; Guihur, A.; Blanc, N.; Giglioli-Guivarc'h, N.; St-Pierre, B.; Burlat, V. Strictosidine activation in Apocynaceae: towards a "nuclear time bomb"? *BMC Plant Biology* **2010**, *10*, 182.

(108) Sottomayor, M.; Ros Barceló, A. Peroxidase from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don and the biosynthesis of alpha-3',4'-anhydrovinblastine: a specific role for a multifunctional enzyme. *Protoplasma* **2003**, *222*, 97–105.

(109) Loyola-Vargas, V. M.; Galaz-Ávalos, R. M.; Kú-Cauich, R. *Catharanthus* biosynthetic enzymes: the road ahead. *Phytochemistry Reviews* **2007**, *6*, 307–339.

(110) World Health Organization. WHO Model List of Essential Medicines **2017**.

(111) Ishikawa, H.; Elliott, G. I.; Velcicky, J.; Choi, Y.; Boger, D. L. Total Synthesis of (-)- and ent-(+)-Vindoline and Related Alkaloids. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 10596–10612.

(112) Choi, Y.; Ishikawa, H.; Velcicky, J.; Elliott, G. I.; Miller, M. M.; Boger, D. L. Total Synthesis of (-)- and ent-(+)-Vindoline. *Organic Letters* **2005**, *7*, 4539–4542.

(113) Ishikawa, H.; Colby, D. A.; Boger, D. L. Direct Coupling of Catharanthine and Vindoline to Provide Vinblastine: Rotal Synthesis of (+)- and ent-(-)-Vinblastine. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 420–421.

(114) Luca, V. de; Salim, V.; Atsumi, S. M.; Yu, F. Mining the Biodiversity of Plants: A Revolution in the Making. *Science* **2012**, *336*, 1658–1661.

(115) Kries, H.; O'Connor, S. E. Biocatalysts from alkaloid producing plants. *Current Opinion in Chemical Biology* **2016**, *31*, 22–30.

(116) Gierl, A.; Frey, M. Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize. *Planta* **2001**, *213*, 493–498.

(117) Qi, X.; Bakht, S.; Leggett, M.; Maxwell, C.; Melton, R.; Osbourn, A. 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* **2004**, *101*, 8233–8238.

(118) Field, B.; Osbourn, A. E. Metabolic Diversification--Independent Assembly of Operon-Like Gene Clusters in Different Plants. *Science* **2008**, *320*, 543–547.

(119) Mahroug, S.; Burlat, V.; St-Pierre, B. Cellular and sub-cellular organisation of the monoterpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry Reviews* **2007**, *6*, 363–381.

(120) Verma, P.; Mathur, A. K.; Srivastava, A.; Mathur, A. Emerging trends in research on spatial and temporal organization of terpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*: a literature update. *Protoplasma* **2012**, *249*, 255–268.

(121) Westekemper, P.; Wieczorek, U.; Gueritte, F.; Langlois, N.; Langlois, Y.; Potier, P.; Zenk, M. H. Radioimmunoassay for the Determination of the Indole Alkaloid Vindoline in *Catharanthus*. *Planta Medica* **1980**, *39*, 24–37.

(122) St-Pierre, B.; Vazquez-Flota, F. A.; Luca, V. de. Multicellular Compartmentation of *Catharanthus roseus* Alkaloid Biosynthesis Predicts Intercellular Translocation of a Pathway Intermediate. *The Plant Cell* **1999**, *11*, 887.

(123) Kutchan, T. M. A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Current opinion in Plant Biology* **2005**, *8*, 292–300.

(124) Courdavault, V.; Papon, N.; Clastre, M.; Giglioli-Guivarc'h, N.; St-Pierre, B.; Burlat, V. A look inside an alkaloid multisite plant: the *Catharanthus* logistics. *Current opinion in Plant Biology* **2014**, *19*, 43–50.

(125) Contin, A.; van der Heijden, R.; Lefeber, A. W.; Verpoorte, R. The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Letters* **1998**, *434*, 413–416.

(126) Hong, S.-B.; Hughes, E. H.; Shanks, J. V.; San, K.-Y.; Gibson, S. I. Role of the Non-Mevalonate Pathway in Indole Alkaloid Production by *Catharanthus roseus* Hairy Roots. *Biotechnology Progress* **2003**, *19*, 1105–1108.

(127) Oudin, A.; Courtois, M.; Rideau, M.; Clastre, M. The iridoid pathway in *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* **2007**, *6*, 259–276.

(128) Guirimand, G.; Guihur, A.; Phillips, M. A.; Oudin, A.; Glévarec, G.; Melin, C.; Papon, N.; Clastre, M.; St-Pierre, B.; Rodríguez-Concepción, M.; Burlat, V.; Courdavault, V. A single gene encodes isopentenyl diphosphate isomerase isoforms targeted to plastids, mitochondria and peroxisomes in *Catharanthus roseus*. *Plant Molecular Biology* **2012**, *79*, 443–459.

(129) Guirimand, G.; Burlat, V.; Oudin, A.; Lanoue, A.; St-Pierre, B.; Courdavault, V. Optimization of the transient transformation of *Catharanthus roseus* cells by particle bombardment and its application to the subcellular localization of hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate synthase and geraniol 10-hydroxylase. *Plant Cell Reports* **2009**, *28*, 1215–1234.

(130) Rai, A.; Smita, S. S.; Singh, A. K.; Shanker, K.; Nagegowda, D. A. Heteromeric and Homomeric Geranyl Diphosphate Synthases from *Catharanthus roseus* and Their Role in Monoterpene Indole Alkaloid Biosynthesis. *Molecular Plant* **2013**, *6*, 1531–1549.

(131) Simkin, A. J.; Miettinen, K.; Claudel, P.; Burlat, V.; Guirimand, G.; Courdavault, V.; Papon, N.; Meyer, S.; Godet, S.; St-Pierre, B.; Giglioli-Guivarc'h, N.; Fischer, M. J. C.; Memelink, J.; Clastre, M. Characterization of the plastidial geraniol synthase from Madagascar periwinkle which initiates the monoterpenoid branch of the alkaloid pathway in internal phloem associated parenchyma. *Phytochemistry* **2013**, *85*, 36–43.

(132) Meehan, T. D.; Coscia, C. J. Hydroxylation of Geraniol and Nerol by a Monooxygenase from *Vinca rosea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1973**, *53*, 1043–1048.

(133) Collu, G.; Unver, N.; Peltenburg-Looman, A. M.; van der Heijden, R.; Verpoorte, R.; Memelink, J. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Letters* **2001**, *508*, 215–220.

(134) Miettinen, K.; Dong, L.; Navrot, N.; Schneider, T.; Burlat, V.; Pollier, J.; Woittiez, L.; van der Krol, S.; Lugan, R.; Ilc, T.; Verpoorte, R.; Oksman-Caldentey, K.-M.; Martinoia, E.; Bouwmeester, H.; Goossens, A.; Memelink, J.; Werck-Reichhart, D. The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus*. *Nature Communications* **2014**, *5*, 3606.

(135) Uesato, S.; Matsuda, S.; Inouye, H. Mechanism for Iridane Skeleten Formation from Acyclic Monoterpenes in the Biosynthesis of Secologanin and Vindoline in *Catharanthus roseus* and *Lonicera morrowii*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1984**, *32*, 1671–1674.

(136) Sanchez-Iturbe, P.; Galaz-Avalos, R.; Loyola-Vargas, V. Determination and Partial Purification of a Monoterpene Cyclase from *Catharanthus roseus* Hairy Roots. *Phyton* **2005**, *54*.

(137) Geu-Flores, F.; Sherden, N. H.; Courdavault, V.; Burlat, V.; Glenn, W. S.; Wu, C.; Nims, E.; Cui, Y.; O'Connor, S. E. An alternative route to cyclic terpenes by reductive cyclization in iridoid biosynthesis. *Nature* **2012**, *492*, 138–142.

(138) Salim, V.; Wiens, B.; Masada-Atsumi, S.; Yu, F.; Luca, V. de. 7-deoxyloganetic acid synthase catalyzes a key 3 step oxidation to form 7-deoxyloganetic acid in *Catharanthus roseus* iridoid biosynthesis. *Phytochemistry* **2014**, *101*, 23–31.

(139) Asada, K.; Salim, V.; Masada-Atsumi, S.; Edmunds, E.; Nagatoshi, M.; Terasaka, K.; Mizukami, H.; Luca, V. de. A 7-Deoxyloganetic Acid Glucosyltransferase Contributes a Key Step in Secologanin Biosynthesis in Madagascar Periwinkle. *The Plant Cell* **2013**, *25*, 4123–4134.

(140) Salim, V.; Yu, F.; Altarejos, J.; Luca, V. de. Virus-induced gene silencing identifies *Catharanthus roseus* 7-deoxyloganic acid-7-hydroxylase, a step in iridoid and monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **2013**, *76*, 754–765.

(141) Murata, J.; Roepke, J.; Gordon, H.; Luca, V. de. The Leaf Epidermome of *Catharanthus roseus* Reveals its Biochemical Specialization. *The Plant Cell* **2008**, *20*, 524–542.

(142) Madyastha, K. M.; Guarnaccia, R.; Baxter, C.; Coscia, C. J. S-Adenosyl-L-methionine: Loganic Acid Methyltransferase. A carboxyl-alkylating enzyme from *Vinca rosea*. *The Journal of Biological Chemistry* **1973**, *248*, 2497–2501.

(143) Irmler, S.; Schroder, G.; St-Pierre, B.; Crouch, N. P.; Hotze, M.; Schmidt, J.; Strack, D.; Matern, U.; Schroder, J. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *The Plant Journal* **2000**, *24*, 797–804.

(144) Yamamoto, H.; Katano, N.; Ooi, A.; Inoue, K. Secologanin synthase which catalyzes the oxidative cleavage of loganin into secologanin is a cytochrome P450. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 7–12.

(145) Brown, S. A.; Neish, A. C. Shikimic Acid as a Precursor in Lignin Biosynthesis. *Nature* **1955**, *175*, 688–689.

(146) De Luca, V.; Cutler, A. J. Subcellular Localization of Enzymes Involved in Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology* **1987**, *85*, 1099–1102.

(147) Noe, W.; Mollenschott, C.; Berlin, J. Tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures: purification, molecular and kinetic data of the homogenous protein. *Plant Molecular Biology* **1984**, *3*, 281–288.

(148) Stöckigt, J.; Zenk, M. H. Isovincoside (Strictosidine), the Key Intermediate in the Enzymatic Formation of Indole Alkaloids. *FEBS Letters* **1977**, *79*, 233–237.

(149) McKnight, T. D.; Roessner, C. A.; Devagupta, R.; Scott, A. I.; Nessler, C. L. Nucleotide sequence of a cDNA encoding the vacuolar protein strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*. *Nucleic Acids Research* **1990**, *18*, 4939.

(150) McKnight, T. D.; Bergey, D. R.; Burnett, R. J.; Nessler, C. L. Expression of enzymatically active and correctly targeted strictosidine synthase in transgenic tobacco plants. *Planta* **1991**, *185*, 148–152.

(151) Luijendijk, T. J.C.; Stevens, L. H.; Verpoorte, R. Purification and characterisation of strictosidine β-d-glucosidase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* **1998**, *36*, 419–425.

(152) Guirimand, G.; Guihur, A.; Ginis, O.; Poutrain, P.; Héricourt, F.; Oudin, A.; Lanoue, A.; St-Pierre, B.; Burlat, V.; Courdavault, V. The subcellular organization of strictosidine biosynthesis in *Catharanthus roseus* epidermis highlights several trans-tonoplast translocations of intermediate metabolites. *The FEBS journal* **2011**, *278*, 749–763.

(153) Petronikolou, N.; Hollatz, A. J.; Schuler, M. A.; Nair, S. K. Loganic Acid Methyltransferase: Insights into the Specificity of Methylation on an Iridoid Glycoside. *ChemBioChem* **2018**.

(154) Dugé de Bernonville, T.; Foureau, E.; Parage, C.; Lanoue, A.; Clastre, M.; Londono, M. A.; Oudin, A.; Houillé, B.; Papon, N.; Besseau, S.; Glévarec, G.; Atehortùa, L.; Giglioli-Guivarc'h, N.; St-Pierre, B.; Luca, V. de; O'Connor, S. E.; Courdavault, V. Characterization of a second secologanin synthase isoform producing both secologanin and secoxyloganin allows enhanced *de novo* assembly of a *Catharanthus roseus* transcriptome. *BMC genomics* **2015**, *16*, 619.

(155) Yamamoto, H.; Katano, N.; Ooi, A.; Inoue, K. Transformation of loganin and 7-deoxyloganin into secologanin by *Lonicera japonica* cell suspension cultures. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 417–422.

(156) Hakamatsuka, T.; Hashim, M. F.; Ebizuka, Y.; Sankawa, U. P-450-Dependent Oxidative Rearrangement in Isoflavone Biosynthesis: Reconstitution of P-450 and NADPH:P-450 Reductase. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5969–5978.

(157) Kutchan, T. M.; Hampp, N.; Lottspeich, F.; Beyreuther, K.; Zenk, M. H. The cDNA clone for strictosidine synthase from *Rauvolfia serpentina*. DNA sequence determination and expression in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **1988**, *237*, 40–44.

(158) Stöckigt, J.; Zenk, M. H. Strictosidine (Isovincoside): the Key Intermediate in the Biosynthesis of Monoterpenoid Indole Alkaloids. *Chemical Communications* **1977,** 18, 646–648.

(159) Treimer, J. F.; Zenk, M. H. Strictosidine synthase from cell cultures of *apocynaceae* plants. *FEBS Letters* **1979**, *97*, 159–162.

(160) Skinner, S. E.; Walton, N. J.; Robins, R. J.; Rhodes, M. J.C. Tryptophan Decarboxylase Strictosidine Synthase and Alkaloid Production by *Cinchona ledgeriana* Suspension Cultures. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 721–725.

(161) Aerts, R. J.; van der Leer, T.; van der Heijden, R.; Verpoorte, R. Developmental Regulation of Alkaloid Production in *Cinchona Seedlings*. *Journal of Plant Physiology* **1990**, *136*, 86–91.

(162) Stöckigt, J.; Antonchick, A. P.; Wu, F.; Waldmann, H. Die Pictet-Spengler-Reaktion in der Natur und der organischen Chemie. *Angewandte Chemie* **2011**, *123*, 8692–8719.

(163) Pfitzner, U.; Zenk, M. H. Homogeneous Strictosidine Synthase Isoenzymes from Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Medica* **1989**, *55*, 525–530.

(164) Waal, A. de; Meijer, A. H.; Verpoorte, R. Strictosidine synthase from *Catharanthus roseus* : purification and characterization of multiple forms. *Biochemical Journal* **1995**, *306*, 571–580.

(165) Ma, X.; Koepke, J.; Fritzsch, G.; Diem, R.; Kutchan, T. M.; Michel, H.; Stöckigt, J. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of strictosidine synthase from *Rauvolfia*: the first member of a novel enzyme family. *Biochimica et Biophysica Acta* **2004**, *1702*, 121–124.

(166) Brown, R. T.; Leonard, J.; Sleigh, S. K. The Role of Strictosidine in Monoterpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 899–900.

(167) Luca, V. de. Biochemistry and Molecular Biology of Indole Alkaloid Biosynthesis: The Implication of Recent Discoveries. In *Recent Advances in Phytochemistry : Integrative Phytochemistry: from Ethnobotany to Molecular Ecology*; Romeo, J. T., Ed.; Elsevier, 2003.

(168) Ruppert, M.; Ma, X.; Stockigt, J. Alkaloid Biosynthesis in *Rauvolfia*- cDNA Cloning of Major Enzymes of the Ajmaline Pathway. *Current Organic Chemistry* **2005**, *9*.

(169) O'Connor, S. E.; Maresh, J. J. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Natural Product Reports* **2006**, *23*, 532–547.

(170) Treimer, J. F.; Zenk, M. H. Purification and Properties of Strictosidine Synthase, the Key Enzyme in Indole Alkaloid Formation. *European Journal of Biochemistry* **1979**, *101*, 225–233.

(171) Pasquali, G.; Goddijn, O. J. M.; Waal, A. de; Verpoorte, R.; Schilperoort, R. A.; Hoge, J. H. C.; Memelink, J. Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Molecular Biology* **1992**, *18*, 1121–1131.

(172) Mizukami, H.; Nordlov, H.; Lee, S.-L.; Scott, A. I. Purification and properties of strictosidine synthetase (an enzyme condensing tryptamine and secologanin) from *Catharanthus roseus* cultured cells. *Biochemistry* **1979**, *18*, 3760–3763.

(173) Kutchan, T. M. Expression of enzymatically active cloned strictosidine synthase from the higher plant *Rauvolfia serpentina* in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **1989**, *257*, 127–130.

(174) Ma, X.; Panjikar, S.; Koepke, J.; Loris, E.; Stöckigt, J. The Structure of *Rauvolfia serpentina* Strictosidine Synthase is a Novel Six-Bladed β-Propeller Fold in Plant Proteins. *The Plant Cell* **2006**, *18*, 907–920.

(175) Loris, E. A.; Panjikar, S.; Ruppert, M.; Barleben, L.; Unger, M.; Schübel, H.; Stöckigt, J. Structure-Based Engineering of Strictosidine Synthase: Auxiliary for Alkaloid Libraries. *Chemistry & Biology* **2007**, *14*, 979–985.

(176) Stöckigt, J.; Barleben, L.; Panjikar, S.; Loris, E. A. 3D-Structure and function of strictosidine synthase--the key enzyme of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **2008**, *46*, 340–355.

(177) Hampp, N.; Zenk, M. H. Homogeneous Strictosidine Synthase from Cell Suspension Cultures of *Rauvolfia serpentina*. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3811–3815.

(178) Kutchan, T. M.; Bock, A.; Dittrich, H. Heterologous Expression of the Plant Proteins Strictosidine Synthase and Berberine Bridge Enzyme in Insect Cell Culture. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 353–360.

(179) Pfitzner, U.; Zenk, M. H. Immobilization of Strictosidine Synthase from *Catharanthus* Cell Cultures and Preparative Synthesis of Strictosidine. *Planta Medica* **1982**, *46*, 10–14.

(180) McCoy, E.; Galan, M. C.; O'Connor, S. E. Substrate specificity of strictosidine synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 2475–2478.

(181) Fischereder, E.; Pressnitz, D.; Kroutil, W.; Lutz, S. Engineering strictosidine synthase: Rational design of a small, focused circular permutation library of the β-propeller fold enzyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22*, 5633–5637.

(182) Chen, S.; Galan, M. C.; Coltharp, C.; O'Connor, S. E. Redesign of a Central Enzyme in Alkaloid Biosynthesis. *Chemistry & Biology* **2006**, *13*, 1137–1141.

(183) Runguphan, W.; Qu, X.; O'Connor, S. E. Integrating carbon-halogen bond formation into medicinal plant metabolism. *Nature* **2010**, *468*, 461–464.

(184) Nelson, D. R. Cytochrome P450 and the Individuality of Species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1999**, *369*, 1–10.

(185) Mansuy, D. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology* **1998**, *121*, 5–14.

(186) Hannemann, F.; Bichet, A.; Ewen, K. M.; Bernhardt, R. Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta* **2007**, *1770*, 330–344.

(187) Omura, T.; Sato, R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment Of Liver Microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* **1964**, *239*, 2370–2378.

(188) Nelson, D. R. Cytochrome P450 Nomenclature, 2004. *Methods in Molecular Biology* **2006**, *320*, 1–10.

(189) Lamb, D. C.; Waterman, M. R. Unusual properties of the cytochrome P450 superfamily. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **2013**, *368*, 20120434.

(190) Guengerich, F. P.; Munro, A. W. Unusual Cytochrome P450 Enzymes and Reactions. *The Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 17065–17073.

(191) Bernhardt, R.; Urlacher, V. B. Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2014**, *98*, 6185–6203.

(192) Urlacher, V. B.; Girhard, M. Cytochrome P450 Monooxygenases in Biotechnology and Synthetic Biology. *Trends in Biotechnology* **2019**.

(193) Dong, J.; Fernández-Fueyo, E.; Hollmann, F.; Paul, C. E.; Pesic, M.; Schmidt, S.; Wang, Y.; Younes, S.; Zhang, W. Biocatalytic Oxidation Reactions: A Chemist's Perspective. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57*, 9238–9261.

(194) Nelson, D. R. Cytochrome P450 diversity in the tree of life. *Biochimica et Biophysica Acta* **2018**, *1866*, 141–154.

(195) Podust, L. M.; Sherman, D. H. Diversity of P450 Enzymes in the Biosynthesis of Natural Products. *Natural Product Reports* **2012**, *29*, 1251–1266.

(196) Evans, W. E.; Relling, M. V. Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science* **1999**, *286*, 487–491.

(197) Guengerich, F. P. Cytochromes P450, Drugs, and Diseases. *Molecular Interventions* **2003**, *3*, 194–204.

(198) European Medicines Agency. *Guideline on the investigation of drug interactions*, CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2; European Medicines Agency: London, UK, 2012.

(199) Schroer, K.; Kittelmann, M.; Lütz, S. Recombinant Human Cytochrome P450 Monooxygenases for Drug Metabolite Synthesis. *Biotechnology and Bioengineering* **2010**, *106*, 699–706.

(200) Bernhardt, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of biotechnology* **2006**, *124*, 128–145.

(201) Bureik, M.; Bernhardt, R. *Steroid Hydroxylation: Microbial Steroid Biotransformations Using Cytochrome P450 Enzymes*; Wiley Online Books, 2007.

(202) Donova, M. V.; Egorova, O. V. Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2012**, *94*, 1423–1447.

(203) Szczebara, F. M.; Chandelier, C.; Villeret, C.; Masurel, A.; Bourot, S.; Duport, C.; Blanchard, S.; Groisillier, A.; Testet, E.; Costaglioli, P.; Cauet, G.; Degryse, E.; Balbuena, D.; Winter, J.; Achstetter, T.; Spagnoli, R.; Pompon, D.; Dumas, B. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 143–149.

(204) Sakaki, T. Practical Application of Cytochrome P450. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2012**, *35*, 844–849.

(205) Schuler, M. A. P450s in Plants, Insects, and Their Fungal Pathogens. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*; Ortiz de Montellano, Ed.; Springer International 2015.

(206) Wang, M.; Roberts, D. L.; Paschke, R.; Shea, T. M.; Masters, B. S. S.; Kim, J.-J. P. Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94*, 8411–8416.

(207) Durst, F.; Nelson, D. R. Diversity and Evolution of Plant P450 and P450-Reductases. *Drug Metabolism and Drug Interactions* **1995**, *12*, 189–206.

(208) Paquette, S. M.; Bak, S.; Feyereisen, R. Intron-Exon Organization and Phylogeny in a Large Superfamily, the Paralogous Cytochrome P450 Genes of *Arabidopsis thaliana*. *DNA and Cell Biology* **2000**, *19*, 307–317.

(209) Werck-Reichhart, D.; Feyereisen, R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology* **2000**, *1*, Reviews3003.1-3003.9.

(210) Schuler, M. A.; Werck-Reichhart, D. Functional Genomics of P450s. *Annual Review of Plant Biology* **2003**, *54*, 629–667.

(211) Werck-Reichhart, D.; Bak, S.; Paquette, S. Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book* **2002**, *1*.

(212) Nelson, D.; Werck-Reichhart, D. A P450-Centric View of Plant Evolution. *The Plant Journal* **2011**, *66*, 194–211.

(213) Schuler, M. A.; Duan, H.; Bilgin, M.; Ali, S. *Arabidopsis* cytochrome P450s through the looking glass: a window on plant biochemistry. *Phytochemistry Reviews* **2006**, *5*, 205–237.

(214) Bak, S.; Beisson, F.; Bishop, G.; Hamberger, B.; Höfer, R.; Paquette, S.; Werck-Reichhart, D. Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book* **2011**, *9*.

(215) Schuler, M. A. Plant Cytochrome P450 Monooxygenases. *Critical Reviews in Plant Sciences* **1996**, *15*, 235–284.

(216) Kemper, B. Structural basis for the role in protein folding of conserved proline-rich regions in cytochromes P450. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2004**, *199*, 305–315.

(217) Mizutani, M.; Ward, E.; Ohta, D. cytochrome p450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*: isolation of cDNAs, Differential Expression, and RFLP mapping of multiple cytochromes P450. *Plant Molecular Biology* **1998**, *37*, 39–52.

(218) Park, E.; Rapoport, T. A. Mechanisms of Sec61/SecY-Mediated Protein Translocation Across Membranes. *Annual Review of Biophysics* **2012**, *41*, 21–40.

(219) Lodish, H.; Berk, A.; S Zipursky, L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. *Molecular Cell Biology, 4th Edition*, W. H. Freeman and Company, New York, 2000.

(220) Mizutani, M. Impacts of Diversification of Cytochrome P450 on Plant Metabolism. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2012**, *35*, 824–832.

(221) Paddon, C. J.; Keasling, J. D. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nature Reviews* **2014**, *12*, 355–367.

(222) Ajikumar, P. K.; Xiao, W.-H.; Tyo, K. E. J.; Wang, Y.; Simeon, F.; Leonard, E.; Mucha, O.; Phon, T. H.; Pfeifer, B.; Stephanopoulos, G. Isoprenoid Pathway Optimization for Taxol Precursor Overproduction in *Escherichia coli*. *Science* **2010**, *330*, 70–74.

(223) Biggs, B. W.; Lim, C. G.; Sagliani, K.; Shankar, S.; Stephanopoulos, G.; Mey, M. de; Ajikumar, P. K. 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* **2016**, *113*, 3209–3214.

(224) Mizutani, M.; Sato, F. Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2011**, *507*, 194–203.

(225) Renault, H.; Bassard, J.-E.; Hamberger, B.; Werck-Reichhart, D. Cytochrome P450-mediated metabolic engineering: current progress and future challenges. *Current Opinion in Plant Biology* **2014**, *19*, 27–34.

(226) Wagner, S.; Klepsch, M. M.; Schlegel, S.; Appel, A.; Draheim, R.; Tarry, M.; Hogbom, M.; van Wijk, K. J.; Slotboom, D. J.; Persson, J. O.; Gier, J.-W. de. Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 14371–14376.

(227) Guengerich, F. P.; Waterman, M. R.; Egli, M. Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. *Trends in Pharmacological Sciences* **2016**, *37*, 625–640.

(228) Hausjell, J.; Halbwirth, H.; Spadiut, O. Recombinant production of eukaryotic cytochrome P450s in microbial cell factories. *Bioscience Reports* **2018**, *38*.

(229) Marco, A. de. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* **2009**, *8*, 26.

(230) Woodard, S. I.; Dailey, H. A. Regulation of Heme Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1995**, *316*, 110–115.

(231) Duan, H.; Schuler, M. A. Heterologous expression and strategies for encapsulation of membrane-localized plant P450s. *Phytochemistry Reviews* **2006**, *5*, 507–523.

(232) Zelasko, S.; Palaria, A.; Das, A. Optimizations to achieve high-level expression of cytochrome P450 proteins using *Escherichia coli* expression systems. *Protein Expression and Purification* **2013**, *92*, 77–87.

(233) Kapust, R. B.; Waugh, D. S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein science* **1999**, *8*, 1668–1674.

(234) Nallamsetty, S.; Waugh, D. S. Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners. *Protein Expression and Purification* **2006**, *45*, 175–182.

(235) Vazquez-Albacete, D.; Cavaleiro, A. M.; Christensen, U.; Seppälä, S.; Møller, B. L.; Nørholm, M. H. H. An expression tag toolbox for microbial production of membrane bound plant cytochromes P450. *Biotechnology and Bioengineering* **2017**, *114*, 751–760.

(236) Christensen, U.; Vazquez-Albacete, D.; Søgaard, K. M.; Hobel, T.; Nielsen, M. T.; Harrison, S. J.; Hansen, A. H.; Møller, B. L.; Seppälä, S.; Nørholm, M. H. H. De-bugging and maximizing plant cytochrome P450 production in *Escherichia coli* with C-terminal GFP fusions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2017**, *101*, 4103–4113.

(237) Schafmeister, C. E.; Miercke, L. J.; Stroud, R. M. Structure at 2.5 A of a Designed Peptide that Maintains Solubility of Membrane Proteins. *Science* **1993**, *262*, 734–738.

(238) Mizrachi, D.; Chen, Y.; Liu, J.; Peng, H.-M.; Ke, A.; Pollack, L.; Turner, R. J.; Auchus, R. J.; DeLisa, M. P. Making water-soluble integral membrane proteins *in vivo* using an amphipathic protein fusion strategy. *Nature Communications* **2015**, *6*, 6826.

(239) Rupasinghe, S. G.; Duan, H.; Frericks Schmidt, H. L.; Berthold, D. A.; Rienstra, C. M.; Schuler, M. A. High-yield expression and purification of isotopically labeled cytochrome P450 monooxygenases for solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **2007**, *1768*, 3061–3070.

(240) Bayburt, T. H.; Sligar, S. G. Self-assembly of single integral membrane proteins into soluble nanoscale phospholipid bilayers. *Protein Science* **2003**, *12*, 2476–2481.

(241) Pritchard MP, Ossetian R, Li DN, et al. A General Strategy for the Expression of Recombinant Human Cytochrome P450s in *Escherichia coli* Using Bacterial Signal Peptides: Expression of CYP3A4, CYP2A6, and CYP2E1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1997,** 345(2), 342–354.

(242) Hotze, M.; Schroder, G.; Schroder, J. Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P450 proteins as translational fusions with P450 reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **1995**, *374*, 345–350.

(243) Leonard, E.; Koffas, M. A. G. Engineering of Artificial Plant Cytochrome P450 Enzymes for Synthesis of Isoflavones by *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73*, 7246–7251.

(244) Chang, M. C. Y.; Eachus, R. A.; Trieu, W.; Ro, D.-K.; Keasling, J. D. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nature Chemical Biology* **2007**, *3*, 274–277.

(245) Barnes, H. J.; Arlotto, M. P.; Waterman, M. R. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88*, 5597–5601.

(246) Wachenfeldt, C. von; Richardson, T. H.; Cosme, J.; Johnson, E. F. Microsomal P450 2C3 Is Expressed as a Soluble Dimer in *Escherichia coli* Following Modifications of Its N-terminus. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1997**, *339*, 107–114.

(247) Scott, E. E.; Spatzenegger, M.; Halpert, J. R. A Truncation of 2B Subfamily Cytochromes P450 Yields Increased Expression Levels, Increased Solubility, and Decreased Aggregation While Retaining Function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2001**, *395*, 57–68.

(248) Morrone, D.; Chen, X.; Coates, R. M.; Peters, R. J. Characterization of the kaurene oxidase CYP701A3, a multifunctional cytochrome P450 from gibberellin biosynthesis. *Biochemical Journal* **2010**, *431*, 337–344.

(249) Swaminathan, S.; Morrone, D.; Wang, Q.; Fulton, D. B.; Peters, R. J. CYP76M7 is an ent-cassadiene C11alpha-hydroxylase Defining a Second Multifunctional Diterpenoid Biosynthetic Gene Cluster in Rice. *The Plant Cell* **2009**, *21*, 3315–3325.

(250) Haudenschild, C.; Schalk, M.; Karp, F.; Croteau, R. Functional Expression of Regiospecific Cytochrome P450 Limonene Hydroxylases from Mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2000**, *379*, 127–136.

(251) Rouck, J. E.; Biggs, B. W.; Kambalyal, A.; Arnold, W. R.; Mey, M. de; Ajikumar, P. K.; Das, A. Heterologous expression and characterization of plant Taxadiene-5α-Hydroxylase (CYP725A4) in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **2017**, *132*, 60–67.

(252) Kitaoka, N.; Wu, Y.; Xu, M.; Peters, R. J. Optimization of recombinant expression enables discovery of novel cytochrome P450 activity in rice diterpenoid biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2015**, *99*, 7549–7558.

(253) Miroux, B.; Walker, J. E. 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* **1996**, *260*, 289–298.

(254) Hansen, C. H.; Wittstock, U.; Olsen, C. E.; Hick, A. J.; Pickett, J. A.; Halkier, B. A. Cytochrome P450 CYP79F1 from *Arabidopsis* Catalyzes the Conversion of Dihomomethionine and Trihomomethionine to the Corresponding Aldoximes in the Biosynthesis of Aliphatic Glucosinolates. *The Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 11078–11085.

(255) Graham, S. E.; Peterson, J. A. How Similar Are P450s and What Can Their Differences Teach Us? *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1999**, *369*, 24–29.

(256) Morohashi, K.-i.; Sogawa, K.; Omura, T.; Fujii-Kuriyama, Y. Gene Structure of Human Cytochrome P-450(SCC), Cholesterol Desmolase. *The Journal of Biochemistry* **1987**, *101*, 879–887.

(257) Leys, D.; Mowat, C. G.; McLean, K. J.; Richmond, A.; Chapman, S. K.; Walkinshaw, M. D.; Munro, A. W. Atomic Structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP121 to 1.06 A Reveals Novel Features of Cytochrome P450. *The Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 5141–5147.

(258) Smith, B. D.; Sanders, J. L.; Porubsky, P. R.; Lushington, G. H.; Stout, C. D.; Scott, E. E. Structure of the Human Lung Cytochrome P450 2A13. *The Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 17306–17313.

(259) Auclair, K.; Moënne-Loccoz, P.; Ortiz de Montellano, P. R. Roles of the Proximal Heme Thiolate Ligand in Cytochrome $P450_{cam}$. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 4877–4885.

(260) Sirim, D.; Widmann, M.; Wagner, F.; Pleiss, J. Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases. *BMC Structural Biology* **2010**, *10*, 34.

(261) Mestres, J. Structure Conservation in Cytochromes P450. *Proteins* **2005**, *58*, 596–609.

(262) Munro, A. W.; Girvan, H. M.; Mason, A. E.; Dunford, A. J.; McLean, K. J. What makes a P450 tick? *Trends in Biochemical Sciences* **2013**, *38*, 140–150.

(263) Poulos, T. L.; Johnson, E. F. Structures of Cytochrome P450 Enzymes. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*; Ortiz de Montellano, Ed.; Springer International 2015.

(264) Hasemann, C. A.; Kurumbail, R. G.; Boddupalli, S. S.; Peterson, J. A.; Deisenhofer, J. Structure and function of cytochromes P450:a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* **1995**, *3*, 41–62.

(265) Yeom, H.; Sligar, S. G.; Li, H.; Poulos, T. L.; Fulco, A. J. The Role of Thr268 in Oxygen Activation of Cytochrome $P450_{BM-3}$. *Biochemistry* **1995**, *34*, 14733–14740.

(266) Peterson, J. A.; Graham, S. E. A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes P450. *Structure* **1998**, *6*, 1079–1085.

(267) Gotoh, O. Substrate Recognition Sites in Cytochrome P450 Family 2 (CYP2) Proteins Inferred from Comparative Analyses of Amino Acid and Coding Nucleotide Sequences. *The Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 83–90.

(268) Poulos, T. L.; Finzel, B. C.; Howard, A. J. Crystal Structure of Substrate-Free *Pseudomonas putida* Cytochrome P-450. *Biochemistry* **1986**, *25*, 5314–5322.

(269) Lee, Y.-T.; Wilson, R. F.; Rupniewski, I.; Goodin, D. B. P450cam Visits an Open Conformation in the Absence of Substrate. *Biochemistry* **2010**, *49*, 3412–3419.

(270) Denisov, I. G.; Sligar, S. G. Activation of Molecular Oxygen in Cytochromes P450. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*; Ortiz de Montellano, Ed.; Springer International 2015.

(271) Bernhardt, R. Cytochrome P450: Structure, Function, and Generation of Reactive Oxygen Species. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology* **1996**, *127*, 137-221.

(272) Krest, C. M.; Onderko, E. L.; Yosca, T. H.; Calixto, J. C.; Karp, R. F.; Livada, J.; Rittle, J.; Green, M. T. Reactive Intermediates in Cytochrome P450 Catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 17074–17081.

(273) Sligar, S. G. Coupling of Spin, Substrate, and Redox Equilibriums in Cytochrome P450. *Biochemistry* **1976**, *15*, 5399–5406.

(274) Daff, S. N.; Chapman, S. K.; Turner, K. L.; Holt, R. A.; Govindaraj, S.; Poulos, T. L.; Munro, A. W. Redox Control of the Catalytic Cycle of Flavocytochrome P-450 BM3. *Biochemistry* **1997**, *36*, 13816–13823.

(275) Ibrahim, M.; Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Kincaid, J. R.; Sligar, S. G. Resonance Raman Spectroscopic Studies of Hydroperoxo-Myoglobin at Cryogenic Temperatures. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 13714–13718.

(276) Denisov, I. G.; Mak, P. J.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Kincaid, J. R. Resonance Raman Characterization of the Peroxo and Hydroperoxo Intermediates in Cytochrome P450. *The Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112*, 13172–13179.

(277) Dawson, J. H.; Holm, R. H.; Trudell, J. R.; Barth, G.; Linder, R. E.; Bunnenberg, E.; Djerassi, C.; Tang, S. C. Magnetic circular dichroism studies. 43. Oxidized Cytochrome P-450. Magnetic Circular Dichroism Evidence for Thiolate Ligation in the Substrate-Bound Form. Implications for the Catalytic Mechanism. *Journal of the American Chemical Society* **1976**, *98*, 3707–3709.

(278) Ogliaro, F.; Visser, S. P. de; Shaik, S. The 'push' effect of the thiolate ligand in cytochrome P450: a theoretical gauging. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2002**, *91*, 554–567.

(279) Rittle, J.; Green, M. T. Cytochrome P450 Compound I: Capture, Characterization, and C-H Bond Activation Kinetics. *Science* **2010**, *330*, 933.

(280) Rittle, J.; Younker, J. M.; Green, M. T. Cytochrome P450: the Active Oxidant and its Spectrum. *Inorganic Chemistry* **2010**, *49*, 3610–3617.

(281) Groves, J. T. High-valent iron in chemical and biological oxidations. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006**, *100*, 434–447.

(282) Green, M. T.; Dawson, J. H.; Gray, H. B. Oxoiron(IV) in Chloroperoxidase Compound II Is Basic: Implications for P450 Chemistry. *Science* **2004**, *304*, 1653.

(283) Green, M. T. C-H bond activation in heme proteins: the role of thiolate ligation in cytochrome P450. *Current Opinion in Chemical Biology* **2009**, *13*, 84–88.

(284) Groves, J. T.; McClusky, G. A. Aliphatic Hydroxylation by Highly Purified Liver Microsomal Cytochrome P-450. Evidence for a Carbon Radical Intermediate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1978**, *81*, 154–160.

(285) Groves, J. T. Key Elements of the Chemistry of Cytochrome P-450: The Oxygen Rebound Mechanism. *Journal of Chemical Education* **1985**, *62*, 928.

(286) Ogliaro, F.; Harris, N.; Cohen, S.; Filatov, M.; Visser, S. P. de; Shaik, S. A Model "Rebound" Mechanism of Hydroxylation by Cytochrome P450: Stepwise and Effectively Concerted Pathways, and Their Reactivity Patterns. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 8977–8989.

(287) Varfaj, F.; Zulkifli, S. N. A.; Park, H.-G.; Challinor, V. L.; Voss, J. J. de; Ortiz de Montellano, P. R. Carbon-Carbon Bond Cleavage in Activation of the Prodrug Nabumetone. *Drug Metabolism and Disposition* **2014**, *42*, 828–838.

(288) Nakajin, S.; Hall, P. F.; Onoda, M. Testicular Microsomal Cytochrome P-450 for C21 Steroid Side Chain Cleavage. Spectral and Binding Studies. *The Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256*, 6134–6139.

(289) Akhtar, M.; Corina, D. L.; Miller, S. L.; Shyadehi, A. Z.; Wright, J. N. Incorporation of Label from $^{18}O_2$ into Acetate during Side-chain Cleavage Catalysed by Cytochrome P-$450_{17\alpha}$ (17α-hydroxylase-17,20-lyase). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1994,** *3*, 263–267.

(290) Akhtar, M.; Wright, J. N.; Lee-Robichaud, P. A review of mechanistic studies on aromatase (CYP19) and 17α-hydroxylase-17,20-lyase (CYP17). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2011**, *125*, 2–12.

(291) Urlacher, V. B.; Girhard, M. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends in Biotechnology* **2012**, *30*, 26–36.

(292) Porter, T. D. The Roles of Cytochrome b5 in Cytochrome P450 Reactions. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **2002**, *16*, 311–316.

(293) Jensen, K.; Møller, B. L. Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 132–141.

(294) Urban, P.; Mignotte, C.; Kazmaier, M.; Delorme, F.; Pompon, D. 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* **1997**, *272*, 19176–19186.

(295) Mizutani, M.; Ohta, D. Diversification of P450 Genes During Land Plant Evolution. *Annual Review of Plant Biology* **2010**, *61*, 291–315.

(296) Varadarajan, J.; Guilleminot, J.; Saint-Jore-Dupas, C.; Piégu, B.; Chabouté, M.-E.; Gomord, V.; Coolbaugh, R. C.; Devic, M.; Delorme, V. ATR3 encodes a diflavin reductase essential for *Arabidopsis* embryo development. *New Phytologist* **2010**, *187*, 67–82.

(297) Meijer, A. H.; Cardoso, M. I. L.; Voskuilen, J. T.; Waal, A. de; Verpoorte, R.; Hoge, J. H. C. Isolation and characterization of a cDNA clone from *Catharanthus roseus* encoding NADPH:cytochrome P-450 reductase, an enzyme essential for reactions catalysed by cytochrome P-450 mono-oxygenases in plants. *The Plant Journal* **1993**, *4*, 47–60.

(298) Parage, C.; Foureau, E.; Kellner, F.; Burlat, V.; Mahroug, S.; Lanoue, A.; Dugé de Bernonville, T.; Londono, M. A.; Carqueijeiro, I.; Oudin, A.; Besseau, S.; Papon, N.; Glévarec, G.; Atehortùa, L.; Giglioli-Guivarc'h, N.; St-Pierre, B.; Clastre, M.; O'Connor, S. E.; Courdavault, V. Class II Cytochrome P450 Reductase Governs the Biosynthesis of Alkaloids. *Plant Physiology* **2016**, *172*, 1563–1577.

(299) Koopmann, E.; Hahlbrock, K. Differentially regulated NADPH:cytochrome P450 oxidoreductases in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94*, 14954.

(300) Narhi, L. O.; Fulco, A. J. Characterization of a Catalytically Self-sufficient 119,000-Dalton Cytochrome P-450 Monooxygenase Induced by Barbiturates in *Bacillus megaterium*. *The Journal of Biological Chemistry* **1986**, *261*, 7160–7169.

(301) Narhi, L. O.; Fulco, A. J. Identification and Characterization of Two Functional Domains in Cytochrome P-450$_{BM-3}$, a Catalytically Self-sufficient Monooxygenase Induced by Barbiturates in *Bacillus megaterium*. *The Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 6683–6690.

(302) Munro, A. W.; Daff, S.; Coggins, J. R.; Lindsay, J. G.; Chapman, S. K. Probing electron transfer in flavocytochrome *P*-450 BM3 and its component domains. *European Journal of Biochemistry* **1996**, *239*, 403–409.

(303) Noble, M. A.; Miles, C. S.; Chapman, S. K.; Lysek, D. A.; MacKay, A. C.; Reid, G. A.; Hanzlik, R. P.; Munro, A. W. Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3. *Biochemical Journal* **1999**, *339 (Pt 2)*, 371–379.

(304) Blattner, F. R.; Plunkett, G.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B.; Shao, Y. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **1997**, *277*, 1453.

(305) Keseler, I. M.; Mackie, A.; Santos-Zavaleta, A.; Billington, R.; Bonavides-Martínez, C.; Caspi, R.; Fulcher, C.; Gama-Castro, S.; Kothari, A.; Krummenacker, M.; Latendresse, M.; Muñiz-Rascado, L.; Ong, Q.; Paley, S.; Peralta-Gil, M.; Subhraveti, P.; Velázquez-Ramírez, D. A.; Weaver, D.; Collado-Vides, J.; Paulsen, I.; Karp, P. D. The EcoCyc database: reflecting new knowledge about *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research* **2016**, *45*, D543-D550.

(306) Nelson, D. R. The Cytochrome P450 Homepage. *Human Genomics* **2009**, *4*, 59–65.

(307) Bjellqvist, B.; Hughes, G. J.; Pasquali, C.; Paquet, N.; Ravier, F.; Sanchez, J.-C.; Frutiger, S.; Hochstrasser, D. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* **1993**, *14*, 1023–1031.

(308) Heijne, G. The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *The EMBO Journal* **1986**, *5*, 3021–3027.

(309) Heijne, G. von. Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* **1989**, *341*, 456–458.

(310) The UniProt Consortium UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research* **2017**, *45*, D158-D169.

(311) Kyte, J.; Doolittle, R. F. A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein. *Journal of Molecular Biology* **1982**, *157*, 105–132.

(312) Hopp, T. P.; Woods, K. R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1981**, *78*, 3824–3828.

(313) Krogh, A.; Larsson, B.; Heijne, G. von; Sonnhammer, E. L. Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes. *Journal of Molecular Miology* **2001**, *305*, 567–580.

(314) Needleman, S. B.; Wunsch, C. D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* **1970**, *48*, 443–453.

(315) Wong, J. T. Evolution of the genetic code. *Microbiological Sciences* **1988**, *5*, 174–181.

(316) Varenne, S.; Buc, J.; Lloubes, R.; Lazdunski, C. Translation is a Non-uniform Process. Effect of tRNA Availability on the Rate of Elongation of Nascent Polypeptide Chains. *Journal of Molecular Biology* **1984**, *180*, 549–576.

(317) Marin, M. Folding at the rhythm of the rare codon beat. *Biotechnology Journal* **2008**, *3*, 1047–1057.

(318) Rosano, G. L.; Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology* **2014**, *5*, 172.

(319) Wells, A. V.; Li, P.; Champion, P. M.; Martinis, S. A.; Sligar, S. G. Resonance Raman investigations of *Escherichia coli*-expressed *Pseudomonas putida* cytochrome P450 and P420. *Biochemistry* **1992**, *31*, 4384–4393.

(320) Martinis, S. A.; Blanke, S. R.; Hager, L. P.; Sligar, S. G.; Hoa, G. H.; Rux, J. J.; Dawson, J. H. Probing the Heme Iron Coordination Structure of Pressure-Induced Cytochrome $P420_{cam}$. *Biochemistry* **1996**, *35*, 14530–14536.

(321) Craft, D. L.; Madduri, K. M.; Eshoo, M.; Wilson, C. R. Identification and Characterization of the CYP52 Family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, Important for the Conversion of

Fatty Acids and Alkanes to α,ω-Dicarboxylic Acids. *Applied and Environmental Microbiology* **2003**, *69*, 5983–5991.

(322) Omura, T.; Sato, R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment Of Liver Microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* **1964**, *239*, 2379–2385.

(323) Vetter, H.-P.; Mangold, U.; Schröder, G.; Marner, F.-J.; Werck-Reichhart, D.; Schröder, J. Molecular Analysis and Heterologous Expression of an Inducible Cytochrome P-450 Protein from Periwinkle. *Plant Physiol.* **1992**, *100*, 998.

(324) Looman, A. C.; Bodlaender, J.; Comstock, L. J.; Eaton, D.; Jhurani, P.; Boer, H. A. de; van Knippenberg, P. H. Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified lacZ gene in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* **1987**, *6*, 2489–2492.

(325) Knight, A. M.; Culviner, P. H.; Kurt-Yilmaz, N.; Zou, T.; Ozkan, S. B.; Cavagnero, S. Electrostatic Effect of the Ribosomal Surface on Nascent Polypeptide Dynamics. *ACS Chemical Biology* **2013**, *8*, 1195–1204.

(326) Gursky, O.; Atkinson, D. Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 2991.

(327) Girhard, M.; Klaus, T.; Khatri, Y.; Bernhardt, R.; Urlacher, V. B. Characterization of the versatile monooxygenase CYP109B1 from *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2010**, *87*, 595–607.

(328) Bühler, C. von; Le-Huu, P.; Urlacher, V. B. Cluster Screening: An Effective Approach for Probing the Substrate Space of Uncharacterized Cytochrome P450s. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2189–2198.

(329) Kranz-Finger, S.; Mahmoud, O.; Ricklefs, E.; Ditz, N.; Bakkes, P. J.; Urlacher, V. B. Insights into the functional properties of the marneral oxidase CYP71A16 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2018**, *1866*, 2–10.

(330) Bakkes, P. J.; Riehm, J. L.; Sagadin, T.; Rühlmann, A.; Schubert, P.; Biemann, S.; Girhard, M.; Hutter, M. C.; Bernhardt, R.; Urlacher, V. B. Engineering of versatile redox partner fusions that support monooxygenase activity of functionally diverse cytochrome P450s. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 9570.

(331) Nagao, T.; Mitamura, T.; Wang, X. H.; Negoro, S.; Yomo, T.; Urabe, I.; Okada, H. Cloning, Nucleotide Sequences, and Enzymatic Properties of Glucose Dehydrogenase Isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030. *Journal of Bacteriology* **1992**, *174*, 5013–5020.

(332) Girhard, M.; Klaus, T.; Khatri, Y.; Bernhardt, R.; Urlacher, V. B. Characterization of the versatile monooxygenase CYP109B1 from *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2010**, *87*, 595–607.

(333) Grinkova, Y. V.; Denisov, I. G.; Sligar, S. G. Functional reconstitution of monomeric CYP3A4 with multiple cytochrome P450 reductase molecules in Nanodiscs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, *398*, 194–198.

(334) Hawkes, D. B.; Slessor, K. E.; Bernhardt, P. V.; Voss, J. J. de. Cloning, Expression and Purification of Cindoxin, an Unusual Fmn-Containing Cytochrome P450 Redox Partner. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1107–1114.

(335) Jarrett, J. T.; Wan, J. T. Thermal inactivation of reduced ferredoxin (flavodoxin):NADP+ oxidoreductase from *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **2002**, *529*, 237–242.

(336) Tadross, M.; Randriamarolaza, L.; Rabefitia, Z. & Zheng, K. Y. Climate Change in Madagascar: Recent Past and Future. *Meteo Malgasy* **2008**, 1–18.

(337) Su, Z.; Horner, J. H.; Newcomb, M. Rates of Fatty Acid Oxidations by P450 Compound I are pH Dependent. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2061–2064.

(338) Voznesensky, A. I.; Schenkman, J. B. Quantitative Analyses of Electrostatic Interactions between NADPH-Cytochrome P450 Reductase and Cytochrome P450 Enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 15724–15731.

(339) Schenkman, J. B.; Voznesensky, A. I.; Jansson, I. Influence of Ionic Strength on the P450 Monooxygenase Reaction and Role of Cytochrome b_5 in the Process. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1994**, *314*, 234–241.

(340) Yun, C. H.; Song, M.; Ahn, T.; Kim, H. Conformational Change of Cytochrome P450 1A2 Induced by Sodium Chloride. *The Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 31312–31316.

(341) Green, A. A. The Preparation of Acetate and Phosphate Buffer Solutions of Known PH and Ionic Strength. *Journal of the American Chemical Society* **1933**, *55*, 2331–2336.

(342) Madyastha, K. M.; Guarnaccia, R.; Coscia, C. J. Enzymic Synthesis of Loganin by Carboxyl Group Methylation of Loganic Acid. *FEBS Letters* **1971**, *14*, 175–177.

(343) Schröder, G.; Unterbusch, E.; Kaltenbach, M.; Schmidt, J.; Strack, D.; Luca, V. de; Schröder, J. Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase. *FEBS Letters* **1999**, *458*, 97–102.

(344) Yamazaki, S.; Sato, K.; Suhara, K.; Sakaguchi, M.; Mihara, K.; Omura, T. Importance of the Proline-Rich Region Following Signal-Anchor Sequence in the Formation of Correct Conformation of Microsomal Cytochrome P-450s. *Journal of Biochemistry* **1993**, *114*, 652–657.

(345) Kusano, K.; Sakaguchi, M.; Kagawa, N.; Waterman, M. R.; Omura, T. Microsomal P450s Use Specific Proline-Rich Sequences for Efficient Folding, but Not for Maintenance of the Folded Structure. *Journal of Biochemistry* **2001**, *129*, 259–269.

(346) Dill, K. A. Dominant Forces in Protein Folding. *Biochemistry* **1990**, *29*, 7133–7155.

(347) Zbilut, J. P.; Giuliani, A.; Colosimo, A.; Mitchell, J. C.; Colafranceschi, M.; Marwan, N.; Webber, C. L., JR; Uversky, V. N. Charge and Hydrophobicity Patterning along the Sequence Predicts the Folding Mechanism and Aggregation of Proteins: A Computational Approach. *Journal of Proteome Research* **2004**, *3*, 1243–1253.

(348) Shamsi, T. N.; Athar, T.; Parveen, R.; Fatima, S. A Review on Protein Misfolding, Aggregation and Strategies to Prevent Related Ailments. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *105*, 993–1000.

(349) Englander, S. W.; Mayne, L. The nature of protein folding pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111*, 15873–15880.

(350) Singh, S.; Mittal, A. Transmembrane Domain Lengths Serve as Signatures of Organismal Complexity and Viral Transport Mechanisms. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 22352.

(351) Hlavica, P.; Schulze, J.; Lewis, D. F. V. Functional interaction of cytochrome P450 with its redox partners: a critical assessment and update of the topology of predicted contact regions. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2003**, *96*, 279–297.

(352) Denisov, I. G.; Baas, B. J.; Grinkova, Y. V.; Sligar, S. G. Cooperativity in Cytochrome P450 3A4: Linkages in Substrate Binding, Spin State, Uncoupling, and Product Formation. *The Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 7066–7076.

(353) Zhang, W.; Liu, Y.; Yan, J.; Cao, S.; Bai, F.; Yang, Y.; Huang, S.; Yao, L.; Anzai, Y.; Kato, F.; Podust, L. M.; Sherman, D. H.; Li, S. New Reactions and Products Resulting from Alternative Interactions between the P450 Enzyme and Redox Partners. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 3640–3646.

(354) Anzai, Y.; Li, S.; Chaulagain, M. R.; Kinoshita, K.; Kato, F.; Montgomery, J.; Sherman, D. H. Functional Analysis of MycCI and MycG, Cytochrome P450 Enzymes involved in Biosynthesis of Mycinamicin Macrolide Antibiotics. *Chemistry & Biology* **2008**, *15*, 950–959.

(355) Hakki, T.; Zearo, S.; Drăgan, C.-A.; Bureik, M.; Bernhardt, R. Coexpression of redox partners increases the hydrocortisone (cortisol) production efficiency in CYP11B1 expressing fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biotechnology* **2008**, *133*, 351–359.

(356) Brignac-Huber, L. M.; Park, J. W.; Reed, J. R.; Backes, W. L. Cytochrome P450 Organization and Function Are Modulated by Endoplasmic Reticulum Phospholipid Heterogeneity. *Drug Metabolism and Disposition* **2016**, *44*, 1859–1866.

(357) Šrejber, M.; Navrátilová, V.; Paloncýová, M.; Bazgier, V.; Berka, K.; Anzenbacher, P.; Otyepka, M. Membrane-attached mammalian cytochromes P450: An overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2018**, *183*, 117–136.

(358) Hlavica, P. Mechanistic Basis of Electron Transfer to Cytochromes P450 by Natural Redox Partners and Artificial Donor Constructs. *Advances in experimental medicine and biology* **2015**, *851*, 247–297.

(359) Gricman, Ł.; Weissenborn, M. J.; Hoffmann, S. M.; Borlinghaus, N.; Hauer, B.; Pleiss, J. Redox Partner Interaction Sites in Cytochrome P450 Monooxygenases: *In Silico* Analysis and Experimental Validation. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 1243–1251.

(360) Jenkins, C. M.; Waterman, M. R. NADPH-Flavodoxin Reductase and Flavodoxin from *Escherichia coli*: Characteristics as a Soluble Microsomal P450 Reductase. *Biochemistry* **1998**, *37*, 6106–6113.

(361) Zhou, H.-X.; Rivas, G.; Minton, A. P. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annual Review of Biophysics* **2008**, *37*, 375–397.

(362) *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry;* Ortiz de Montellano, PR, Ed.; Springer International 2015.

(363) Ho, H. K.; Chan, J. C. Y.; Hardy, K. D.; Chan, E. C. Y. Mechanism-based inactivation of CYP450 enzymes: a case study of lapatinib. *Drug Metabolism Reviews* **2015**, *47*, 21–28.

(364) Albertolle, M. E.; Peter Guengerich, F. The Relationships Between Cytochromes P450 and H_2O_2: Production, Reaction, and Inhibition. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2018**, *186*, 228–234.

(365) Albertolle, M. E.; Kim, D.; Nagy, L. D.; Yun, C.-H.; Pozzi, A.; Savas, Ü.; Johnson, E. F.; Guengerich, F. P. Heme-thiolate sulfenylation of human cytochrome P450 4A11 functions as a redox switch for catalytic inhibition. *The Journal of Biological Chemistry* **2017**, *292*, 11230–11242.

(366) Albertolle, M. E.; Phan, T. T. N.; Pozzi, A.; Guengerich, F. P. Sulfenylation of Human Liver and Kidney Microsomal Cytochromes P450 and Other Drug-Metabolizing Enzymes as a Response to Redox Alteration. *Molecular & Cellular Proteomics* **2018**, *17*, 889–900.

(367) Nastaincyk, W.; Ruf, H. H.; Ullrich, V. Ligand Binding of Organic Sulfides to Microsomal Cytochrome P-450. *European Journal of Biochemistry* **1975**, *60*, 615–620.

(368) Sung, P.-H.; Huang, F.-C.; Do, Y.-Y.; Huang, P.-L. Functional Expression of Geraniol 10-Hydroxylase Reveals its Dual Function in the Biosynthesis of Terpenoid and Phenylpropanoid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 4637–4643.

(369) Chang, B.S.; Mahoney, R. R. Enzyme thermostabilization by bovine serum albumin and other proteins: evidence for hydrophobic interactions. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **1995**, *22*, 203–214.

(370) Billingsley, J. M.; DeNicola, A. B.; Barber, J. S.; Tang, M.-C.; Horecka, J.; Chu, A.; Garg, N. K.; Tang, Y. Engineering the biocatalytic selectivity of iridoid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering* **2017**, *44*, 117–125.

(371) Kunjapur, A. M.; Hyun, J. C.; Prather, K. L. J. Deregulation of S-adenosylmethionine biosynthesis and regeneration improves methylation in the *E. coli de novo* vanillin biosynthesis pathway. *Microbial Cell Factories* **2016**, *15*, 61.

(372) Morris, J. S.; Groves, R. A.; Hagel, J. M.; Facchini, P. J. An N-methyltransferase from *Ephedra sinica* catalyzing the formation of ephedrine and pseudoephedrine enables microbial phenylalkylamine production. *The Journal of Biological Chemistry* **2018**, *293*, 13364–13376.

(373) Heo, K. T.; Kang, S.-Y.; Hong, Y.-S. De novo biosynthesis of pterostilbene in an *Escherichia coli* strain using a new resveratrol O-methyltransferase from *Arabidopsis*. *Microbial Cell Factories* **2017**, *16*, 30.

(374) Brennan, T. C. R.; Turner, C. D.; Krömer, J. O.; Nielsen, L. K. Alleviating Monoterpene Toxicity Using a Two-Phase Extractive Fermentation for the Bioproduction of Jet Fuel Mixtures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* **2012**, *109*, 2513–2522.

(375) Gibson, D. G.; Young, L.; Chuang, R.-Y.; Venter, J. C.; Hutchison, C. A.; Smith, H. O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* **2009**, *6*, 343–345.

(376) Bradford, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248–254.

(377) Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.

(378) Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nature Methods* **2012,** 9(7), 671–675.

(379) Sielaff, B.; Andreesen, J. R.; Schräder, T. A cytochrome P450 and a ferredoxin isolated from *Mycobacterium* sp. strain HE5 after growth on morpholine. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001**, *56*, 458–464.

(380) Sasaki, M.; Akahira, A.; Oshiman, K.-i.; Tsuchido, T.; Matsumura, Y. Purification of Cytochrome P450 and Ferredoxin, Involved in Bisphenol A Degradation, from *Sphingomonas* sp. strain AO1. *Applied and Environmental Microbiology* **2005**, *71*, 8024–8030.

(381) McIver, L.; Leadbeater, C.; Campopiano, D. J.; Baxter, R. L.; Daff, S. N.; Chapman, S. K.; Munro, A. W. Characterisation of flavodoxin NADP+ oxidoreductase and flavodoxin; key components of electron transfer in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **1998**, *257*, 577–585.

(382) Lawson, R. J.; Wachenfeldt, C. von; Haq, I.; Perkins, J.; Munro, A. W. Expression and Characterization of the Two Flavodoxin Proteins of *Bacillus subtilis*, YkuN and YkuP:

Biophysical Properties and Interactions with Cytochrome P450 Biol. *Biochemistry* **2004**, *43*, 12390–12409.

(383) Wang, Z.-Q.; Lawson, R. J.; Buddha, M. R.; Wei, C.-C.; Crane, B. R.; Munro, A. W.; Stuehr, D. J. Bacterial Flavodoxins Support Nitric Oxide Production by *Bacillus subtilis* Nitric-oxide Synthase. *The Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 2196–2202.

(384) Rappsilber, J.; Ishihama, Y.; Mann, M. Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 663–670.

(385) Rappsilber, J.; Mann, M.; Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols* **2007**, *2*, 1896–1906.

(386) van der Sluis, W. G.; van der Nat, J. M.; Labadie, R. P. Thin-layer chromatographic bioassay of iridoid and secoiridoid glucosides with a fungitoxic aglucone moiety using β-glucosidase and the fungus *Penicillium expansum* as a test organism. *Journal of Chromatography A* **1983**, *259*, 522–526.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
7-DLGT	7-Deoxyloganetinsäure-Glykosyltransfease
A. annua	*Artemisia annua*
AS	Aminosäure
A. thaliana	*Arabidopsis thaliana*
B. megaterium	*Bacillus megaterium*
BM3	CYP102A1 aus *Bacillus megaterium*
BSA	Rinderserumalbumin
B. subtilis	*Bacillus subtilis*
B. taurus	*Bos taurus*
cDNA	complementary DNA
CMC	kritische Mizellenkonzentration
CPR	NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase
CrPrx1	*C. roseus* Peroxidase
C. roseus	*Catharanthus roseus*
C. tropicalis	*Candida tropicalis*
$Cytb_5$	Cytochrom b5
DC	Dünnschichtchromatographie
ddH2O	doppelt destilliertes Wasser
dH2O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	*Electrospray ionization*
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fdx	Ferredoxin
Fld	Flavodoxin
FMN	Flavin-Adenin-Mononukleotid
FpR	NADPH-Flavodoxin Reduktase aus *E. coli*
FSME	Ferulasäuremethylester
FPLC	*Fast protein liquid chromatography*
GDH	Glucose-Dehydrogenase
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HIV	*Human immunodeficiency virus*
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IPAP	interne Phloem-assoziierte Parenchymzellen
LAMT	O-Methyltransferase
LC/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
MBP	*Maltose-binding protein*
MIA	Monoterpen-Indolalkaloide
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OD_{600}	Optischen Dichte bei 600 nm
P450	Cytochrom-P450-Monooxygenase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pIc	berechneter Isoelektrischer Punkt

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Redoxpartner
RPM	Umdrehungen pro Minute
R. serpentina	*Rauvolfia serpentina*
SAMT	Salicylsäure-Methyltransferase
SDG	Strictosidin-Deglykosylase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIM	*selected ion monitoring*
SPE	Festphasenextraktion
SPME	Festphasenmikroextraktion
STR	Strictosidin-Synthase
TDC	Tryptophan-Decarboxylase
TIA	Terpenindolalkaloide
TIC	*total ion current*
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
VIGS	*virus induced gene silencing*
YkuN	Flavodoxin aus *B. subtilis*

Abkürzungen für verwendete Einheiten

m/z	Masse-zu-Ladungs Verhältnis
aU	arbitrary Units
L	Liter
M	Molar, 1 Mol pro L
h	Stunde
s	Sekunde
K	Kelvin
°C	Grad Celsius
mol	Mol, Stoffmenge
g	Gramm
Da	Dalton
U	Unit

Verwendete Präfixe für SI-Einheiten

M	Mega, $x10^{6}$
k	Kilo, $x10^{3}$
m	Milli, $x10^{-3}$
µ	Mikro, $x10^{-6}$
n	Nano, $x10^{-9}$

Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin

G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

8.2 Zusätzliche Informationen

8.2.1 Heterologe Herstellung der *C. roseus* LAMT in *E. coli* und Reinigung

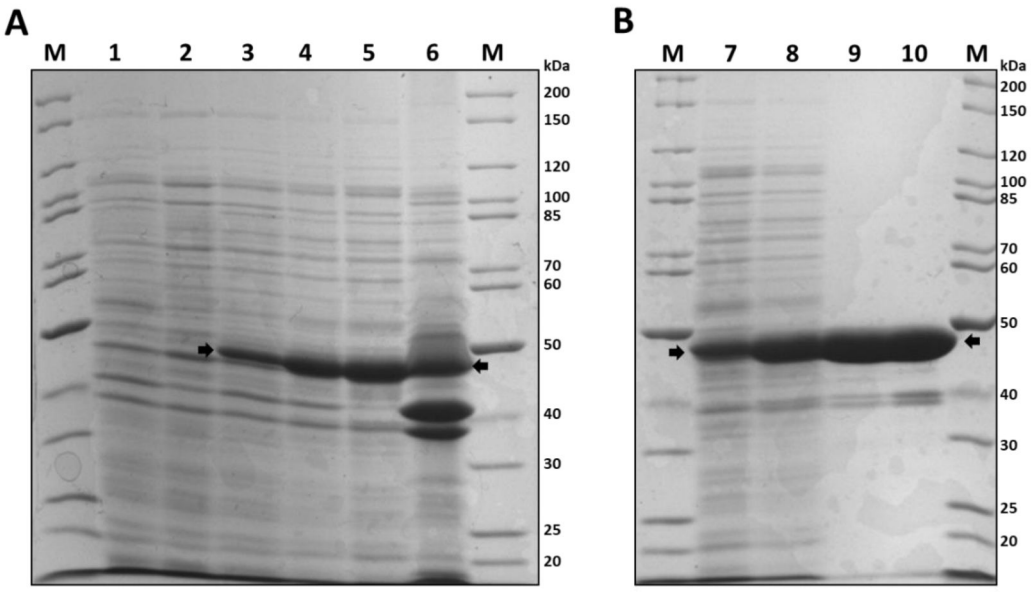

Abbildung 8.1 SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) zur Analyse der A) Expression *E. coli* BL21(DE3) pET28a_N6His_LAMT und B) Reinigung mittels IMAC. Gezeigt ist das SDS-Polyacrylamidgel der A) Expression und der B) Reinigung mittels IMAC. Folgende Proben wurden aufgetragen: Komigrationsstandard, *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (M), pET28a(+) in BL21(DE3) nach 24h (1), vor Induktion der Expression (2), 3 h (3), 24 h (4) nach Induktion der Expression, Lysat nach 24 h (5), unlösliche Bestandteile nach 24 h (6), Durchfluss nach Auftrag des filtrierten Lysats auf die Ni-NTA beladene Säule (7), Waschen mit 20 mM (8) oder 50 mM (9) Imidazol haltigem in IMAC-Puffer A, Eluat (10). Die Höhe der Banden des Zielproteins ist mit Pfeilen markiert.

8.2.2 Heterologe Produktion der *R. serpentina* STR in *E. coli* BL21(DE3) und Reinigung

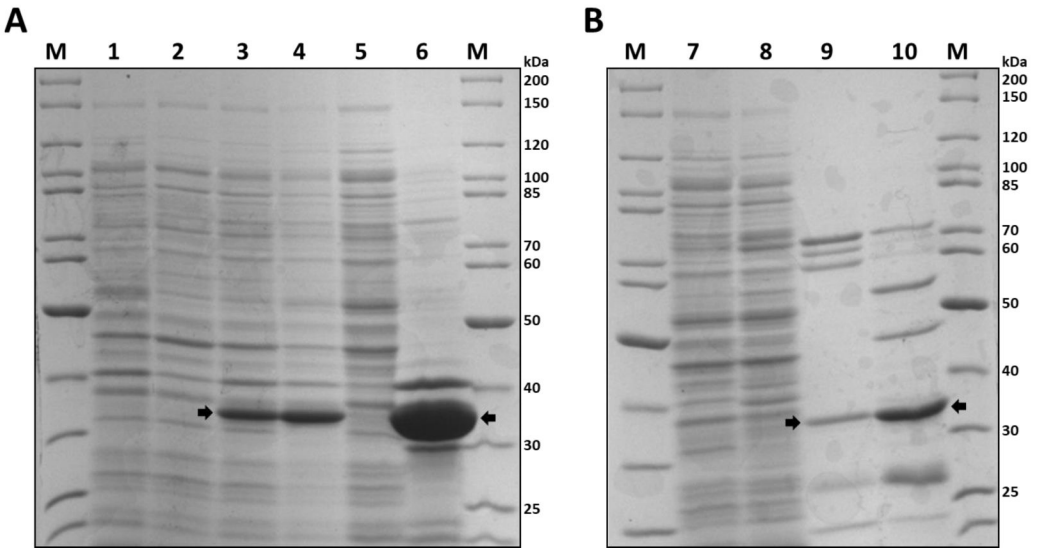

Abbildung 8.2 SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) zur Analyse der Expression *E. coli* BL21(DE3) pET28a_STR_N6His und Reinigung mittels IMAC. Gezeigt ist das SDS-Polyacrylamidgel der A) Expression und der B) Reinigung mittels IMAC. Folgende Proben wurden aufgetragen: Komigrationsstandard, *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (M), Leervektorkontrolle nach 24h (1), vor Induktion der Expression (2), 3h (3) und 24h (4) nach Induktion der Expression, Lysat nach 24 Stunden (5), unlösliche Bestandteile der Zellextrakte nach 24h (6), Durchfluss nach Auftrag des filtrierten Lysats auf die Ni-NTA beladene Säule (7), Waschen mit 20 mM (8) und 50 mM (9) Imidazol haltigem in IMAC-Puffer A, Eluat (10). Die Höhe der Banden des Zielproteins ist mit Pfeilen markiert.

8.2.3 Stabilität von Loganinsäure, Loganin und Ferulasäuremethylester

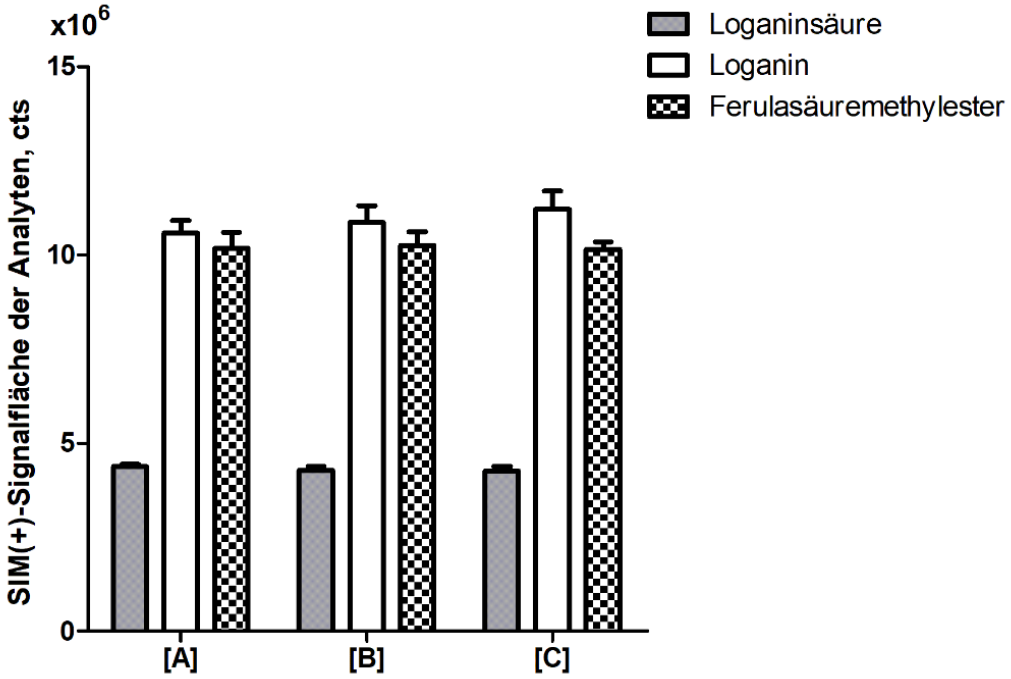

Abbildung 8.3 Stabilität von Loganinsäure, Loganin und Ferulasäuremethylester. Gezeigt sind die integrierten Signalflächen aus der LC/MS-Analyse von Proben von 250 µM Loganinsäure, 250 µM Loganin 150 µM Ferulasäuremethylester mit Natriumacetat-Puffer, 2,4-DNPH und Acetonitril nach A) Lagerung bei -20 °C bis zur Gefriertrocknung und Analyse, B) Inkubation für 2 h bei 40 °C und Lagerung bei -20 °C bis zur Gefriertrocknung und Analyse und C) Inkubation für 2 h bei 40 °C, Inkubation für 72 h bei RT und Lagerung bei -20 °C bis zur Gefriertrocknung und LC/MS-Analyse. Die Signalflächen der jeweiligen Analyten wurden aus den

Chromatogrammen der LC/MS-Analyse im SIM(+)-Modus durch Integration erhalten. Die abgebildeten Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

8.2.4 Derivatisierung von Secologanin mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)

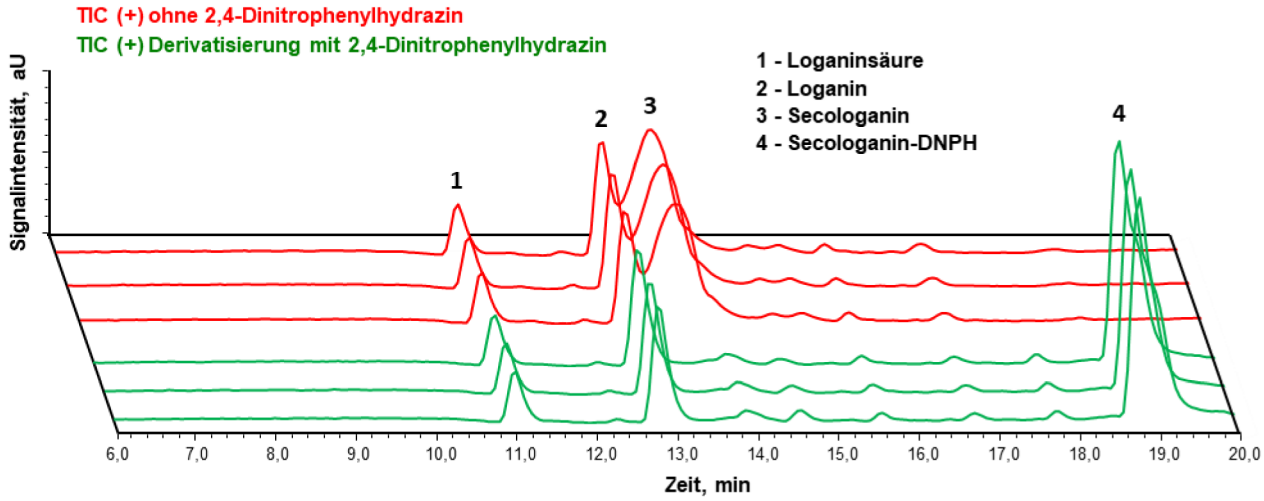

Abbildung 8.4 –Evaluation der Derivatisierung von Secologanin durch 2,4-Dinitrophenylhydrazin mittels LC/MS-Analyse. Gezeigt sind LC/MS-Chromatogramme (TIC(+)-Modus) von Proben mit je 500 µM Loganinsäure, Loganin und Secologanin mit (grün) und ohne (rot) Derivatisierung mittels 2,4-DNPH. Für den Versuch wurde eine Stammlösung in 6 identische Volumina geteilt und je 3 Proben mit Acetonitril oder Acetonitril und 2,4-DNPH versetzt. Alle Proben wurden anschließend 120 Minuten bei 40°C und 300 RPM inkubiert, zentrifugiert und der Überstand ohne weitere Extraktionsschritte per LC/MS analysiert.

8.2.5 Präparation von K_CYP72A1 mittels fraktionierter Fällung durch Ammoniumsulfat

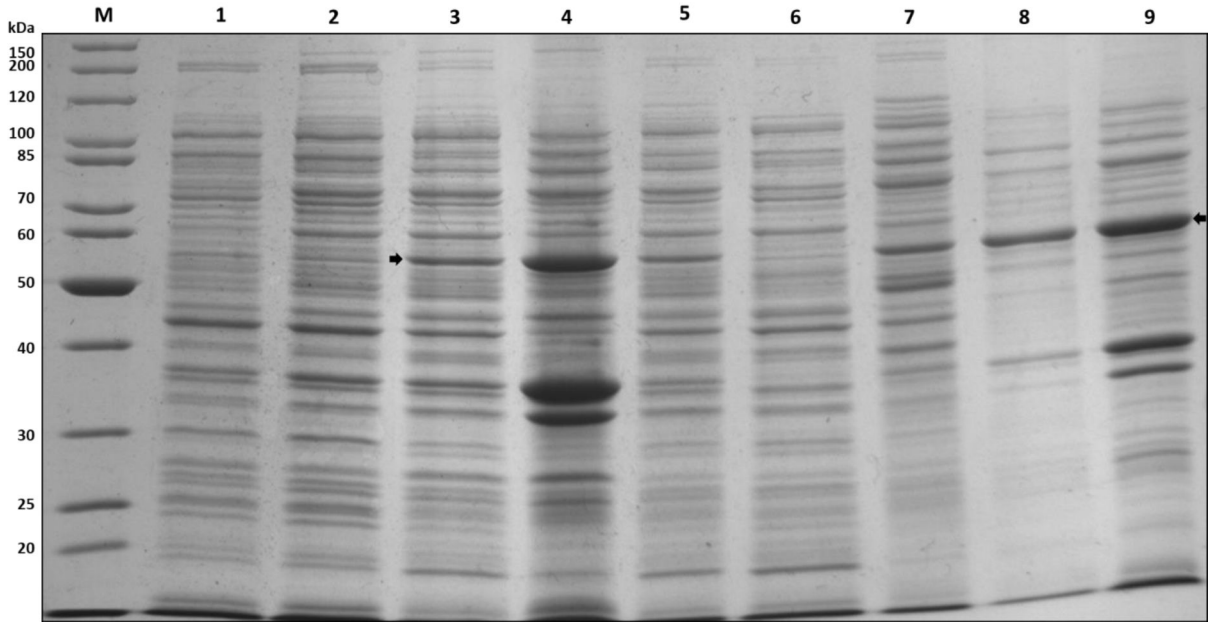

Abbildung 8.5 – SDS-Polyacrylamidgel (12,5 %) zur Analyse der fraktionierten Fällung von K_CYP72A1 im präparativen Maßstab. K_CYP72A1 wurde aus Zell-Lysat mittels 40 % Ammoniumsulfat ausgefällt. Es wurden folgende Proben per SDS-PAGEanalysiert: Ganzzellprobe vor Induktion der Expression *E. coli* C43(DE3) pET28a_K_CYP72A1 (1), Ganzzellprobe 3 h nach Induktion der Expression (2), lösliche Fraktion (3) und unlösliche Fraktion (4) des Zellhomogenats jeweils 40 h nach Induktion der Expression, unlösliche Fraktion (9) und Zell-Lysat (5) nach zusätzlicher Zentrifugation für 120 min bei 55000 xg, Überstand (6) und in Tris-Puffer gelöster

Niederschlag (7) nach Ammoniumsulfat-Zugabe und Zentrifugation, Eluat nach hydrophober Interaktionschromatographie (8) Komigrationsstandard *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (M). Die Höhe der Banden des Zielproteins ist mit Pfeilen markiert.

8.2.6 Umwandlung von Loganin durch K_CYP72A1 unter Einfluss von Ammoniumsulfat

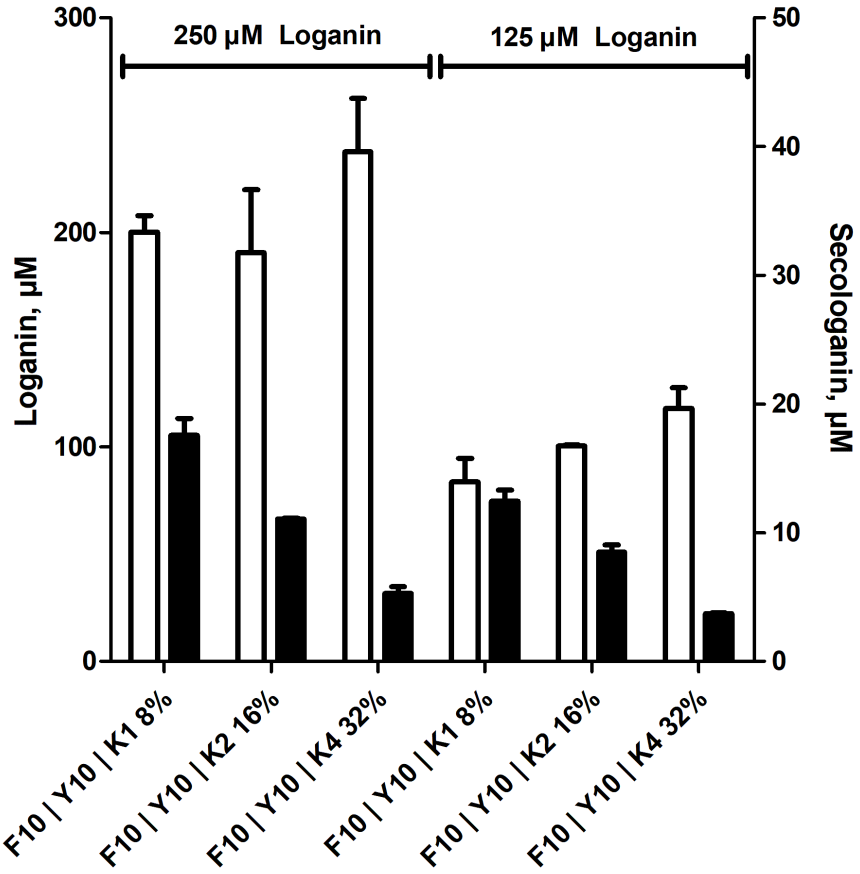

Abbildung 8.6 – Umsetzung von Loganin durch K_CYP72A1 unter Einfluss von Ammoniumsulfat. Es sind die ermittelten Loganin- und Secologanin-Konzentrationen nach Umsetzungen von Loganin durch 1 bis 4 µM K_CYP72A1 bei unterschiedlichem Ammoniumsulfat-Gehalt im Reaktionsansatz gezeigt. Nach einer Fällung mit 40 % Ammoniumsulfat wurde K_CYP72A1 in Tris-Puffer gelöst, der P450 Gehalt bestimmt und ohne weitere Entsalzungsschritte zur Umsetzung von 125 oder 250 µM Loganin eingesetzt. Der Volumenanteil dieser Ammoniumsulfat-haltigen Lösung im Reaktionsansatz betrug 8 – 32 %. Es wurden jeweils 1 µM, 2 µM oder 4 µM K_CYP72A1 (K1, K2 K4) mit 10 µM FpR und 10 µM YkuN (F10 | Y10) eingesetzt. Die Proben wurden nach der Reaktion derivatisiert, gefriergetrocknet und per LC/MS analysiert. Die abgebildeten Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

8.2.7 Reinigung von K_CYP72A1 _C6His mit IMAC unter Einfluss von Harnstoff

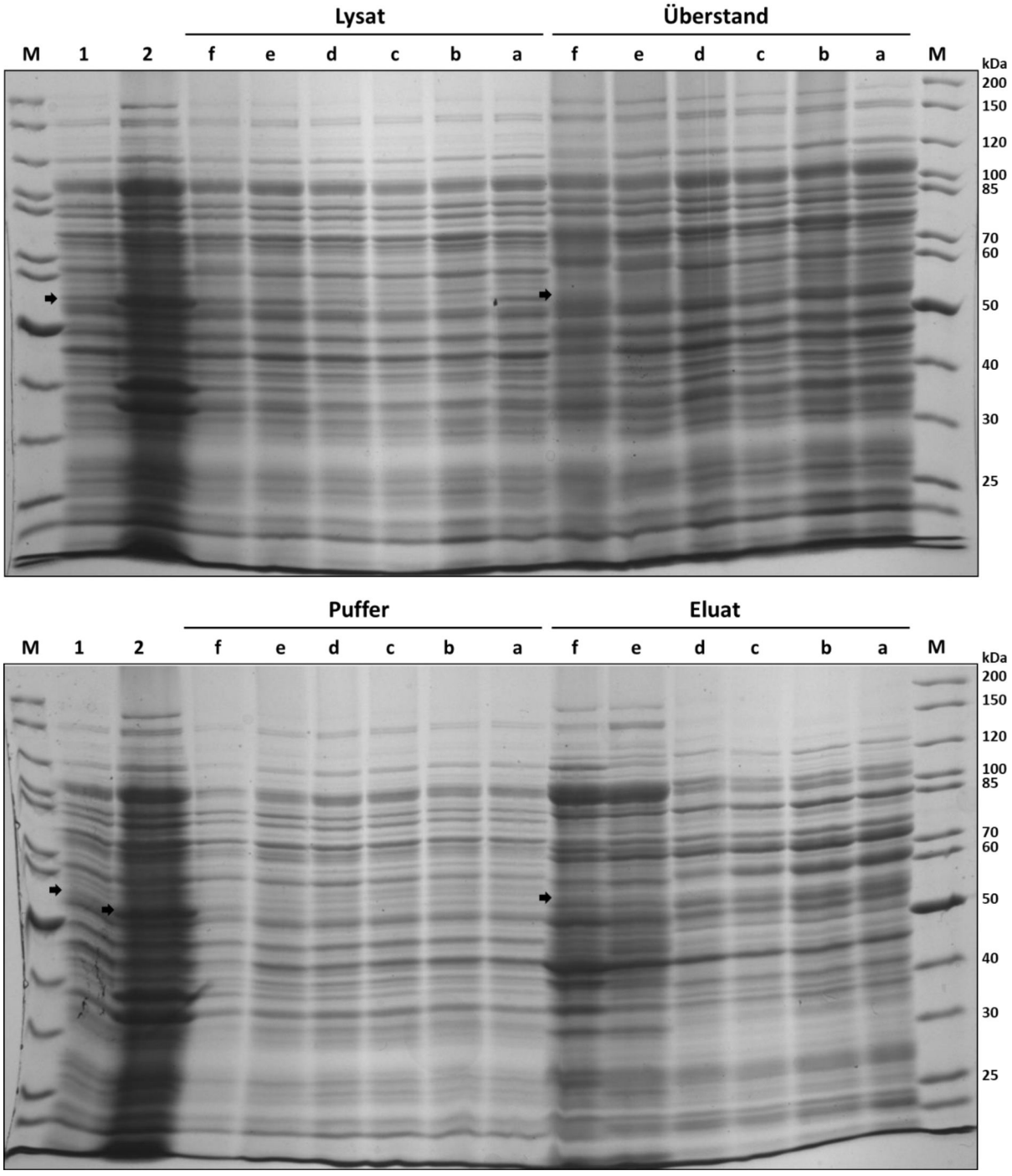

Abbildung 8.7 - SDS-Polyacrylamidgel (12,5%) einer Reinigung von K_CYP72A1_C6His mit IMAC im *Batch*-Verfahren und unter Zugabe von Harnstoff. Gezeigt ist der Einfluss von Harnstoff auf die Bindung von K_CYP72A1 _C6His an Ni-NTA-Beads. K_CYP72A1_GST_C6His-haltiges Lysat wurde mit Harnstoff in Endkonzentrationen von 0 (a), 0,25 (b), 0,5 (c), 1 (d), 2,5 (e) und 5 (f) mol/L versetzt und anschließend für 3 Stunden rotierend an Ni-NTA-Perlen inkubiert. Es folgte ein Waschschritt mit 50 mM Tris-Puffer und Elution durch Zugabe von Puffer mit 150 mM Imidazol. Das Lysat nach Zugabe von Harnstoff und der Überstand aller Proben wurde vor dem jeweils nächsten Schritt durch Zentrifugieren und Pipettieren entfernt. Alle Proben wurden per SDS-PAGE analysiert. Komigrationsstandard *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* (M), lösliche Fraktion nach Homogenisierung der Zellen nach 40 h (1), unlösliche Fraktion nach Homogenisierung der Zellen nach 40 h (2). Die Höhe der Banden des Zielproteins ist mit Pfeilen markiert.

9 Erklärungen zur Dissertation

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig 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 in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf,

Christopher Weber

10 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei allen Menschen bedanken, ohne deren unersetzliche Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau Prof. Dr. Vlada Urlacher gilt mein besonderer Dank für das interessante Forschungsthema, die hervorragende Betreuung und Unterstützung, die fruchttragende Zusammenarbeit und die angenehmen Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Jörg Pietruszka möchte ich meinen Dank für die großzügige Übernahme der Mentorenschaft und des Koreferats aussprechen.

Für die inspirierenden fachlichen Diskussionen, die wohlwollenden Beratungen und das konstruktive Feedback möchte ich mich bei Dr. Patrick Bakkes herzlich bedanken.

Zudem danke ich allen Kollegen für die gemeinsame schöne Zeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Kollegialität. Mein Dank gilt insbesondere Dr. Osama Mahmoud und Dr. Marco Girhard für die Hilfsbereitschaft während meiner Einarbeitungszeit für das jederzeit offene Ohr.

Den Studenten, insbesondere Marten Kayser, und Praktikanten, die mich über Abschnitte meiner Promotionsarbeit begleitet haben, danke ich für die gewissenhafte Durchführung der Experimente, das Engagement und die gute Laune.

Dem Bioeconomy Science Center und der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich für die großzügige finanzelle Unterstützung dieses Forschungsvorhabens.

Meinen Freunden, insbesondere Pascal und Lars, bin ich für die moralische Unterstützung und die offenherzige Freundschaft außerordentlich dankbar.

Meiner Frau Anna, meinen Töchtern Sophie und Juliana, meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Familie bin ich für den bedingungslosen Rückhalt, die stetigen Aufmunterungen und die liebevolle Zuneigung unendlich dankbar.