

Neues aus Wissenschaft und Lehre

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2010

Heinrich Heine

HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF



d|u|p

düsseldorf university press

**Neues aus
Wissenschaft und Lehre
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
2010**

**Neues aus
Wissenschaft und Lehre
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2010**

Herausgegeben vom Rektor
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Univ.-Prof. Dr. Dr. H. Michael Piper

Konzeption und Redaktion:
Univ.-Prof. em. Dr. Hans Süßmuth

d|u|p

© düsseldorf university press, Düsseldorf 2010
Einbandgestaltung: Monika Uttendorfer
Titelbild: Blick in den Konrad-Henkel-Hörsaal
Redaktionsassistenz: Sonja Seippel
Beratung: Friedrich-K. Unterweg
Satz: Friedhelm Sowa, L^AT_EX
Herstellung: WAZ-Druck GmbH & Co. KG, Duisburg
Gesetzt aus der Celeste
ISBN 978-3-940671-71-4

Inhalt

Vorwort des Rektors	11
Hochschulrat	13
Rektorat	15
 Medizinische Fakultät	
<i>Dekanat</i>	19
SASCHA FLOHÉ und JOACHIM WINDOLF (Dekan) Bessere Schwerstverletztenprognose in Deutschland – von der <i>Damage-Control</i> -Chirurgie bis zum Traumanetz	23
PETER FEINDT und ARTUR LICHTENBERG Neue Wege – alte Ziele: Was macht moderne Herzchirurgie im Jahr 2010 aus?	31
STEFANIE RITZ-TIMME, ULRIKE BRUNENBERG-PIEL, VOLKER WEUTHEN, ULRICH DECKING, ALFONS HUGGER und MATTHIAS SCHNEIDER O.A.S.E.: Raum und Symbol für eine neue Lern- und Lehrkultur an der Medizinischen Fakultät	51
ANDREAS HIPPE, ANJA MÜLLER-HOMEY und BERNHARD HOMEY Chemokine im Tumor-Mikromilieu	65
WOLFRAM TRUDO KNOEFEL und JAN SCHULTE AM ESCH Die Förderung der Leberproliferation durch therapeutische Applikation von CD133-positive Knochenmarkstammzellen vor erweiterter Leberresektion	85
S. ROTH, P. ALBERS, W. BUDACH, A. ERHARDT, R. FENK, H. FRISTER, H. E. GABBERT, N. GATTERMANN, U. GERMING, T. GOECKE, R. HAAS, D. HÄUSSINGER, W. JANNI, W. T. KNOEFEL, G. KOBBE, H. W. MÜLLER, C. OHMANN, D. OLZEN, A. SALEH und B. ROYER-POKORA Aktuelle Entwicklungen in der interdisziplinären Krebstherapie	111
JOHANNES SIEGRIST und ANDREA ICKS Gesundheit und Gesellschaft – eine neue Initiative an der Medizinischen Fakultät	141
THOMAS BEIKLER Parodontitis – Einblicke in eine unterschätzte Biofilmerkran- kung	159
MATTHIAS SCHOTT Autoimmune und maligne Schilddrüsenerkrankungen	179

JENS SAGEMÜLLER

- Der Neubau der Krankenhausapotheke
des Universitätsklinikums Düsseldorf 193

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Dekanat 213

SABINE ETGES und PETER WESTHOFF

- Biodiversität – Vielfalt des Lebens
Die Vielfalt der Pflanzen und ihre Zukunft 217

EVELYN VOLLMEISTER, ELISABETH STRATMANN und
MICHAEL FELDBRÜGGE

- Langstreckentransport im Mikroorganismus *Ustilago maydis* 235

HELMUT RITTER, MONIR TABATABAI und GERO MAATZ

- Funktionsmaterialien in der Dental- und Augenheilkunde 249

VLADA B. URLACHER und KATJA KOSCHORRECK

- Biokatalyse für die selektive Oxidation 265

HEIKE BRÖTZ-OESTERHELT und PETER SASS

- Molekulare Antibiotikaforschung – Neue Leitstrukturen
und Wirkmechanismen gegen multiresistente Bakterien 283

FRANK MEYER und REINHARD PIETROWSKY

- Risikopotential der exzessiven Nutzung von Online-Rollenspielen:
Fortschritte in der klinischen Diagnostik 295

HOLGER GOHLKE

- Strukturbasierte Modellierung der
molekularen Erkennung auf multiplen Skalen 311

Philosophische Fakultät

Dekanat 329

FRANK LEINEN

- Mexiko 1810 – 1910 – 2010:
Entwicklungen, Perspektiven, Problemfelder 333

SHINGO SHIMADA

- Zum Konzept von Natur im Japanischen – das Eigene und das Fremde.
Eine Skizze..... 355

GERHARD SCHURZ

- Wie wahrscheinlich ist die Existenz Gottes?
Kreationismus, Bayesianismus und das Abgrenzungsproblem 365

RICARDA BAUSCHKE-HARTUNG

- Liegt der Rheinschatz in Düsseldorf? 377

PETER INDEFREY	
Wie entsteht das gesprochene Wort?	391
HARTWIG HUMMEL	
Europa als Friedensprojekt: Der internationale Masterstudiengang <i>European Studies</i> an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	401
SUSANNE BRANDT und BEATE FIESELER	
Zum Projekt „Studierende ins Museum“	411
GABRIELE GLOGER-TIPPELT	
Warum wir Bindung brauchen – Empirisches Wissen und einige Mythen	427
Wirtschaftswissenschaftliche Fakultät	
<i>Dekanat</i>	445
NADINE MÜLLER und BERND GÜNTER (Dekan)	
Kunstvermittlung und Marketing für Kunst – ein interdisziplinäres Fachgebiet	449
Gastbeitrag	
CHRISTOPH INGENHOVEN	
Rede anlässlich der Eröffnungsfeier des Oeconomicum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf am 30. November 2010	463
RAIMUND SCHIRMEISTER	
Der MBA Gesundheitsmanagement als innovativer Weiterbildungsstudiengang	469
STEFAN SÜSS	
Fassaden, Mythen und Symbole? Wie Managementkonzepte eingesetzt und bewertet werden	481
JUSTUS HAUCAP	
Eingeschränkte Rationalität in der Wettbewerbsökonomie	495
HANS-THEO NORMANN	
Experimentelle Ökonomik für die Wettbewerbspolitik.....	509
RÜDIGER HAHN	
Corporate Responsibility in betriebswirtschaftlicher Diskussion – Kritische Reflexion und Begründungsgrundlagen unternehmerischer Gesellschaftsverantwortung	525
Juristische Fakultät	
<i>Dekanat</i>	541
RALPH ALEXANDER LORZ	
Die neue Blaupause für Europa Der Vertrag von Lissabon und seine wesentlichen Neuerungen.....	543

CHRISTIAN KERSTING Wettbewerb der Rechtskulturen: Der Kampf um das beste Recht.....	557
ANDREAS FEUERBORN, SUSANNE LEITNER und SUSANNE SCHILLBERG Fünf Jahre integrierter Grundstudienkurs Rechtswissenschaften Düsseldorf/Cergy-Pontoise – eine erfolgreiche Basis für den neuen deutsch-französischen Aufbaustudienkurs im Wirtschafts-, Arbeits- und Sozialrecht	583
JOHANNES DIETLEIN und FELIX B. HÜSKEN Spierschutz im gewerblichen Automatenpiel Rechtsprobleme der Bauartzulassung neuartiger Geldspielgeräte	593
CHRISTIAN KERSTING Zur Zweckmäßigkeit eines Entflechtungsgesetzes	613
Gesellschaft von Freunden und Förderern der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf e. V.	
OTHMAR KALTHOFF Gesellschaft von Freunden und Förderern der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf e. V.....	625
Private Stiftungen und die Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	
ESTHER BETZ Ziele und Arbeit der Anton-Betz-Stiftung der Rheinischen Post	631
Forscherguppen an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	
DIETER HÄUSSINGER und RALF KUBITZ Klinische Forschergruppe KFO 217 „Hepatobiliärer Transport und Lebererkrankungen“	637
Sofja Kovalevskaja-Preisträger	
PHILIPP ALEXANDER LANG Wie man virale Infektionen untersuchen kann.....	649
Graduiertenausbildung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	
AXEL GÖDECKE und URSULA KESSEN Strukturierte Promotion an der Medizinischen Fakultät: Die <i>Medical Re- search School Düsseldorf</i>	661
CHRISTIAN DUMPITAK, ANDREAS WEBER und CHRISTEL MARIAN Shaping the Future of Doctoral Training: iGRAD – Interdisciplinary Graduate and Research Academy Düsseldorf ..	671

SIGRUN WEGENER-FELDBRÜGGE, RÜDIGER SIMON und ANDREAS P. M. WEBER iGRAD-Plant – An International Graduate Program for Plant Science „The Dynamic Response of Plants to a Changing Environment“	679
Nachwuchsforschergruppen an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	
M. BEURSKENS, S. KEUNEKE, M. MAHRT, I. PETERS, C. PUSCHMANN, A. TOKAR, T. VAN TREECK und K. WELLER Wissenschaft und Internet	693
Ausgründungen aus der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	
CORD EBERSPÄCHER Kennen Sie Konfuzius? Über 300 Konfuzius-Institute verbreiten chinesische Kultur und Sprache weltweit – das Düsseldorfer Institut gehörte zu den ersten	705
Ausstellungen	
STEFANIE KNÖLL Narren – Masken – Karneval Forschungsprojekt und Ausstellung der Graphiksammlung „Mensch und Tod“	721
Geschichte der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	
ULRICH KOPPITZ, THORSTEN HALLING und JÖRG VÖGELE Geschichten und Geschichtswissenschaft: Zur Historiographie über die Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	739
Forum Kunst	
STEFAN SCHWEIZER Gartenkunst als Städtebau Zur Konvergenz der Disziplinen im Diskurs um den sozialhygienischen Beitrag urbaner Grünanlagen 1890–1914	759
Chronik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	
ROLF WILLHARDT Chronik 2010	783



Prof. Dr. Vlada B. Urlacher

Vlada B. Urlacher studierte Biologie und Biochemie an der Staatlichen Universität Taschkent in Usbekistan und promovierte dort am Institut für Mikrobiologie der Akademie der Wissenschaft. 1997 kam sie als DAAD-Stipendiatin an das Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart unter der Leitung von Prof. Dr. Rolf D. Schmid. Für den Zeitraum von 1998 bis 2000 wechselte sie in die Gruppe von Prof. Reiner Rudolf an das Institut für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Im Jahr 2001 kehrte sie nach Stuttgart an das Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart zurück. Dort leitete sie bis 2009 die Biokatalyse-Gruppe. 2008 habilitierte sie sich und erhielt die Venia Legendi für das Fach Molekulare Biotechnologie an der Universität Stuttgart. Im Dezember 2009 nahm sie den Ruf der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf auf eine W3-Professur für Biochemie an. Die Arbeitsgruppe von Vlada Urlacher beschäftigt sich mit aktuellen Themen der Biokatalyse und des Proteindesigns.



Dr. Katja Koschorreck

Katja Koschorreck, 1981 in Dresden geboren, studierte von 2000 bis 2005 Technische Biologie an der Universität Stuttgart. Ihre Diplomarbeit und Dissertation fertigte sie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Vlada Urlacher bei Prof. Dr. Rolf Schmid am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart an. Während ihrer Promotion beschäftigte sie sich mit der Klonierung, Expression und Charakterisierung des Enzyms Laccase aus Pilzen und Bakterien. Nach Abschluss ihrer Promotion im Dezember 2008 übernahm Katja Koschorreck die Arbeitsgruppe „Molekulare Genetik“ am Institut für Technische Biochemie bei Prof. Dr. Rolf Schmid und nachfolgend Prof. Dr. Bernhard Hauer. Seit März 2010 arbeitet Katja Koschorreck in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Vlada Urlacher am Institut für Biochemie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Ein Schwerpunkt ihrer Arbeit ist die Optimierung von Laccasen aus Pilzen und Bakterien für biotechnologische Anwendungen.

Biokatalyse für die selektive Oxidation

Einleitung

Man nimmt sie häufig gar nicht wahr, doch in jedem Haushalt sind Biokatalysatoren, auch Enzyme genannt, zu finden, die unser tägliches Leben erleichtern. So enthalten beispielsweise Waschmittel, die Wäsche auch bei niedrigen Temperaturen sauber bekommen, Enzyme die Fett-, Eiweiß- und Stärke-haltige Flecken bereits bei 30 Grad entfernen. Dadurch können Energie und Wasser gespart werden. Auch beim Backen von Brot und Brötchen oder der Herstellung von Medikamenten spielen Enzyme eine wichtige Rolle. Heute werden enzymatische Verfahren immer stärker auch in der chemischen Synthese eingesetzt. Durch sie können Prozesse vereinfacht, Nebenprodukte und giftige Abfallstoffe vermieden und die Herstellungskosten gesenkt werden. Außerdem schonen enzymkatalysierte Reaktionen die Umwelt, da sie im Gegensatz zu den klassischen chemischen Ansätzen bei milden Bedingungen wie Raumtemperatur, Atmosphärendruck, neutralem pH-Wert und ohne umweltbelastende Zusätze durchgeführt werden können.

In der chemischen Synthese nehmen Oxidationsreaktionen mit Luftsauerstoff einen wichtigen Platz ein. Durch die Einführung von Sauerstoff in Moleküle können beispielsweise Vorstufen für die Synthese von Antibiotika, Steroiden, Pharmazeutika sowie Duft- und Aromastoffen hergestellt werden. Insbesondere die selektive Oxidation nicht-aktivierter Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen stellt eine wichtige Reaktion in der organischen Synthese dar, ist aber auf rein chemischem Wege nicht oder nur schwer zu erreichen. Die biokatalytische Oxyfunktionalisierung nicht aktivierter Kohlenwasserstoffe wird deswegen als „möglicherweise die nützlichste aller Biotransformationen“ angesehen.¹ Enzyme wie die Cytochrom P450-Monooxygenasen führen diese Reaktionen bei Raumtemperatur in einem einzigen Schritt durch, was diese Enzyme für biokatalytische Anwendungen sehr interessant macht.

Cytochrom P450-Monooxygenasen

Cytochrom P450-Monooxygenasen (E.C.1.14.-.-) gehören zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen und bilden eine der größten Enzymfamilien mit bisher mehr als 11.500 bekannten Gensequenzen. Sie kommen in Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Tieren und dem Menschen vor und spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen Reaktionen des sekundären Metabolismus sowie beim Abbau von Xenobiotika. So sind sie beispielsweise an der Synthese von Steroidhormonen und am Abbau von körperfremden Stoffen wie zum Beispiel Medikamenten und Umweltgiften über den humanen Stoffwechsel beteiligt. Entdeckt wurden die Cytochrom P450-Monooxygenasen vor über 50 Jahren in der

¹ Vgl. Davies *et al.* (1989).

Leber von Ratten.² Die P450-Monooxygenasen besitzen genau wie die roten Blutkörperchen eine Häm *b*-Gruppe im aktiven Zentrum, welche über ein Cysteinat als axialen (fünften) Liganden an das Apoprotein gebunden ist (Abb.1).

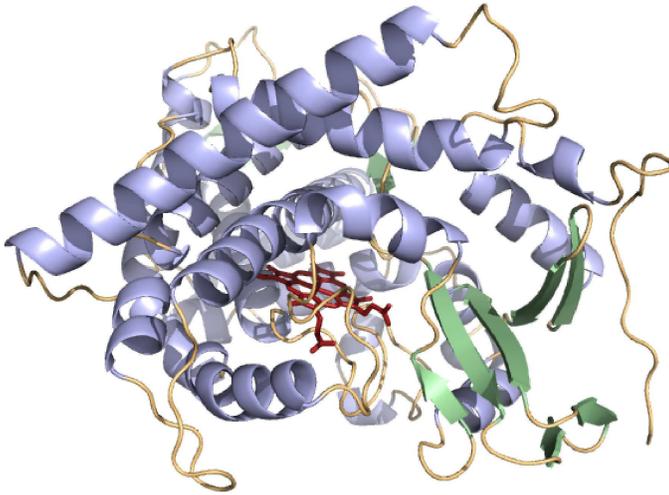


Abb. 1: Kristallstruktur der P450 BM-3 Monooxygenase-Domäne. Die Häm *b*-Gruppe ist rot dargestellt.

Cytochrom P450-Monooxygenasen erhielten ihren Namen durch die Eigenschaft im ultravioletten-sichtbaren Spektrum bei 450 Nanometern eine charakteristische Absorption zu zeigen, die durch die Bindung von Kohlenstoffmonoxid an die Häm *b*-Gruppe im reduzierten Zustand verursacht wird.³ Andere Häm-Proteine weisen unter den gleichen Bedingungen eine Bande bei 420 Nanometern auf, da ihre fünfte Bindungsstelle nicht von einem Cystein, sondern von einem Histidin eingenommen wird. Die Enzyme erhielten daher ihren Namen „Cytochrom P450-Monooxygenasen“, wobei „P“ für Pigment steht und „Cytochrom“ Zellfarbstoff bedeutet.

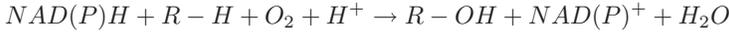
Um die zahlreichen P450-Monooxygenasen zur besseren Unterscheidung in Gruppen einzuteilen, werden sie anhand von Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz verschiedenen Familien zugeordnet. Der Enzymname umfasst dabei die Abkürzung „CYP“ für Cytochrom P450, gefolgt von einer Nummer für die Familie, danach ein Buchstabe für die Unterfamilie und abschließend eine Nummer für das individuelle Gen.⁴ So gehört beispielsweise das Enzym CYP102A1 aus dem Bodenbakterium *Bacillus megaterium* zur Unterfamilie A der Familie 102 und ist das erste identifizierte Gen dieser Familie.

Allgemein katalysieren P450-Enzyme Reaktionen, bei denen molekularer Sauerstoff reduziert wird. Hierbei wird ein Sauerstoffatom in das Substrat eingeführt, während das zweite Sauerstoffatom in Form von Wasser aus der Reaktion hervorgeht.

² Vgl. Klingenberg (1958).

³ Vgl. Omura und Sato (1964).

⁴ Vgl. Nelson *et al.* (1993).



Zur Aktivierung des molekularen Sauerstoffs benötigen P450-Monooxygenasen Elektronen, die das Häm-Eisen von EisenIII zu EisenII reduzieren. Die Elektronen werden in Form von Hydrid-Ionen, die von den Nikotinamid-Kofaktoren NADH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) oder NADPH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) stammen, über Redoxpartner-Proteine zur Häm *b*-Gruppe der P450-Monooxygenasen transferiert.⁵

P450-Monooxygenasen katalysieren eine Vielzahl von Reaktionen; über 20 verschiedene Reaktionstypen wurden bereits beschrieben⁶ wie beispielsweise Hydroxylierungen, Epoxidierungen, Dealkylierungen, Dehalogenierungen, Desulfurylierungen und oxidative Deaminierungen. Die Einführung von Sauerstoff in die Substrate erfolgt dabei oft chemo-, regio- oder stereoselektiv in einem Schritt, was mit chemischen Methoden überhaupt nicht oder nur über mehrere aufwändige Syntheseschritte möglich wäre.

Klassifizierung von Cytochrom P450-Monooxygenasen

Die Übertragung der Elektronen von NAD(P)H auf Cytochrom P450-Monooxygenasen kann durch verschiedene Redoxpartner erfolgen. Cytochrom P450-Monooxygenasen werden daher je nach der Art der Elektronenübertragung in verschiedene Klassen eingeteilt. Ursprünglich wurden zwei Klassen beschrieben.⁷ Bei Enzymen der Klasse I erfolgt die Elektronenübertragung von NAD(P)H über eine FAD⁸ enthaltende Ferredoxin-Reduktase und ein Ferredoxin (2Fe-2S-Protein) zum Häm-Eisen der P450-Monooxygenase. Diese Systeme kommen in Mitochondrien der Eukaryonten und in Bakterien vor (Abb. 2a). Cytochrom P450-Monooxygenasen der Klasse II hingegen sind in kleinen, membranumschlossenen Bläschen, den sogenannten Mikrosomen, zu finden und beziehen ihre Elektronen von NADPH über eine FAD und FMN⁹ enthaltende Cytochrom P450-Reduktase (CPR) (Abb. 2b).

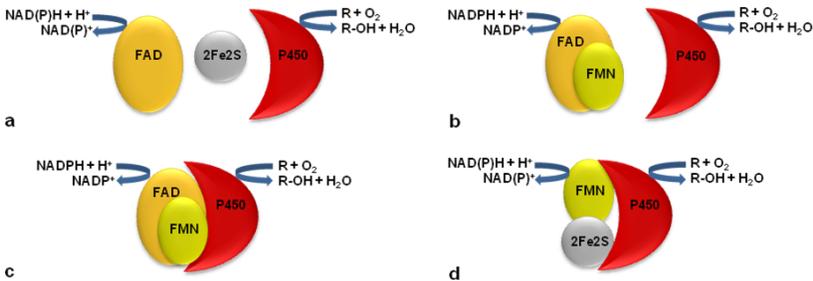


Abb. 2: Elektronenübertragung bei P450-Monooxygenasen. (a) Klasse I; (b) Klasse II; (c) Klasse III; (d) Klasse IV

⁵ Vgl. Bernhardt (2004) sowie Hannemann *et al.* (2007).

⁶ Vgl. Sono *et al.* (1996).

⁷ Vgl. Bernhardt (1996).

⁸ Flavin-Adenin-Dinukleotid.

⁹ Flavin-Mono-Nukleotid.

Darüber hinaus werden immer mehr neue P450-Redoxsysteme durch zahlreiche Genomsequenzierungen und biochemische Studien identifiziert, die weder der Klasse I noch der Klasse II zugeordnet werden können.¹⁰ Das P450-Enzym CYP102A1 (auch als P450 BM-3 bezeichnet) aus dem Bodenbakterium *Bacillus megaterium* war zum Beispiel die erste P450-Monooxygenase, die weder in die Klasse I noch II eingeordnet werden konnte. P450 BM-3 ist ein lösliches Fusionsprotein, das aus einer P450-Monooxygenase-Domäne und einer FAD und FMN enthaltenden Reduktase-Domäne besteht, die über eine kleine Aminosäure-Sequenz, einen sogenannten Linker, miteinander verbunden sind (Abb. 2c).¹¹ Dieses und ähnlich aufgebaute P450-Enzyme bilden die Klasse III. Zur Klasse IV gehören ebenfalls Fusions-Flavocytochrome, die aber ihre Elektronen über den Kofaktor FMN und ein 2Fe-2S-Ferredoxin auf das Häm-Eisen übertragen und sowohl NADPH wie auch NADH als Elektronenlieferanten akzeptieren (Abb. 2d).

Cytochrom P450-Monooxygenasen, die mit ihren Redoxpartnern fusioniert vorliegen, sind besonders für biokatalytische Anwendungen geeignet, insbesondere wenn isolierte Enzyme verwendet werden (sogenannte *in vitro*-Prozesse; lateinisch: im Glas), da die Komplexität des Reaktionssystems dabei deutlich verringert wird.

Anwendungen und Herausforderungen

Aufgrund der selektiven Einführung von Sauerstoff in nicht-aktivierte Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen sind P450-Monooxygenasen besonders für die pharmazeutische und chemische Industrie von Interesse. Die große Anzahl der von diesen Enzymen umgesetzten Substanzen lässt hoffen, dass für eine Vielzahl der gewünschten Reaktionen eine selektive P450-Monooxygenase gefunden werden kann. Beispielsweise lassen sich die wirtschaftlich interessanten Steroide an jeder Position des Kohlenstoffgrundgerüsts selektiv durch Monooxygenasen oxidieren.¹² Zur biotechnologischen Herstellung von Steroiden werden ganze Zellen, die das entsprechende P450-Enzym produzieren, eingesetzt (Abb. 3). Solche Verfahren bezeichnet man als Ganzzell-Biotransformation oder auch als *in vivo*-Prozesse (lateinisch: im Lebendigen). Hydrocortison wird beispielsweise mittels einer *in vivo*-Reaktion in *Curvularia* sp. durch selektive Hydroxylierung von Desoxycortisol durch eine P450-Monooxygenase hergestellt.¹³ Die Schering AG¹⁴ produziert auf diese Weise circa 100 Tonnen Hydrocortison pro Jahr.¹⁵ Ein anderes Beispiel ist die P450-katalysierte Herstellung von Cortison aus Progesteron durch den Pilz *Rhizopus* sp. Dieser biotechnologische Oxidationsprozess wurde in den 1950er Jahren von Pharmacia & Upjohn entwickelt und später von Pfizer Inc. (USA) übernommen.¹⁶

Vorteile der Biotransformation mit ganzen, wachsenden Zellen gegenüber dem Einsatz von isolierten Enzymen liegen vor allem in der Regeneration der Nikotinamid-Kofaktoren durch den Zellstoffwechsel sowie in der einfachen Herstellung und konti-

¹⁰ Vgl. Munro *et al.* (2007).

¹¹ Vgl. Munro *et al.* (1996) sowie Narhi und Fulco (1987).

¹² Vgl. van Beilen *et al.* (2003).

¹³ Vgl. Peterson *et al.* (1952).

¹⁴ Seit 2006 Bayer Schering Pharma AG, Deutschland.

¹⁵ Vgl. van Beilen *et al.* (2003).

¹⁶ Vgl. Hogg (1992) sowie Peterson *et al.* (1952).

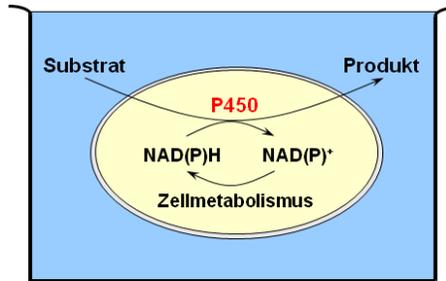


Abb. 3: Ganzzell-System zur selektiven Oxidation von Substraten mit P450-Monooxygenasen

nuierlichen Synthese des Biokatalysators. Häufig werden zur Produktion Stämme verwendet, die bereits in der Wildtypform die gewünschte Aktivität zeigten. Durch die Veränderung des Stoffwechsels (zum Beispiel durch Ausschalten einzelner Gene) kann zudem der mitunter auftretende Abbau des gebildeten Produktes durch den zelleigenen Stoffwechsel verhindert werden. So konnte aus dem Hefestamm *Candida tropicalis*, unter anderem durch Ausschalten des Fettsäureabbaus (β -Oxidation), ein hocheffizienter Produzent von α,ω -Dicarbonsäuren aus Fettsäuren beziehungsweise Alkanen entwickelt werden. Die ω -Oxidation der Substrate erfolgt hierbei über P450-Monooxygenasen der Familie CYP52.¹⁷ α,ω -Dicarbonsäuren werden zur Synthese von Polyester verwendet. Die Firma Cognis GmbH stellt mit Hilfe von *C. tropicalis* α,ω -Dicarbonsäuren aus n-Alkanen mit Ausbeuten von über 100 Gramm pro Liter her.¹⁸

Zusätzlich zu diesen großtechnischen Prozessen existieren zahllose industrielle Anwendungen im kleinen Maßstab. Beispielsweise werden in der Pharmaindustrie Zwischenprodukte des Metabolismus von Pharmazeutika durch humane P450-Monooxygenasen oder ihre Analoga aus Pilzen oder Bakterien synthetisiert. Anhand dieser Verbindungen können die pharmakokinetischen und toxikologischen Eigenschaften der Pharmazeutika schon in einer frühen Phase der Medikamentenentwicklung untersucht werden.¹⁹

Diese Anwendungsbeispiele zeigen das große Potenzial von Cytochrom P450-Monooxygenasen für selektive Oxidationsreaktionen im industriellen Maßstab. Für eine breite Anwendung müssen jedoch mehrere technische Probleme gelöst werden. Die größten Limitierungen für einen biotechnologischen Einsatz stellen die Abhängigkeit von den Kofaktoren und zusätzlichen Redoxpartnern für den Elektronentransfer sowie die oft nur geringe Stabilität und Aktivität der P450-Monooxygenasen dar. Außerdem sind viele P450-Monooxygenasen nicht frei in der Zelle löslich, sondern an Membranen gebunden, was ihre Herstellung und spätere Verwendung erschwert. Der Einsatz von bakteriellen P450-Monooxygenasen kann hierbei einige Vorteile bringen, da diese im Gegensatz zu P450-Monooxygenasen aus Pilzen, Tieren und Pflanzen nicht an Membranen gebunden sind und eine höhere Stabilität und Aktivität als diese aufweisen.

¹⁷ Vgl. Picataggio *et al.* (1992).

¹⁸ Vgl. Picataggio *et al.* (1992).

¹⁹ Vgl. Ghisalba und Kittelmann (2007), Gillam *et al.* (1999), Guengerich (2002), Miners (2002) sowie Pritchard *et al.* (2006).

Die Verwendung von natürlichen Fusionsproteinen wie P450 BM-3 macht zudem die zusätzliche Herstellung von Redoxpartnern überflüssig und vereinfacht dadurch das Reaktionssystem. Um das Problem der Bereitstellung des sehr teuren Kofaktors NAD(P)H zu lösen, verwenden alle bisher etablierten industriellen Prozesse Ganzzell-Systeme. Der Einsatz von ganzen Zellen für Biooxidationsreaktionen hat aber verschiedene Nachteile. Zum einen ist die Aufarbeitung der Produkte aus den Zelloslungen aufwändiger, zumal durch zelleigene Proteine unerwünschte Nebenprodukte gebildet werden können, die vor der Weiterverwendung der Produkte abgetrennt werden müssen. Zum anderen kann das Substrat und/oder das Produkt für die Zellen toxisch sein oder der Transport des Substrates in die Zelle hinein – beziehungsweise des Produktes aus der Zelle heraus – kann sehr langsam oder ineffizient erfolgen und damit den gesamten Prozess limitieren. Darüber hinaus kann es, wie bereits erwähnt, zum Abbau des gebildeten Produktes durch den zelleigenen Stoffwechsel kommen. Diese Probleme werden bei *in vitro*-Prozessen mit isolierten P450-Monooxygenasen umgangen. Aber auch hier müssen diverse Probleme gelöst werden, wie die effiziente und ökonomische Bereitstellung der Elektronen sowie die Erhöhung der Enzymstabilität innerhalb der Prozesse (Abb. 4). Für einen biotechnologischen Einsatz in einem *in vivo*- wie auch *in vitro*-Reaktionssystem müssen die P450-Monooxygenasen darüber hinaus in ausreichenden Mengen hergestellt und ihre Aktivität und Selektivität optimiert werden.

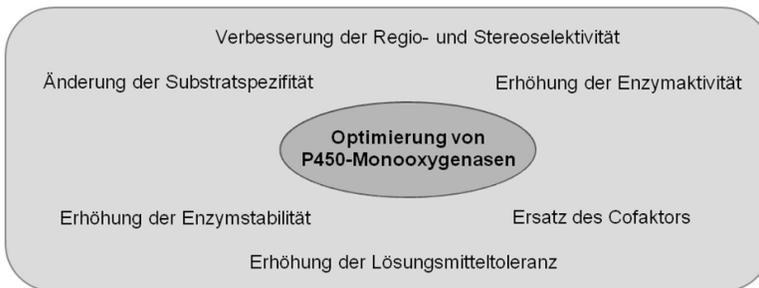


Abb. 4: Optimierungsmöglichkeiten für P450-Monooxygenasen

Unsere Arbeitsgruppe untersucht und entwickelt seit mehreren Jahren Konzepte zur Ermöglichung der präparativen, technischen Anwendung bakterieller P450-Monooxygenasen für die Biokatalyse. Dabei wurde der Hauptfokus auf P450 BM-3 aus *B. megaterium* gelegt. P450 BM-3 katalysiert die Hydroxylierung und Epoxidierung von vielen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit einer Kohlenstoffkettenlänge von 12 bis 20. Das Enzym hat die höchste beschriebene Aktivität aller P450-Monooxygenasen,²⁰ da die Elektronen sehr schnell innerhalb der Reduktase von FAD auf FMN und anschließend auf die Häm *b*-Gruppe übertragen werden. Im Folgenden wird beschrieben, welche Ansatzmöglichkeiten bisher in unserer Arbeitsgruppe untersucht sowie in der Fachliteratur beschrieben wurden, um effiziente P450-basierte Prozesse zu entwickeln.

²⁰ Vgl. Capdevila *et al.* (1996), Munro *et al.* (2002) sowie Truan *et al.* (1999).

Herstellung von P450-Monooxygenasen

Die meisten Proteine kommen in der Natur nur in geringen Mengen vor. Sollen diese Proteine für biotechnologische Anwendungen nutzbar gemacht werden, müssen sie aus den entsprechenden Organismen isoliert werden. Dies ist jedoch häufig mit einem großen Aufwand verbunden und führt, gerade im Hinblick auf großtechnische Anwendungen, nicht zu den erforderlichen Proteinausbeuten. Deshalb werden die zu verwendenden Proteine häufig in fremden Organismen produziert, die einfach zu kultivieren und handhaben sind und größere Proteinmengen liefern können. Die Herstellung eines Proteins in einem fremden Organismus bezeichnet man als heterologe Expression. Das Darmbakterium *Escherichia coli* hat sich als ein idealer Kandidat zur heterologen Expression von bakteriellen Proteinen mit hohen Ausbeuten gezeigt. Auch bakterielle P450-Monooxygenasen können mit guten Ausbeuten in *E. coli* exprimiert werden. Für die Herstellung von P450 BM-3 wurde in unserer Arbeitsgruppe ein spezielles Zulauf-Verfahren, eine sogenannte Fed-Batch-Fermentation, entwickelt, um hohe Enzymausbeuten für biotechnologische Anwendungen zu erhalten. Durch Optimierung der Zugabe der Kohlenstoffquelle, in diesem Falle Glycerin, können rund 1,5 Gramm Enzym pro Liter Fermentationsbrühe erhalten werden.²¹ Zur heterologen Expression von P450-Monooxygenasen aus Hefen, Pflanzen oder Tieren, die sich in *E. coli* nicht exprimieren lassen, haben sich unter anderen die Hefen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* und *Schizosaccharomyces pombe* als vielversprechendes Expressionssystem gezeigt.

Ersatz und Regeneration des Kofaktors NAD(P)H

In industriellen Prozessen werden Kofaktor-abhängige Enzyme nur sehr selten eingesetzt, da die Kosten für die Kofaktoren NAD(P)H sehr hoch sind und ein stöchiometrischer Einsatz der Kofaktoren deshalb nicht wirtschaftlich ist. Für industrielle Anwendungen müssen die Kofaktoren entweder regeneriert oder durch geeignetere Elektronenlieferanten ersetzt werden. Bei der Verwendung von Ganzzell-Systemen werden die Kofaktoren wie oben erwähnt, einfach über den Stoffwechsel der Zelle regeneriert. Allerdings kann die zelluläre Regeneration von NAD(P)H den biokatalytischen Prozess limitieren, wenn durch eine starke Expression der P450-Monooxygenase die Kofaktoren schneller verbraucht als regeneriert werden.

Für die *in vitro*-Anwendung von P450-Monooxygenasen wurden verschiedene Ansätze untersucht, um die Kofaktoren effizient zu regenerieren oder zu ersetzen. Einerseits wurde versucht, das Häm-Eisen direkt durch starke Reduktionsmittel mit Elektronen zu versorgen. Allerdings werden die Enzyme dabei häufig durch Nebenprodukte inaktiviert oder die resultierende Aktivität der P450-Monooxygenase ist sehr gering.²² Eine andere Möglichkeit besteht in der direkten elektrochemischen Reduktion des Häm-Eisens.²³ Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Elektronentransfer bei einer auf eine Elektrode aufgetragenen P450-Monooxygenase in etwa genauso schnell erfolgt wie

²¹ Vgl. Pflug *et al.* (2007).

²² Vgl. Fang *et al.* (1996), Hrycay *et al.* (1976) sowie Nordblom *et al.* (1976).

²³ Vgl. Kazlauskaitė *et al.* (1996) sowie Scheller *et al.* (1979).

über eine Reduktase.²⁴ Allerdings werden die Enzyme auf den Elektroden sehr schnell inaktiviert.

Eine der am häufigsten angewendeten Methoden, die stöchiometrische Zugabe von NAD(P)H zu vermeiden, ist die enzymatische Regeneration der Kofaktoren. Zur Regeneration von NADH wurde eine Vielzahl an enzymatischen Methoden entwickelt,²⁵ die sogar im industriellen Maßstab angewendet werden. So wird beispielsweise bei der Firma Evonik Industries AG²⁶ eine Formiat-Dehydrogenase eingesetzt, um den zur Produktion der Aminosäure *L-tert*-Leucin benötigten Kofaktor NADH zu regenerieren.²⁷ Zur effizienten Regeneration von NADP⁺ stehen weit weniger etablierte enzymatische Verfahren zur Verfügung. Am häufigsten werden Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasen,²⁸ Alkohol-Dehydrogenasen²⁹ oder eine veränderte Formiat-Dehydrogenase, die NADP⁺ statt NAD⁺ akzeptiert, verwendet.³⁰ Formiat-Dehydrogenasen regenerieren NAD(P)H indem sie das Salz der Ameisensäure zu CO₂ umwandeln, welches dann aus der Reaktion entweicht (Abb. 5). Dadurch bleiben, anders als bei anderen Dehydrogenasen, keine Nebenprodukte zurück. Formiat-Dehydrogenasen wurden in unserer Arbeitsgruppe zur Kofaktor-Regeneration bei der Oxidation von Fettsäuren und Duft- und Aromastoffen durch P450 BM-3 eingesetzt.³¹

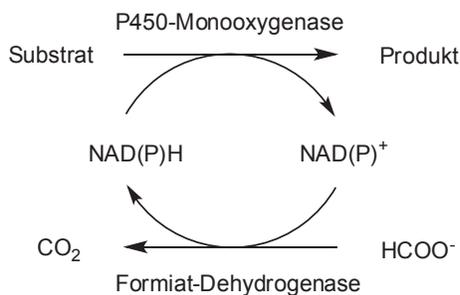


Abb. 5: Kofaktor-Regeneration durch eine Formiat-Dehydrogenase

Ein weiterer wichtiger Schritt zur Optimierung von P450-Monooxygenasen für biotechnologische Anwendungen ist die Umstellung der Kofaktor-Spezifität von NADPH auf das billigere und stabilere NADH. Im Falle einer humanen Cytochrom P450-Reduktase und einer Stickstoffmonoxid-Synthase konnte durch Austausch einer einzelnen Aminosäure eine Präferenz der Enzyme für NADH anstelle von NADPH erreicht werden.³² Für P450 BM-3 konnten wir anhand eines Homologiemodelles die in der FAD/FMN-Reduktase an der Kofaktor-Bindung beteiligten Aminosäuren identifizieren.

²⁴ Vgl. Maurer *et al.* (2003).

²⁵ Vgl. Wichmann und Vasic-Racki (2005) sowie Wichmann *et al.* (2000).

²⁶ Früher Degussa.

²⁷ Vgl. Bommarius *et al.* (1998).

²⁸ Vgl. Karaseva *et al.* (1990).

²⁹ Vgl. Kubo *et al.* (2006).

³⁰ Vgl. Seelbach *et al.* (1996).

³¹ Vgl. Kuehnel *et al.* (2007) sowie Maurer *et al.* (2005).

³² Vgl. Dohr *et al.* (2001) sowie Dunford *et al.* (2004).

Durch gezielte Austausch dieser Aminosäuren haben wir eine Variante von P450 BM-3 hergestellt, die NADH anstelle von NADPH als Kofaktor bevorzugt.³³ Diese Enzymvariante wurde von uns zusammen mit einer NAD⁺-abhängigen Formiat-Dehydrogenase erfolgreich in Biooxidationsreaktionen eingesetzt.³⁴

Stabilisierung von P450-Monooxygenasen

Wie bereits beschrieben, steht dem Einsatz von P450-Monooxygenasen häufig ihre niedrige Stabilität im Wege. P450-Monooxygenasen sind in der Regel relativ temperaturempfindlich und werden bei höheren Temperaturen schnell inaktiviert. Durch die Verwendung von thermostabilen P450-Enzymen können die Reaktionen hingegen auch bei erhöhten Temperaturen durchgeführt werden, ohne dass die Enzyme denaturieren. Bisher wurden allerdings nur drei verschiedene thermostabile P450-Monooxygenasen beschrieben.³⁵

Eine große Herausforderung stellt vor allem die Instabilität der P450-Monooxygenasen in organischen Lösungsmitteln dar. Da viele P450-Substrate in wässrigen Lösungen nur schlecht oder überhaupt nicht löslich sind, müssen häufig Lösungsvermittler verwendet werden, um die umzusetzenden Substrate für das Enzym überhaupt zugänglich zu machen. Viele organische, wassermischbare Lösungsmittel wirken sich aber bereits in niedriger Konzentration negativ auf die Stabilität und Aktivität von P450-Monooxygenasen aus.³⁶ Die Immobilisierung von Enzymen, das heißt die räumliche Fixierung von Proteinen an unlösliche Trägermaterialien, bietet die Möglichkeit, die Stabilität der Enzyme gegenüber Lösungsmitteln und höheren Temperaturen zu verbessern. Außerdem ermöglicht die Protein-Immobilisierung eine kontinuierliche Prozessführung, da die Proteine von der Reaktionslösung abgetrennt und in eine neue Reaktion eingesetzt werden können. Dies führt zu einer deutlichen Verringerung der Prozesskosten und ist deshalb besonders für industrielle Anwendungen von Bedeutung. Häufig kommt es aber bei der Immobilisierung von P450-Monooxygenasen zu einem Aktivitätsverlust der Enzyme. Dies kann einerseits durch eine Blockierung der Substrat- oder Kofaktor-Bindestellen im Verlauf der Immobilisierung verursacht werden. Andererseits kann es auch zu Abstoßungen zwischen dem Substrat und dem Trägermaterial kommen oder zur Bindung des Substrates oder Produktes an den Träger und damit zu einer geringeren gemessenen Aktivität. Bei der Immobilisierung von P450-Monooxygenasen muss zudem die Versorgung mit Elektronen, beispielsweise durch Ko-Immobilisierung der Reduktase, gewährleistet werden. Bisher wurden verschiedene P450-Monooxygenasen wie zum Beispiel das Fusionsprotein P450 BM-3³⁷ oder eine P450-Monooxygenase aus der Bäckerhefe zusammen mit ihrer Reduktase³⁸ erfolgreich immobilisiert. Eine Herausforderung stellt aber immer noch die verringerte Aktivität der immobilisierten P450-Monooxygenasen dar.

³³ Vgl. Maurer *et al.* (2005).

³⁴ Vgl. Kuehnelt *et al.* (2007).

³⁵ Vgl. Nishida und Ortiz de Montellano (2005).

³⁶ Vgl. Chefson und Auclair (2007), Vuppugalla *et al.* (2007) sowie Wong *et al.* (2004).

³⁷ Vgl. Maurer *et al.* (2003).

³⁸ Vgl. King *et al.* (1988) sowie Taylor *et al.* (2000).

Verbesserung der Enzymaktivität und -selektivität

Die in der Natur vorkommenden Enzyme sind das Produkt einer mehrere Millionen Jahre langen Evolution, bei der sie perfekt an ihre zu leistenden Aufgaben angepasst wurden. Ihre natürlichen Eigenschaften wie ihre Aktivität, Selektivität und Stabilität entsprechen aber nur selten den Anforderungen für einen biotechnologischen Einsatz. Durch Nachahmung der Evolution im Labormaßstab ist es möglich, Enzyme in kurzer Zeit ohne nähere Kenntnis ihrer Struktur oder ihres Katalysemechanismus' in ihren Eigenschaften zu verändern. Bei dieser sogenannten gerichteten Evolution werden zufällig Mutationen in ein Protein eingefügt und dabei eine Vielzahl von Enzymvarianten erstellt. In der sich anschließenden Selektion wird die aktivste oder selektivste Variante ausgewählt und als Ausgangspunkt für die Erzeugung einer neuen Generation von Enzymvarianten eingesetzt. Nachdem mehrere dieser Zyklen durchlaufen wurden, verfügt das Enzym im Idealfall über die gewünschten Eigenschaften wie verbesserte Aktivität oder Selektivität.

Alternativ kann man auch gezielt Veränderungen in Proteine einführen, um ein Enzym für industrielle Anwendungen zu optimieren. Beim sogenannten rationalen Protein Design nutzt man die über ein Protein verfügbaren Informationen, um beispielsweise Aminosäuren, die an der Substratumsetzung beteiligt sind, zu identifizieren und gezielt durch andere zu ersetzen. Die dafür notwendigen Informationen stammen aus Kristallstrukturen der Proteine, aus Strukturmodellen oder Sequenzvergleichen. Durch rationales Protein Design und gerichtete Evolution wurden bereits zahlreiche P450-Varianten hergestellt, die Verbindungen oxidieren, die nur wenig oder keine Ähnlichkeit mit Fettsäuren, den natürlichen Substraten von P450 BM-3, aufweisen (Abb. 6).

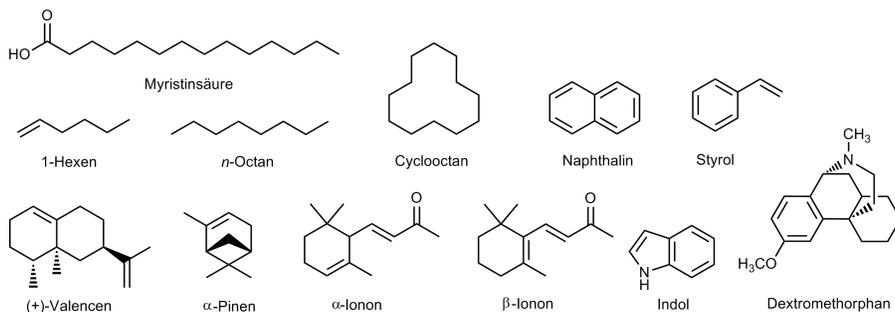


Abb. 6: Verbindungen, die von P450-Varianten oxidiert werden.

So konnten beispielsweise Varianten von P450 BM-3 gefunden werden, die die gasförmigen Alkane Propan und Ethan sowie humane Stoffwechselprodukte umsetzen.³⁹ Die Verbesserung der Selektivität von P450-Monooxygenasen ist häufig schwerer zu erreichen als eine Verbesserung der Aktivität. P450 BM-3 und verschiedene P450 BM-3-Varianten zeigen zum Beispiel gegenüber Fettsäuren eine sehr hohe Aktivität während ihre Selektivität nur gering ist, da mehrere Hydroxylierungsprodukte gebildet wer-

³⁹ Vgl. Glieder *et al.* (2002), Meinhold *et al.* (2005), Otey *et al.* (2006) sowie Peters *et al.* (2003).

den.⁴⁰ Es war uns aber möglich, P450 BM-3-Varianten zu erzeugen, die (hoch-)verzweigte Fettsäuren selektiv oxidieren und dadurch die Synthese einer Vorstufe zur Herstellung eines Makrolid-Antibiotikums ermöglichen.⁴¹

P450-Monooxygenasen sind besonders interessant für die Oxidation von preisgünstigen Naturstoffen zu hochpreisigen Aroma- und Duftstoffen, Pharmazeutika oder Bausteinen für chemische Synthesen. So werden P450-Monooxygenasen in der Oxidation von pflanzlichen Naturstoffen wie Terpenen intensiv untersucht. Ein interessantes Edukt ist beispielsweise α -Pinen, ein Abfallprodukt der Holzindustrie, dessen Oxidationsprodukte teure Verbindungen für die Aroma- und Duftstoff-Industrie sowie die pharmazeutische Industrie darstellen. Unsere Arbeitsgruppe konnte eine P450 BM-3-Variante erzeugen, die α -Pinen zum Hauptprodukt Verbenol, einem Inhaltsstoff von ätherischen Ölen und Insektenfallen, oxidiert.⁴² Eine weitere P450 BM-3-Variante wandelt Valencen in Nootkaton um, einen hochpreisigen Aromastoff.⁴³

Reaktionsoptimierung

Ein idealer biotechnologischer Prozess bei dem P450-Monooxygenasen eingesetzt werden, sollte folgende Anforderungen erfüllen:

- Das Substrat ist in der wässrigen Lösung in möglichst hoher Konzentration gelöst.
- Das Enzym ist unter den gewählten Reaktionsbedingungen stabil.
- Eine effiziente Versorgung des Enzyms mit Elektronen ist gewährleistet.
- Es steht genügend Sauerstoff zur Verfügung.
- Die Prozesskosten sind möglichst gering.

Diese Anforderungen können sowohl von *in vitro*- wie auch von *in vivo*-Prozessen erfüllt werden. Bei beiden Systemen müssen aber geeignete Lösungsvermittler gefunden werden, um die schlecht wasserlöslichen Substrate für die Enzyme im wässrigen Reaktionssystem zugänglich zu machen. Dies kann man erreichen, indem man sogenannte Zweiphasen-Systeme verwendet oder dem wässrigen System wassermischbare Lösungsvermittler zusetzt. Die Zweiphasen-Systeme bestehen aus einer wässrigen Phase und einer flüssigen, organischen Phase, in der das Substrat gelöst vorliegt. Dadurch kann das umgesetzte Substrat ständig aus der organischen Phase nachgelöst und somit ein hoher Gesamtumsatz selbst bei niedrigen Substratkonzentrationen in der wässrigen Phase erreicht werden. Auf diese Weise können auch toxische Substanzen mit hohen Ausbeuten umgesetzt werden. Viele nicht-wassermischbare Lösungsmittel führen jedoch häufig zur Inaktivierung der Enzyme beziehungsweise zum Absterben der Zellen. Um die Löslichkeit von hydrophoben Substanzen zu erhöhen, wird deshalb häufig auf polare, wassermischbare, organische Lösungsmittel zurückgegriffen. Umso höher die Konzentration des Lösungsmittels in der Reaktionslösung ist, umso mehr Substrat kann gelöst werden; umso höher ist aber auch die Inaktivierung des Enzyms beziehungsweise der Zellen. Für die Oxidation leicht flüchtiger Substanzen hat sich das Zweiphasen-System

⁴⁰ Vgl. Truan *et al.* (1999).

⁴¹ Vgl. Kuehnel *et al.* (2007).

⁴² Vgl. Branco *et al.* (2007).

⁴³ Vgl. Girhard *et al.* (2009) sowie Seifert *et al.* (2009).

als sehr geeignet gezeigt. Bei der Oxidation der flüchtigen Verbindungen α -Pinen und Cyclohexan mit einer isolierten P450 BM-3-Variante und Kofaktor-Regeneration durch eine NADP⁺-abhängige Formiat-Dehydrogenase wurden in unserer Arbeitsgruppe die Substrate selbst als organische Phase eingesetzt (Abb. 7). Dadurch wird kontinuierlich das Substrat in die wässrige Phase nachgelöst und geringe Verluste der leicht flüchtigen Substrate durch Verdunstung fallen nicht ins Gewicht. Außerdem können die Produkte in die organische Phase übergehen und während des Prozesses über diese abgetrennt werden. Dies vereinfacht die Produktaufarbeitung und erhöht gleichzeitig die Produktstabilität, da die Produkte aus der Reaktion entfernt und somit vom Enzym nicht weiter oxidiert werden können. Die mit dem beschriebenen Zweiphasen-System erreichten volumetrischen Produktivitäten bei der Oxidation von α -Pinen von bis zu 350 Milligramm pro Liter und Stunde übertreffen die bisher bekannten biotechnologischen Verfahren zur Oxidation von α -Pinen um Größenordnungen.

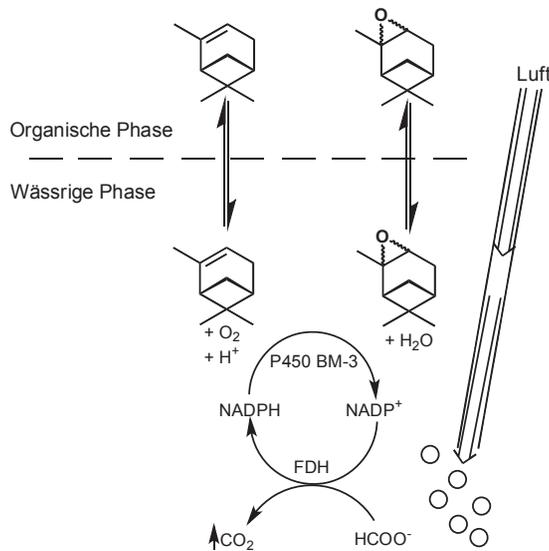


Abb. 7: *In vitro*-System zur Oxidation von α -Pinen durch eine P450 BM-3-Variante. Das Substrat selbst bildet die organische Phase und dient der Produktaufnahme, der Kofaktor wird durch eine NADP⁺-abhängige Formiat-Dehydrogenase regeneriert.

Zur selektiven Oxidation des leicht flüchtigen Substrates Valencen haben wir ein Zweiphasen-Ganzzellsystem mit einer P450-Monooxygenase aus dem Bakterium *Bacillus subtilis* entwickelt, in dem Valencen in Dodecan als organischer Phase gelöst wurde. Dadurch konnten wir hohe Substratumsätze erreichen und gleichzeitig die Überoxidation der entstandenen Produkte durch das Enzym vermeiden.⁴⁴

Für die Oxidation von nicht-flüchtigen, hydrophoben Substraten wie Fettsäuren und Fettalkoholen hat sich das *in vitro*-System mit wassermischbaren Lösungsvermittlern als

⁴⁴ Vgl. Girhard *et al.* (2009).

sehr geeignet gezeigt. Besonders gute Ergebnisse hat unsere Arbeitsgruppe mit ringförmigen Glukosemolekülen, sogenannten Cyclodextrinen, als Lösungsvermittler erzielt. Diese Zuckermoleküle sind selbst sehr gut in Wasser löslich. Sie erhöhen die Löslichkeit von hydrophoben Substanzen, indem sie diese in ihren hydrophoben, ringförmigen Innenraum aufnehmen und dabei sogenannte Wirt-Gast-Komplexe ausbilden. Dadurch wird die Zugänglichkeit der Substrate für das Enzym stark erhöht. Mit Hilfe dieser Zuckermoleküle konnten wir *in-vitro*-verschiedene hydrophobe Verbindungen mit einer NADH-abhängigen P450 BM-3-Variante und Kofaktor-Regeneration über eine NAD⁺-abhängige Formiat-Dehydrogenase im präparativen Maßstab hydroxylieren.⁴⁵ Eines dieser Produkte stellt eine wichtige Zwischenstufe für die Synthese von Makrolidantibiotika dar und ist auf chemischem Wege nur sehr schwer herstellbar.

Suche nach neuen P450-Monooxygenasen

Um das Spektrum an biotechnologisch relevanten Reaktionen und Produkten zu erweitern, müssen neue P450-Monooxygenasen identifiziert werden. Durch die ständig wachsende Zahl an sequenzierten Genomen werden immer neue P450-Monooxygenasen entdeckt. Die Charakterisierung dieser Enzyme eröffnet den Weg zu neuen Synthesebausteinen und pharmazeutischen Produkten. In Kombination mit rationalem Protein Design und gerichteter Evolution können maßgeschneiderte P450-Biokatalysatoren hergestellt werden. Diese können dann in *in vivo*- oder *in vitro*-Reaktionssystemen zur Herstellung von biotechnologischen Produkten für die chemische oder pharmazeutische Industrie eingesetzt werden.

Danksagung

Die Arbeiten wurden gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), der Arbeitsgemeinschaft industrieller Förderer (AiF), dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV), der BASF AG, dem Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg, dem Fond der Chemischen Industrie und der Universität Stuttgart. Die Autoren bedanken sich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die an den dargestellten Projekten beteiligt waren.

Literatur

- BEILEN, J. B. VAN, W. A. DUETZ, A. SCHMID und B. WITHOLT (2003). „Practical issues in the application of oxygenases“, *Trends in Biotechnology* 21, 170–177.
- BERNHARDT, R. (1996). „Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species“, *Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology* 127, 137–221.
- BERNHARDT, R. (2004). „Optimized chimeragenesis; creating diverse p450 functions“, *Chemistry and Biology* 11, 287–288.
- BOMMARIUS, A. S., M. SCHWARM und K. DRAUZ (1998). „Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals – examples and perspectives“, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 5, 1–11.

⁴⁵ Vgl. Kuehnel *et al.* (2007).

- BRANCO, R. J. F., A. SEIFERT, M. BUDDE, V. B. URLACHER, M. J. RAMOS und J. PLEISS (2007). „Anchoring effects in a wide binding pocket: The molecular basis of regioselectivity in engineered cytochrome P450 monooxygenase from *B. megaterium*“, *Proteins* 73, 597–607.
- CAPDEVILA, J. H., S. WEI, C. HELVIG, J. R. FALCK, Y. BELOSLUDTSEV, G. TRUAN, S. E. GRAHAM-LORENCE und J. A. PETERSON (1996). „The highly stereoselective oxidation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450BM-3“, *Journal of Biological Chemistry* 271, 22663–22671.
- CHEFSON, A. und K. AUCLAIR (2007). „CYP3A4 activity in the presence of organic cosolvents, ionic liquids, or water-immiscible organic solvents“, *ChemBioChem* 8, 1189–1197.
- DAVIES, H. G., R. H. GREEN, D. R. KELLY und S. M. ROBERTS (1989). „Biotransformations in preparative organic chemistry: The use of isolated enzymes and whole-cell systems in synthesis“. London, 99–155.
- DOHR, O., M. J. PAINE, T. FRIEDBERG, G. C. ROBERTS und C. R. WOLF (2001). „Engineering of a functional human NADH-dependent cytochrome P450 system“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 81–86.
- DUNFORD, A. J., K. R. MARSHALL, A. W. MUNRO und N. S. SCRUTTON (2004). „Thermodynamic and kinetic analysis of the isolated FAD domain of rat neuronal nitric oxide synthase altered in the region of the FAD shielding residue Phe1395“, *European Journal of Biochemistry* 271, 2548–2560.
- FANG, X. und R. J. HALPERT (1996). „Dithionite-supported hydroxylation of palmitic acid by cytochrome P450 BM-3.“, *Drug Metabolism and Disposition* 24, 1282–1285.
- GHISALBA, O. und M. KITTELMANN (2007). „Preparation of drug metabolites using fungal and bacterial strains“. Weinheim, 211–232.
- GILLAM, E. M., A. M. AGUINALDO, L. M. NOTLEY, D. KIM, R. G. MUNDKOWSKI, A. A. VOLKOV, F. H. ARNOLD, P. SOUCEK, J. J. DEVOSS und F. P. GUENGERICH (1999). „Formation of indigo by recombinant mammalian cytochrome P450“, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265, 469–472.
- GIRHARD, M., K. MACHIDA, M. ITOH, R. D. SCHMID, A. ARISAWA und V. B. URLACHER (2009). „Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system“, *Microbial Cell Factories* 8, 36.
- GLIEDER, A., E. T. FARINAS und F. H. ARNOLD (2002). „Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase“, *Nature Biotechnology* 20, 1135–1139.
- GUENGERICH, F. P. (2002). „Cytochrome P450 enzymes in the generation of commercial products“, *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 359–366.
- HANNEMANN, F., A. BICHET, K. M. EWEN und R. BERNHARDT (2007). „Cytochrome P450 systems – biological variations of electron transport chains“, *Biochimica et Biophysica Acta* 1770, 330–344.
- HOGG, J. A. (1992). „Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation“, *Steroids* 57, 593–616.
- HRYCAY, E. G., J. A. GUSTAFSSON, M. INGELMAN-SUNDBERG und L. ERNSTER (1976). „The involvement of cytochrome P-450 in hepatic microsomal steroid hydroxylation reactions supported by sodium periodate, sodium chlorite, and organic hydroperoxides“, *European Journal of Biochemistry* 61, 43–52.
- KARASEVA, E. I., A. N. EREMIN und D. I. METELITSA (1990). „Determination of Cortisol by Enzyme-Immunoassay Using Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase and the Antigen Immobilized on Nitrocellulose Membranes“, *Journal of Analytical Chemistry of the USSR* 45, 536–542.
- KAZLAUSKAITE, J., A. C. G. WESTLAKE, L.-L. WONG und H. A. O. HILL (1996). „Direct electrochemistry of of Cytochrome P450cam“, *Chemical Communications* 18, 2189–2190.

- KING, D. L., M. R. AZARI und A. WISEMAN (1988). „Immobilization of cytochrome P-450 enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*“, *Methods in Enzymology* 137, 675–686.
- KLINGENBERG, M. (1958). „Pigments of rat liver microsomes“, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 75, 376–386.
- KUBO, T., M. W. PETERS, P. MEINHOLD und F. H. ARNOLD (2006). „Enantioselective Epoxidation of Terminal Alkenes to (R)- and (S)-Epoxides by Engineered Cytochromes P450 BM-3“, *Chemistry* 12, 1216–1220.
- KUEHNEL, K., S. C. MAURER, Y. GALEYEVA, W. FREY, S. LASCHAT und V. B. URLACHER (2007). „Hydroxylation of dodecanoic acid and (2R,4R,6R,8R)-tetramethyldecanol on a preparative scale using an NADH-dependent CYP102A1 mutant“, *Advanced Synthesis & Catalysis* 349, 1451–1461.
- MAURER, S. C., H. SCHULZE, R. D. SCHMID und V. B. URLACHER (2003). „Immobilisation of P450 BM-3 and an NADP⁺ cofactor recycling system: Towards a technical application of heme-containing monooxygenases in fine chemical synthesis“, *Advanced Synthesis & Catalysis* 345, 802–810.
- MAURER, S. C., K. KUHNEL, L. A. KAYSSER, S. EIBEN, R. D. SCHMID und V. B. URLACHER (2005). „Catalytic hydroxylation in biphasic systems using CYP102A1 mutants“, *Advanced Synthesis & Catalysis* 347, 1090–1098.
- MEINHOLD, P., M. W. PETERS, M. M. Y. CHEN, K. TAKAHASHI und F. H. ARNOLD (2005). „Direct conversion of ethane to ethanol by engineered cytochrome P450BM3“, *ChemBioChem* 6, 1765–1768.
- MINERS, J. O. (2002). „Evolution of drug metabolism: hitchhiking the technology bandwagon“, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29, 1040–1044.
- MUNRO, A. W., S. DAFF, J. R. COGGINS, J. G. LINDSAY und S. K. CHAPMAN (1996). „Probing electron transfer in flavocytochrome P-450 BM3 and its component domains“, *European Journal of Biochemistry* 239, 403–409.
- MUNRO, A. W., D. G. LEYS, K. J. MCLEAN, K. R. MARSHALL, T. W. OST, S. DAFF, C. S. MILES, S. K. CHAPMAN, D. A. LYSEK, C. C. MOSER *et al.* (2002). „P450 BM3: the very model of a modern flavocytochrome“, *Trends in Biochemical Sciences* 27, 250–257.
- MUNRO, A. W., H. M. GIRVAN und K. J. MCLEAN (2007). „Cytochrome P450–redox partner fusion enzymes“, *Biochimica et Biophysica Acta* 1770, 345–359.
- NARHI, L. O. und A. J. FULCO (1987). „Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*“, *Journal of Biological Chemistry* 262, 6683–6690.
- NELSON, D. R., T. KAMATAKI, D. J. WAXMAN, F. P. GUENGERICH, R. W. ESTABROOK, R. FEYEREISEN, F. J. GONZALEZ, M. J. COON, I. C. GUNSALUS und O. GOTOH (1993). „The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature“, *DNA and Cell Biology* 12, 1–51.
- NISHIDA, C. R. und P. R. ORTIZ DE MONTELLANO (2005). „Thermophilic cytochrome P450 enzymes“, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, 437–445.
- NORDBLOM, G. D., R. E. WHITE und M. J. COON (1976). „Studies on hydroperoxide-dependent substrate hydroxylation by purified liver microsomal cytochrome P-450“, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 175, 524–533.
- OMURA, T. und R. SATO (1964). „The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties“, *Journal of Biological Chemistry* 239, 2379–2385.
- OTEY, C. R., G. BANDARA, J. LALONDE, K. TAKAHASHI und F. H. ARNOLD (2006). „Preparation of human metabolites of propranolol using laboratory-evolved bacterial cytochromes P450“, *Biotechnology and Bioengineering* 93, 494–499.

- PETERS, M. W., P. MEINHOLD, A. GLIEDER und F. H. ARNOLD (2003). „Regio- and Enantioselective Alkane Hydroxylation with Engineered Cytochromes P450 BM-3“, *Journal of the American Chemical Society* 125, 13442–13450.
- PETERSON, D. H., H. C. MURRAY, S. H. EPPSTEIN, L. M. REINEKE, A. WEINTRAUB, P. D. MEISTER und H. M. LEIGH (1952). „Microbiological Transformations of Steroids. 1. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone“, *Journal of the American Chemical Society* 74, 5933–5936.
- PFLUG, S., S. M. RICHTER und V. B. URLACHER (2007). „Development of a fed-batch process for the production of the cytochrome P450 monooxygenase CYP102A1 from *Bacillus megaterium* in *E. coli*“, *Journal of Biotechnology* 129, 481–488.
- PICATAGGIO, S., T. ROHRER, K. DEANDA, D. LANNING, R. REYNOLDS, J. MIELENZ und L. D. EIRICH (1992). „Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic acids“, *Bio/Technology (N Y)* 10, 894–898.
- PRITCHARD, M. P., L. McLAUGHLIN und T. FRIEDBERG (2006). „Establishment of functional human cytochrome P450 monooxygenase systems in *Escherichia coli*“, *Methods in Molecular Biology* 320, 19–29.
- SCHELLER, F., R. RENNEBERG, W. SCHWARZE, G. STRNAD, K. POMMERENING, H. J. PRUMKE und P. MOHR (1979). „Electrochemical investigations on the oxygen activation by cytochrome P-450“, *Acta Biologica et Medica Germanica* 38, 503–509.
- SEELBACH, K., B. RIEBEL, W. HUMMEL, M. R. KULA, V. I. TISHKOV, A. M. EGOROV, C. WANDREY und U. KRAGL (1996). „A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase“, *Tetrahedron Letters* 37, 1377–1380.
- SEIFERT, A., S. VOMUND, K. GROHMANN, S. KRIENING, V. B. URLACHER, S. LASCHAT und J. PLEISS (2009). „Rational design of a minimal and highly enriched CYP102A1 mutant library with improved regio-, stereo- and chemoselectivity“, *ChemBioChem* 10, 853–861.
- SONO, M., M. P. ROACH, E. D. COULTER und J. H. DAWSON (1996). „Heme-containing oxygenases“, *Chemical Reviews* 96, 2841–2888.
- TAYLOR, M., D. C. LAMB, R. J. CANNELL, M. J. DAWSON und S. L. KELLY (2000). „Cofactor recycling with immobilized heterologous cytochrome P450 105D1 (CYP105D1)“, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279, 708–711.
- TRUAN, G., M. R. KOMANDLA, J. R. FALCK und J. A. PETERSON (1999). „P450BM-3: absolute configuration of the primary metabolites of palmitic acid“, *Carcinogenesis* 366, 192–198.
- VUPPUGALLA, R., S. Y. CHANG, H. ZHANG, P. H. MARATHE und D. A. RODRIGUES (2007). „Effect of Commonly Used Organic Solvents on the Kinetics of Cytochrome P450 2B6- and 2C8-Dependent Activity in Human Liver Microsomes“, *Drug Metabolism and Disposition* 35, 1990–1995.
- WICHMANN, R., C. WANDREY, A. F. BUCKMANN und M. R. KULA (2000). „Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXIII, No. 12, Pages 2789–2802 (1981)“, *Biotechnology and Bioengineering* 67, 791–804.
- WICHMANN, R. und D. VASIC-RACKI (2005). „Cofactor regeneration at the lab scale“, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 92, 225–260.
- WONG, T. S., F. H. ARNOLD und U. SCHWANEBERG (2004). „Laboratory evolution of cytochrome p450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents“, *Biotechnology and Bioengineering* 85, 351–358.

ISBN 978-3-940671-71-4



9 783940 671714