

**Biotransformation von 11-Desoxycortisol mit  
*Schizosaccharomyces pombe* und  
*Aspergillus nidulans***

VON DER FAKULTÄT CHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART  
ZUR ERLANGUNG DER WÜRDE EINES  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
GENEHMIGTE ABHANDLUNG

VORGELEGT VON  
**Daniel Appel**  
AUS HEILBRONN

HAUPTBERICHTER: PROF. DR. ROLF D. SCHMID  
MITBERICHTER: PD DR. PETER FISCHER  
PRÜFUNGSVORSITZ: PROF. DR. DIETER H. WOLF

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 16. SEPTEMBER 2005

INSTITUT FÜR TECHNISCHE BIOCHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART  
2005

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Stuttgart, den 04.08.2005

**Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt**  
(Albert Einstein)

Für Sonja

Meinen Eltern gewidmet

## Danksagung

Prof. Dr. Rolf D. Schmid danke ich für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas, das mir eine umfassende Einarbeitung in aktuelle Fragestellungen der Biotechnologie ermöglichte und für seine stetige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt Dr. Vlada Urlacher für ihren unermüdlichen Einsatz und die vielen interessanten Diskussionen und Ratschläge.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Priv. Doz. Dr. Peter Fischer für die viele Zeit und die unschätzbare Hilfe bei der Auswertung der NMR Spektren und den anregenden Diskussionen.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit.

Für die gute Zusammenarbeit innerhalb dieses Projektes danke ich Dr. Matthias Bureik und Dipl.-Biol Calin Dragan.

Dirk Michel und Sven Richter danke ich für die Hilfe bei unzähligen Fermentationen, den interessanten und konstruktiven Diskussionen und für die außerordentlich gute Zusammenarbeit in diesen 3 Jahren.

Ganz herzlich danke ich Steffen Maurer, Michael Budde, Sascha Schuster, Dr. Oliver Lentz, Matthias Dietrich und Dr. Monika Rusnak für das freundschaftliche Verhältnis innerhalb und außerhalb des Instituts und die fruchtbare und angenehme Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für technische Biochemie, für das gute Arbeitsklima und die angenehme Zusammenarbeit.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Abstract .....</b>	<b>4</b>
<b>3 Einleitung .....</b>	<b>9</b>
3.1 Hormone .....	9
3.2 Steroide .....	10
3.2.1 Einteilung der Steroidhormone .....	12
3.2.2 Wirkungsmechanismus von lipophilen Hormonen (Steroide).....	13
3.2.3 Biosynthese der Corticosteroide.....	16
3.2.4 Abbau von Corticosteroiden .....	18
3.2.5 Geschichte der Entdeckung von Cortison .....	20
3.2.6 Steroidherstellung – Gestern und Heute .....	22
3.3 Die Enzymklasse der Cytochrom-P450-Monooxygenase.....	26
3.3.1 Die P450-Superfamilie – eine der größten bekannten Enzymfamilien.....	26
3.3.2 Struktur und Aufbau von P450-Systemen .....	28
3.3.3 Katalysierte Reaktionen durch P450-Monooxygenase .....	31
3.3.4 Eukaryotische P450-Monooxygenase .....	32
3.3.5 CYP11B1 und CYP11B2 .....	34
3.4 Spalthefe – <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	36
3.4.1 Zellzyklus von <i>S. pombe</i> .....	38
<b>4 Zielsetzung .....</b>	<b>40</b>
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
5.1 Assay-Entwicklung zum Nachweis von Hydrocortison und Hydrocortisonderivaten .....	43
5.1.1 Nachweis von 11-Desoxycortisol und Hydrocortison mit konz. Schwefelsäure .....	44
5.1.2 Fluoreszenzspektren von Hydrocortison und 11-Desoxycortisol .....	46
5.1.3 Entwicklung eines Fluoreszenz-Assay für den Nachweis von Hydrocortison .....	48
5.2 HPLC-Analytik – Retentionszeiten der Standardsubstanzen.....	55
5.3 HPLC/MS-Analytik – Massenspektren der Standardsubstanzen.....	58
5.4 Fermentationsoptimierung des rekombinanten <i>S. pombe</i> Stammes CAD1 .....	60
5.4.1 pH-Optimum des rekombinanten Spalthefestammes CAD1 .....	61
5.4.2 Inkubationsdauer der Fermenter-Vorkultur .....	62

5.4.3	Einfluss der Glucosemenge auf die Wachstumsgeschwindigkeit von <i>S. pombe</i> .....	63
5.4.4	Einfluss der Leucinkonzentration auf die Wachstumsgeschwindigkeit des rekombinanten <i>S. pombe</i> Stammes CAD1 .....	65
5.4.5	5 L-Batch-Fermentation von <i>S. pombe</i> CAD1 zur Bestimmung der Biotrockenmasse.....	66
5.4.6	5 L-Fed-Batch-Fermentation von <i>S. pombe</i> CAD1 .....	67
5.4.7	Nebenproduktbildung bei Umsetzung von 11-Desoxycortisol mit <i>S. pombe</i> CAD1 – HPLC-Analyse.....	69
5.4.8	30 L-Fed-Batch-Fermentation von <i>S. pombe</i> CAD1 – Biotransformation von 11-Desoxycortisol zu Hydrocortison.....	71
5.4.9	Struktursicherung der Nebenprodukte NP1 und NP2 durch HPLC/MS-Analyse .....	73
5.4.10	Strukturaufklärung der Nebenprodukte NP1 und NP2 durch <sup>1</sup> H-NMR.....	76
5.5	Fermentationsoptimierung des rekombinanten <i>S. pombe</i> Stamms CAD13 .....	77
5.5.1	Inkubationsdauer der Vorkultur bei Verwendung von <i>S. pombe</i> CAD13 .....	79
5.5.2	30 L-Fed-Batch-Fermentation mit <i>S. pombe</i> CAD13 .....	81
5.5.3	30 L-Fed-Batch-Fermentation mit <i>S. pombe</i> CAD13 – Variation der Glucosekonzentration..	82
5.5.4	30 L-Fed-Batch-Fermentation mit <i>S. pombe</i> CAD13 und Fiechter-Medium .....	84
5.5.5	Umsetzung von MAS mit <i>S. pombe</i> CAD13.....	86
5.6	Screening verschiedener Mikroorganismen auf 11-Hydroxylase-Aktivität mit Fluoreszenz-Assay .....	87
5.6.1	Analyse der unbekanntenen Produkte von <i>A. nidulans</i> und <i>P. citronellolis</i> durch HPLC/MS .....	91
5.6.2	Struktursicherung des unbekanntenen Produkts von <i>A. nidulans</i> durch <sup>1</sup> H-NMR .....	94
5.7	Steroid-Biotransformation mit <i>Aspergillus nidulans</i> .....	95
5.7.1	Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol .....	96
5.7.2	Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol-17-acetat (MAS).....	97
5.7.3	Hydroxylierung von Progesteron .....	98
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>104</b>
6.1	Entwicklung eines Assay zum Nachweis von Hydrocortison und Hydrocortisonderivaten....	104
6.2	Fermentations-Optimierung für <i>S. pombe</i> CAD1 und CAD13.....	109
6.3	Steroid-Biotransformation mit <i>Aspergillus nidulans</i> .....	112
<b>7</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>114</b>
7.1	Geräte und Verbrauchsmittel .....	114
7.1.1	Geräteliste .....	114
7.1.2	Chemikalien und Enzyme .....	117
7.1.3	Kulturmedien.....	118
7.1.4	Lösungen für Kultivierung und Expression.....	121
7.1.5	Puffer, HPLC-Laufmittel und andere Lösungen .....	121
7.1.6	Standardlösungen für die HPLC-Analytik.....	122
7.2	Mikrobiologische Methoden.....	123

7.2.1	Photometrische Bestimmung der Zelldichte .....	123
7.2.2	Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM).....	124
7.2.3	Stammhaltung und Kultivierung von <i>S. pombe</i> .....	124
7.2.4	Stammhaltung und Kultivierung von <i>A. nidulans</i> .....	125
7.3	Analytische Methoden .....	126
7.3.1	HPLC-Analytik .....	126
7.3.2	Fluoreszenz-Analytik .....	130
7.4	Fermentation .....	132
7.4.1	Versuchsaufbau der 5 L- und 30 L-Fermentationsexperimente.....	132
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>136</b>

## Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr(e)	HPLC	High performance liquid chromatography
Å	Angström	HRE	Hormon response element
ACTH	Adrenocortikotropes Hormon	hsp	Heat shock protein
ADR	Adrenodoxin Reduktase	HTS	High Throughput Screening
ADX	Adrenodoxin	IBMK	Isobutylmethylketon
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	kB	Kilobase (1000 Basenpaare)
APS	Ammoniumpersulfat	$k_{cat}$	Wechselzahl
AS	Aminosäure	kDa	Kilo-Dalton
BFM	Biofeuchtmasse	$K_M$	Michaelis-Konstante
bp	Basenpaare	$KP_i$	Kaliumphosphat-Puffer mit unterschiedlichem Verhältnis von Kaliumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat
BTM	Biotrockenmasse	L	Liter
C	Konzentration	LB	Luria-Bertani Medium
°C	Celsius	LDL	Low Density Lipoprotein
<i>C. lunata</i>	<i>Curvularia lunata</i>	M	Mol pro Liter
CRH	Corticotropin releasing hormon	MAS	11-Desoxycortisol-17-acetat
CYP	Cytochrom P450	MAF	Hydrocortison-17-acetat
d	Tag(e)	mg	Milligramm
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser	min	Minute
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser	mL	Milliliter
DMF	Dimethylformamid	$M_r$	Molekulargewicht
DMSO	Dimethylsulfoxid	mM	Millimol pro Liter
DNA	Desoxyribonucleinsäure	mRNA	messenger-RNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	MS	Massenspektrometrie
EAF	Hydrocortison-21-acetat	MTP	Mikrotiterplatte
EAS	11-Desoxycortisol-21-acetat	(m/v)	Masse / Volumen
E.C.	Enzyme Commission	NAD	$\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	NADH	$\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	NADP	$\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
Em	Emmissions Wellenlänge	NADPH	$\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
EMM	Edinburgh Minimal Medium	NMR	Kernspin-Resonanz ( <b>nuclear magnetic resonance</b> )
ESR	Elektronenspinresonanz	nmt	No message with thiamine (Promotor)
etp	Electron transfer protein		
Ex	Extinktions Wellenlänge		
EXAFS	Weitreichende Röntgenabsorptionsspektroskopie		
FAD	Flavinadenindinucleotid		
FMN	Flavinadeninmononucleotid		
g	Gramm		
h	Stunde(n)		
HC	Hydrocortison		



## Abkürzungsverzeichnis

OD <sub>xxx</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von xxx nm	<i>S. pombe</i>	<i>Shizosaccharomyces pombe</i>
P450	Pigment, das bei 450 nm absorbiert (Cytochrom)	SDS	Natriumdodecylsulfat
P450 <sub>cam</sub>	Campherhydroxylase CYP101 aus <i>Pseudomonas putida</i>	sp.	Spezies
P450 <sub>eryF</sub>	CYP107A1 aus <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	t	Tonne
P450 <sub>nor</sub>	NO-Monoxygenase(CYP55A1) aus <i>Fusarium oxysporum</i>	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
P450 <sub>terp</sub>	$\alpha$ -Terpineolhydroxylase (CYP108) aus <i>Pseudomonas sp.</i>	THF	Tetrahydrofuran
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
pH	Potentia hydrogenii	U	Unit (Stoffmengenumsatz in $\mu\text{mol pro Minute}$ )
RNA	Ribonucleinsäure	ÜN	Über Nacht
RSS	11-Desoxycortisol	Upm	Umdrehungen pro Minute
t <sub>R</sub>	Retentionszeit	UV	Ultraviolett
RT	Raumtemperatur	v <sub>F</sub>	Fließgeschwindigkeit (flow)
s	Sekunde	VIS	sichtbarer Bereich des Lichts
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(v/v)	Volumen / Volumen
		WT	Wildtyp
		YE	Hefe Extrakt
		$\mu\text{M}$	Mikromol pro Liter

# 1 Zusammenfassung

Der größte Teil dieser Arbeit, die Etablierung eines optimierten Fermentationsverfahrens für *Schizosaccharomyces pombe*, ist Teil eines vom BMBF unterstützen Projekts zur Produktion von Hydrocortison (Cortisol) aus 11-Desoxycortisol (Reichstein S) mit Hilfe rekombinanter Spaltheferzellen. In diesem Projekt, welches in Kooperation mit dem Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes und der Schering AG Bergkamen durchgeführt wurde, sollte mit Hilfe von rekombinanten Spaltheferstämmen, welche die humane Monooxygenase P450 CYP11B1 exprimieren, eine nachhaltigere Bio-Produktion von Hydrocortison entwickelt werden, um das bestehende Verfahren der Hydrocortisonherstellung, mittels des filamentösen Pilz *Curvularia lunata* zu ersetzen.

Um die Optimierung der Hydrocortisonproduktion im Fermenter zu verfolgen, wurde zunächst ein alternatives Nachweissystem für Hydrocortison entwickelt, welches eine schnellere semi-quantitative Bestimmung der Hydrocortisonmenge im Fermenter erlaubt. Der im ersten Teil dieser Arbeit entwickelte Assay basiert auf der Bildung eines Fluorophors bei Inkubation von Hydrocortison mit einer konzentrierten Schwefelsäure/Essigsäure-Mischung. Um die Detektionsgrenze des Assays zu senken, wurde die Steroidisolierung (Extraktion) optimiert. Der so entwickelte Assay erlaubt eine direkte semi-quantitative Bestimmung des Hydrocortisons und dient dazu, die Veränderungen der Hydrocortison-Bildungsraten während der Fermentation zu überwachen. Für die Bestimmung der exakten Hydrocortison-Mengen wurde eine bereits beschriebene HPLC-Methode verwendet.

Die Optimierung der Fermentation wurde hauptsächlich mit den beiden rekombinanten *S. pombe* Stämmen CAD1 und CAD13 durchgeführt, welche die humane CYP11B1 Monooxygenase mitochondrial exprimieren. Beide Stämme wurden am Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes entwickelt. Die ersten rekombinanten Stämme zeigten Umsatzraten von nur  $3,1 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$ . Diese Rate konnte für den CAD1-Stamm durch Fermentationsoptimierung auf  $70,6 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  erhöht werden. Durch Einbringen einer zusätzlichen Kopie des CYP11B1 auf einem autosomal replizierenden TOPO-Plasmid (CAD13-Stamm) ließ sich die Expressionsrate des P450 CYP11B1 und somit auch die Umsatzrate von Hydrocortison auf  $168 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  steigern. Durch die Optimierung der Fermentationsbedingungen bezüglich

Umsatzrate und Biomasseproduktion wurde ein Fed-Batch-Prozess entwickelt, welcher eine gesteigerte Raum-Zeit-Ausbeute ermöglichte, jedoch auch zur Bildung von Steroid-Nebenprodukten führte. Die Struktur dieser zwei Nebenprodukte konnte durch HPLC/MS- und  $^1\text{H-NMR}$ -Analyse aufgeklärt werden. Eines der Nebenprodukte könnte auf eine erhöhte Acetat-Bildung während der Fermentation zurückzuführen sein und stellt keine qualitative Beeinträchtigung des Prozesses dar. Das zweite Nebenprodukt, ein dehydrogeniertes 11-Desoxycortisol-Derivat, wird spezifisch durch *S. pombe* gebildet und ließ sich auch durch weitere Optimierung nicht unterdrücken.

Der im ersten Teil entwickelte Hydrocortison-Assay wurde zum Screening eingesetzt, um Stämme zu finden, welche in der Lage sind, eine Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol an Position 11 des Steroidgrundgerüsts durchzuführen. Trotz der eigentlich unspezifischen Reaktion des Hydrocortison-Assays bilden nur Steroide mit einer Hydroxyl-Gruppe an Position 11 einen fluoreszierenden Farbstoff aus. Beim Screening einiger am Institut für Technische Biochemie vorhandenen Stämme konnte bei dem filamentösen Pilz *Aspergillus nidulans* eine hohe 11-Hydroxylierungs-Aktivität bei Verwendung von 11-Desoxycortisol als Substrat festgestellt werden. Die HPLC/MS- und  $^1\text{H-NMR}$ -Analyse zeigte die Bildung von *epi*-Hydrocortison (11 $\alpha$ -Hydroxylierung), eines pharmakologisch unwirksamen Epimeren von Hydrocortison (11 $\beta$ -Hydroxylierung).

Durch die hohe Regioselektivität der gefundenen Reaktion wurde in weiteren Experimenten Progesteron als Substrat verwendet, welches in Säugetieren durch Hydroxylierung in 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron überführt wird. Nach Analyse mit  $^1\text{H-NMR}$  konnte gezeigt werden, dass Progesteron durch *Aspergillus nidulans* regioselektiv in 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron überführt wird.

Es konnte in dieser Arbeit ein Steigerung der Hydrocortison-Bildungsrate durch Optimierung von diversen Fermentationsparametern von  $3,1 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  auf  $168 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  erreicht werden. Eine weitere Optimierung der verwendeten Stämme ist unbedingt erforderlich, da eine Nebenproduktbildung, wie die eines dehydrogenierten 11-Desoxycortisol-Derivats durch *S. pombe*, bei der Herstellung pharmakologischer Wirkstoffe nicht tolerierbar ist.

Durch das entwickelte alternative Nachweisverfahren von Hydrocortison konnte ein filamentöser Pilz gefunden werden, welcher eine hohe 11-Hydroxylierungs-Aktivität

gegenüber 11-Desoxycortisol und Progesteron zeigt, und die gebildeten Produkte durch NMR identifiziert werden. Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *Aspergillus nidulans* erlaubt, die für die gefundene Aktivität verantwortlichen P450-Isoenzyme zu identifizieren und in andere Hefestämme wie *Pichia pastoris* zu klonieren.

## 2 Abstract

The main goal of this work, the development and establishment of an optimized fermentation method for the production of hydrocortisone using recombinant *Shizosaccharomyces pombe* strains was part of the BMBF project "Production of hydrocortisone using recombinant fission yeast strains". This project was carried out in cooperation with the Institute for Biochemistry from the University of Saarbruecken and Schering AG Bergkamen. All recombinant *S. pombe* strains described in this work were constructed in the Institute for Biochemistry, University of Saarbruecken.

Bureik et al. described 2002 the functional expression of the human aldosterone synthase (CYP11B2) and the detection of a suitable electron transfer protein (etp1) in fission yeast capable of transferring electrons to the CYP11B2 localized in the mitochondrial membrane. The etp1 protein shows high homology in the C-terminal part to Adrenodoxin which is responsible for the electron transfer to mitochondrial P450s in nature. The described turnover rate for hydrocortisone, when using 11-desoxycortisol (Reichstein substance S) as a substrate was calculated to  $3.1 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$ . Because of these findings it could be possible to develop a process which is capable of replacing the current process in use by the Schering AG which is based on the production of hydrocortisone using the filamentous fungus *Curvularia lunata*.

The first strain developed for fermentation optimization was the strain CAD1. This strain bears the human P450 *CYP11B1* monooxygenase gene under the control of an *nmt*-promotor. The plasmid integrated in the genome of *S. pombe* by homologous recombination in the *leu1*-locus of chromosome 2 of the genome. Therefore the resulting recombinant strain was leucine auxotrophic towards. The second strain which was developed, CAD13, has an additional TOPO plasmid which bears the *CYP11B1* gene under the control of *nmt*-promotor. This plasmid has a autosomal replication sequence and therefore was not integrated into the genome. As this plasmid also bears the *leu1* gene the resulting strains shows no auxotrophy anymore. This strain should increase the cortisol production rate because of the two copies of the *CYP11B1* gene one integrated into the genome of *S. pombe* the other one in the TOPO plasmid, both under the same promotor. The promotor itself limited the use of media for fermentation optimization because genes under this promotor would not be expressed in the presence of thiamine, therefore only thiamin free media could be

used during fermentation. As there was no possibility to induce the expression system the CYP11B1 monooxygenase was constitutively expressed, thus limiting the maximum rate of growth.

In the first part of this work a new assay system for detection of cortisol was developed for monitoring the cortisol production rate when altering crucial growth parameters during fermentation. The detection of cortisol using HPLC is a precise but time consuming method for cortisol detection. Therefore a fast, semi-quantitative method was developed which is based upon the formation of a fluorimetric dye when incubating cortisol with a mixture of conc. sulfuric and acetic acid. This reaction demands the absence of water in order, to protonate the hydroxyl and keto-groups of the steroid backbone. Therefore cortisol had to be extracted from the media using 2-methyl-4-pentanone. This solvent shows a higher extraction rate for cortisol and 11-desoxycortisol than any other tested solvent like dichloromethane or trichloromethane.

The reaction mixture yields a yellow fluorescent dye, which exhibits a maximum extinction at 475 nm and an emission at 525 nm, and a purple dye when using 11-desoxycortisol with no significant fluorescence at these wavelengths. The fluorescence is based upon the formation of a charged resonance complex due to the protonation of the 3-keto group in the A-ring of the steroid backbone and the protonation of the 11-hydroxy group in the C-ring. Only if at both positions positively charged resonance complexes are formed the resulting dye will exhibit fluorescence. In addition, it was found, that 2-methyl-4-pentanone enhances the fluorescence if used in the assay, thus lowering the detection limit to 2.7  $\mu\text{M}$  of cortisol. Due to this fact there was no need of solvent evaporation, thus lowering the assay time to 15 min. The assay suffers marginally from fluorescence interference of 11-desoxycortisol yielding a standard error below 9 %. The fluorescence of the fermentation samples was measured using black microtiter plates in a BMG Fluostar spectrometer at ex: 470 nm and em: 530 nm. Both methods, HPLC and fluorescence assay, were used in the following fermentation optimization, but for exact quantification of the cortisol production only the HPLC method was used, due to the low standard error of below 2 %.

The fermentation optimization was started using the *S. pombe* strain CAD1. A minimal medium (EMM-media) was used to determine the optimal pH-value for *S. pombe* growth. This was done in 1 L shaking flasks with 200 mL of EMM-media. The pH-range was set from 2 – 8. It was found that *S. pombe* highest rate of growth is between pH 4.5 and 5.5. There was no detectable growth at pH values above 7 and below 2.5.

As it is best that the cells in the preculture are in the exponential phase of growth, to minimize the lag phase after inoculation, the growth in 200 mL precultures was studied during a period of 24 h. It was shown, that after 15 h the cells reach the exponential phase of growth when inoculated with an  $OD_{595\text{ nm}}$  of approximately 0.1. So the optimal incubation time of the precultures was set to 16 h of growth.

A fed-batch strategy was found to show slow but continuous growth, forming only low amounts of metabolic byproducts like acetate or ethanol. To reduce the amount of byproducts to a minimum the critical carbon source (Glucose) concentration was lowered to 0.5 g/L. The fed-batch fermentation process was started using a batch process for biomass production, with a glucose concentration of 20 g/L. To reduce metabolic byproducts e.g. acetat, formed in the batch process, a transition state (1h) between the batch and the fed-batch process, in which no glucose was available to the cells was used. After starting the fed-batch process 11-desoxycortisol dissolved in ethanol was added to a final concentration of 1.0 mM. For continuous growth a 10 x glucose and a 10 x salt inlet were used. For optimal growth the salt flow should be half the value of the glucose flow.

The cortisol turnover rate was determined to  $70.6\ \mu\text{M}\cdot\text{d}$ . HPLC analysis revealed two steroid byproducts during cortisol production, showing the same absorption spectrum as cortisol or 11-desoxycortisol. After analysis using HPLC/MS their mass was determined to be 344.1 for byproduct 1 and 388.1 for byproduct 2. After NMR analysis their structure were determined to 6,7-didehydro-11-desoxycortisol (additionally double bond in the b-ring) for byproduct 1 and 11-desoxycortisol-21-acetate for byproduct 2. NMR analysis of the substrate 11-desoxycortisol showed that byproduct 2 is a contamination of it, where as byproduct 1 is specifically formed by a yet unknown dehydrogenase of *S. pombe*. To prove this the wild type *S. pombe* strain and the CAD1 strain in presence of 15  $\mu\text{M}$  thiamine were incubated with 11-desoxycortisol. In both experiments 6,7-didehydro-11-desoxycortisol could be detected with HPLC.

Further optimization experiments were done using the recombinant *S. pombe* CAD13 strain. As this strain expressed two copies of the CYP11B1 gene one in the chromosome and one copy in the TOPO plasmid, the growth rate dropped to  $\mu_{\max} = 0,01$ . To increase cortisol production the influence of the glucose concentration on the formation of cortisol was examined. As most of the NADH which is the electron source for CYP11B1 is formed during the glycolysis an increased amount of glucose should increase the amount of NADH, but will also increase the production of byproducts like acetate or ethanol. To test the influence of glucose on the production rate of cortisol, the glucose concentration was increased during a fed-batch fermentation starting from 5 g/L increasing to 10 g/L and up to 20 g/L. Every glucose stage was kept constant for at least 10 hours to let the cells adapt to the conditions. The production rate of cortisol increased to 144  $\mu\text{M}\cdot\text{d}$  when using 20 g/L glucose. To increase the biomass and the cortisol production rate a new minimal media called Fiechter-medium was used, which contains additional vitamins and a higher amount of iron salts compared to the EMM-medium. Cortisol production increased to 168  $\mu\text{M}\cdot\text{d}$  with this medium. But nevertheless the byproduct formation rate of 6,7-didehydro-11-desoxycortisol was found to be unchanged.

In the last part of this work a screening for 11-hydroxylase activity using the fluorescence assay developed in the first part was performed using randomly selected strains available at the Institute for technical Biochemistry using 11-desoxycortisol as a substrate. The following strains were selected for screening: *Aspergillus nidulans*, *Thermus thermophilus*, *Pseudomonas citronellolis*, *Pseudomonas putida*, *Curvularia lunata*, *Pseudomonas fluorescence*, *Pseudomonas savastanoi*, *Sphingomonas echinoids*. As a reference the amount of cortisol produced by the recombinant *S. pombe* strain CAD1 was used. Samples isolated from the biotransformation of *Aspergillus nidulans*, *Pseudomonas citronellolis* and *Curvularia lunata* showed strong fluorescence. As it is known from literature, *Curvularia lunata* produces cortisol and also 7 $\alpha$ - and 14 $\alpha$  11-Desoxycortisol-Derivates, so no further investigation of this supernatant was performed. *Pseudomonas citronellolis* is known to degrade resin acids which have a similar structure compared to steroids where as no 11-hydroxylation activity of *Aspergillus nidulans* had yet been reported. Due to this fact further analysis of biotransformations with *Pseudomonas citronellolis* and *Aspergillus nidulans* with HPLC, HPLC/MS and  $^1\text{H-NMR}$  was performed.



HPLC analysis of samples from *Pseudomonas citronellolis*, showed a peak with nearly the same retention time of cortisol, and with a similar wavespectrum in the range of 200- 400 nm. However HPLC/MS analysis of this peak revealed that the formed product with a total mass of 346.1 was not a mono-hydroxylated substance, and thus was of no interest for further analysis.

The extracted supernatant of *Aspergillus nidulans*, analyzed using HPLC, showed peak with a retention time  $t_R$ : 5.2 min, somewhat smaller than cortisol  $t_R$ : 5.7 min. Also the wavespectrum in the range of 200 – 400 nm was similar to cortisol. Analyzing this peak using HPLC/MS showed a molecule mass of 362.1, a monohydroxylated 11-desoxycortisol. As the retention time in the HPLC differs too much from cortisol,  $^1\text{H-NMR}$  analysis was performed yielding that the hydroxylated steroid is *epi*hydrocortison. So it was clear that *Aspergillus nidulans* performs an  $11\alpha$ -hydroxylation of 11-desoxycortisol with a high regioselectivity as no other products were found. Concerning the unspecific reaction of the developed fluorescence assay it was not surprising that the assay can not distinguish between  $11\alpha$  and  $11\beta$ -hydroxylation.

When using 11-desoxycortisol-17-acetate (MAS) as a substrate for biotransformation with *Aspergillus nidulans*, it was found that the additional acetat-group yielded 25.6 % hydrocortisone and 74.4 % *epi*hydrocortison.

As *epi*hydrocortison has no therapeutical effect, a substrate was sought-after which can be used for  $11\alpha$ -hydroxylation.  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone is known to be a strong inhibitor of the  $11\beta$ -dehydrogenase and therefore has a pharmacological value. So progesterone was used as a substrate for biotransformation with *Aspergillus nidulans*. Results obtained with HPLC analysis showed that also progesterone is exclusively converted to  $11\alpha$ -progesterone by *Aspergillus nidulans*.

## 3 Einleitung

### 3.1 Hormone

Hormone sind chemische Signalstoffe. Sie werden in spezialisierten Zellen gebildet, die häufig zu endokrinen Drüsen zusammengefasst sind. Jedes Hormon kann als Mittelpunkt eines hormonalen Regulationssystems betrachtet werden, das aus verschiedenen Gliedern besteht. Spezialisierte Drüsenzellen synthetisieren das Hormon aus Vorstufen, können es in vielen Fällen speichern und schütten es bei Bedarf in die Blutbahn aus. Die Hormone werden ins Blut ausgeschüttet und von diesem zu den Erfolgsorganen transportiert. Dort üben Hormone bestimmte physiologische und biochemische Regulationsfunktionen aus. Der Transport des Hormons erfolgt häufig über eine reversible Bindung an Plasmaproteine, sog. Hormoncarrier. Durch enzymatische Reaktionen, die oft in der Leber ablaufen, wird das Hormon inaktiviert. Schließlich werden das Hormon und seine Metabolite durch das Exkretionssystem – meistens die Niere – ausgeschieden. Alle genannten Prozesse beeinflussen die Hormonkonzentration und tragen zur Kontrolle des Signals bei.

Im Erfolgsorgan empfangen Zielzellen das hormonale Signal. Sie besitzen Hormonrezeptoren, die das Hormon binden. Dadurch wird die Information an die Zelle weitergegeben und eine Antwort ausgelöst. Die Botschaft der Hormone wird nach zwei verschiedenen Prinzipien an die Zielzellen vermittelt. Lipophile Hormone dringen in die Zelle ein und wirken im Zellkern, hydrophile Hormone wirken an der äußeren Zellmembran. Lipophile Hormone, zu denen die Steroidhormone, Thyroxin und die Retinsäure gehören, durchdringen die Zellmembran und binden innerhalb ihrer Zielzellen an einen spezifischen Rezeptor. Der Komplex aus Hormon und Rezeptor beeinflusst dann als Dimer im Zellkern die Transkription bestimmter Gene. Die vermehrte (oder verminderte) Synthese von mRNA führt zu einer veränderten Konzentration von Proteinen, welche die Zellantwort auslösen. Hormone, die sich von Aminosäuren ableiten, sowie alle Peptid- und Proteohormone bilden die Gruppe der hydrophilen Hormone. Sie binden an der Außenseite der Zielzelle an spezifischen Rezeptoren, die in der Zellmembran fixiert sind. Die Bindung des Hormons löst auf der Innenseite der Zellmembran ein Signal aus. Dadurch wird in

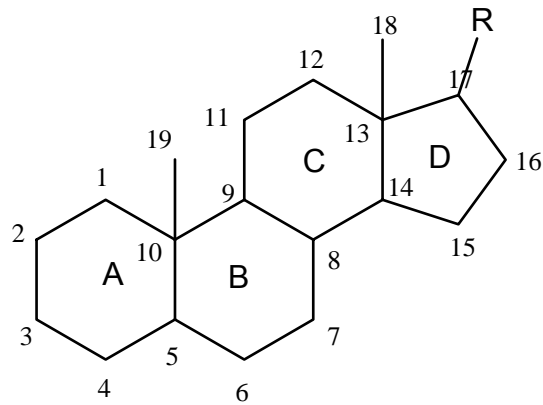
vielen Fällen ein Konzentrationsanstieg eines *second messenger* ausgelöst, der dann die Antwort der Zielzelle auf das Hormon vermittelt.

Die Grenzen zwischen den eigentlichen Hormonen und anderen Signalstoffen, wie den Mediatoren, Neurotransmittern und Wachstumsfaktoren, sind fließend. In vielen Fällen haben diese Signalstoffe die Prinzipien der Biosynthese, des Stoffwechsels und des Wirkungsmechanismus gemeinsam.

Im Gegensatz zu den klassischen Hormonen wirken die Gewebshormone nur in unmittelbarer Nachbarschaft der Drüsenzelle, die sie sezerniert. Sie erreichen ihre Zielzellen nicht über die Blutbahn, sondern durch direkte Diffusion über den Extrazellularraum. Gewebshormone finden sich besonders im Magen-Darm-Trakt, wo sie Verdauungsfunktionen steuern. Als Mediatoren werden Signalsubstanzen bezeichnet, die nicht aus spezialisierten Drüsenzellen stammen, sondern von vielen Zelltypen gebildet werden. Sie üben nach Ausschüttung eine hormonähnliche Wirkung auf ihre nächste Umgebung aus. Histamin und die Prostaglandine sind wichtige Beispiele für Mediatoren. Neurohormone und Neurotransmitter sind Signalsubstanzen, die von Nervenzellen produziert und ausgeschüttet werden.

## 3.2 Steroide

Cholesterin ist die Vorstufe einer Vielfalt von Steroiden, die für metabolische Prozesse von großer Bedeutung sind. Der gesamte Biosyntheseweg beginnt mit der Modifikation der Cholesterin-Seitenkette; dabei entsteht das Gestagen Progesteron. Die weiteren Reaktionen hängen von der Enzymausstattung der jeweiligen Zelle ab. Die Abspaltung der verbliebenen Seitenketten führt zu den Androgenen, eine weitere Aromatisierung von Ring A zu den Östrogenen. Andererseits entstehen durch verschiedene Hydroxylierungen des Progesterons Gluko- oder Mineralokortikoide. In Abbildung 1 ist eine vereinfachte schematische Darstellung des Steroid-Grundskelettes mit den 4 Ringen A, B, C und D zu sehen. Viele Steroide besitzen eine Seitenkette an Position 17, welche eine große Varianz in Kettenlänge und Zusammensetzung zeigt.



**Abbildung 1:** Steroid-Grundgerüst mit IUPAC-Bezeichnung

Steroidhormone werden als Reaktion auf eine Vielzahl neuro-endokriner Aktivitäten synthetisiert. Sie üben beim Menschen einen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum, die Entwicklung der Gewebe und auf die Homöostase aus. Die Nebennieren sezernieren über 30 Steroide, die alle vom Cholesterin abgeleitet sind. Sie lassen sich in fünf Hauptklassen einteilen: Gestagene, Kortikoide (Glucokortikoide, Mineralokortikoide), Androgene und Östrogene. Das Gestagen Progesteron bereitet den Uterus für die Aufnahme des befruchteten Eis vor und ist außerdem für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft verantwortlich. Androgene wie Testosteron bewirken die Ausprägung der sekundären männlichen, Estrogene die der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale. Estrogene wirken außerdem am Eireifungszyklus und dem Wachstum der Brust mit. Die wichtigsten Steroidhormone sind mit ihrer Funktion und dem Wirkungsort in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Auflistung der wichtigsten Vertreter der Steroidhormone und deren Wirkungsweise

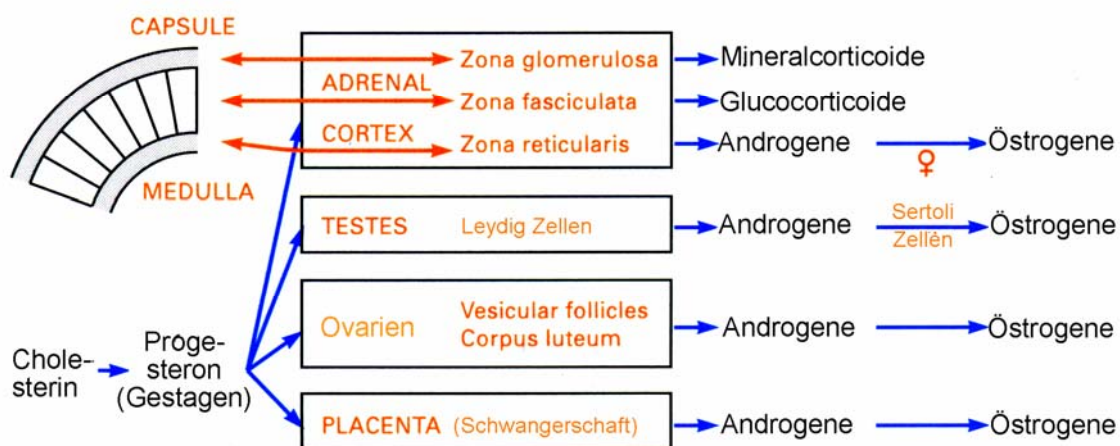
Hormon	Gruppe	Bildungsort	Ziel	Wirkungen
Progesteron	Gestagen	Corpus luteum, Plazenta	Uterus	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bereitet Uterus auf Schwangerschaft vor</li> <li>▪ Aufrechterhaltung der Schwangerschaft</li> <li>▪ Entwicklung der Brustdrüsen</li> </ul>
Aldosteron	Mineralkorticoide	Nebenniere	Niere	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Induktion der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase</li> <li>▪ Erhöht den Blutdruck</li> </ul>
Estradiol	Östrogene	Ovar, Plazenta	Uterus, Ovar	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kontrolliert den Menstruationszyklus</li> <li>▪ Fördert Proliferation der Uterus-Schleimhaut</li> <li>▪ Ausprägung der weiblichen Geschlechtsmerkmale</li> </ul>
Testosteron	Androgene	Leydigzellen	Vers. Organe	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Entwicklung und Funktion der Gonaden</li> <li>▪ Entwicklung der männlichen Geschlechtsmerkmale</li> </ul>
Hydrocortison	Glucokorticoide	Nebennierenrinde	Vers. Organe	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Steuert Protein- und Kohlehydratstoffwechsel</li> <li>▪ Steigert Blut-Glucose Spiegel</li> <li>▪ Entzündungshemmend</li> </ul>

### 3.2.1 Einteilung der Steroidhormone

Kortikoidsteroiden sind eine Klasse von Hormonen, die in der Nebennierenrinde der Vertebraten gebildet werden. Sie umfassen die Glukokortikoide, die lebenswichtige Regulatoren des Glukosemetabolismus sind, und die Mineralokortikoide, die den Mineralmetabolismus steuern.

Glukokortikoide können über vielfältige Wege Glucose, den Hauptenergieträger des Körpers, rasch bereitstellen und somit die Glukoneogenese der Leber stimulieren. Unter der Einwirkung hoher Hydrocortisonspiegel werden Aminosäuren in Glucose umgewandelt. Die Aminosäuren entstehen in erster Linie durch den Abbau von Proteinen aus dem Muskel (eiweißkatabole Wirkung). Ebenso sind die Glukokortikoide am Fettmetabolismus beteiligt. Triglyzeride werden gespalten, wodurch sich die Fettsäurespiegel im Blut erhöhen. Neben den möglichen

Stoffwechsellentgleisungen haben Glukokortikoide auch eine entzündungshemmende Wirkung. Glukokortikoide hemmen auch die zelluläre und humorale Immunabwehr. Diese Wirkung wird therapeutisch ausgenutzt, um allergische Reaktionen des Körpers und immunologische Abwehrreaktionen zu reduzieren.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Syntheseweges und der Bildungsorte verschiedener Steroidhormone (Abbildung aus [1])

Einer der wichtigsten Vertreter der Mineralkorticoide ist das Aldosteron. Mineralkortikoide sind für die erhöhte Resorption von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$  in der Niere verantwortlich, was in der Erhöhung des Blutvolumens und des Blutdrucks zum Ausdruck kommt. Abbildung 2 zeigt, in welchen Organen diese Hormone hauptsächlich synthetisiert werden.

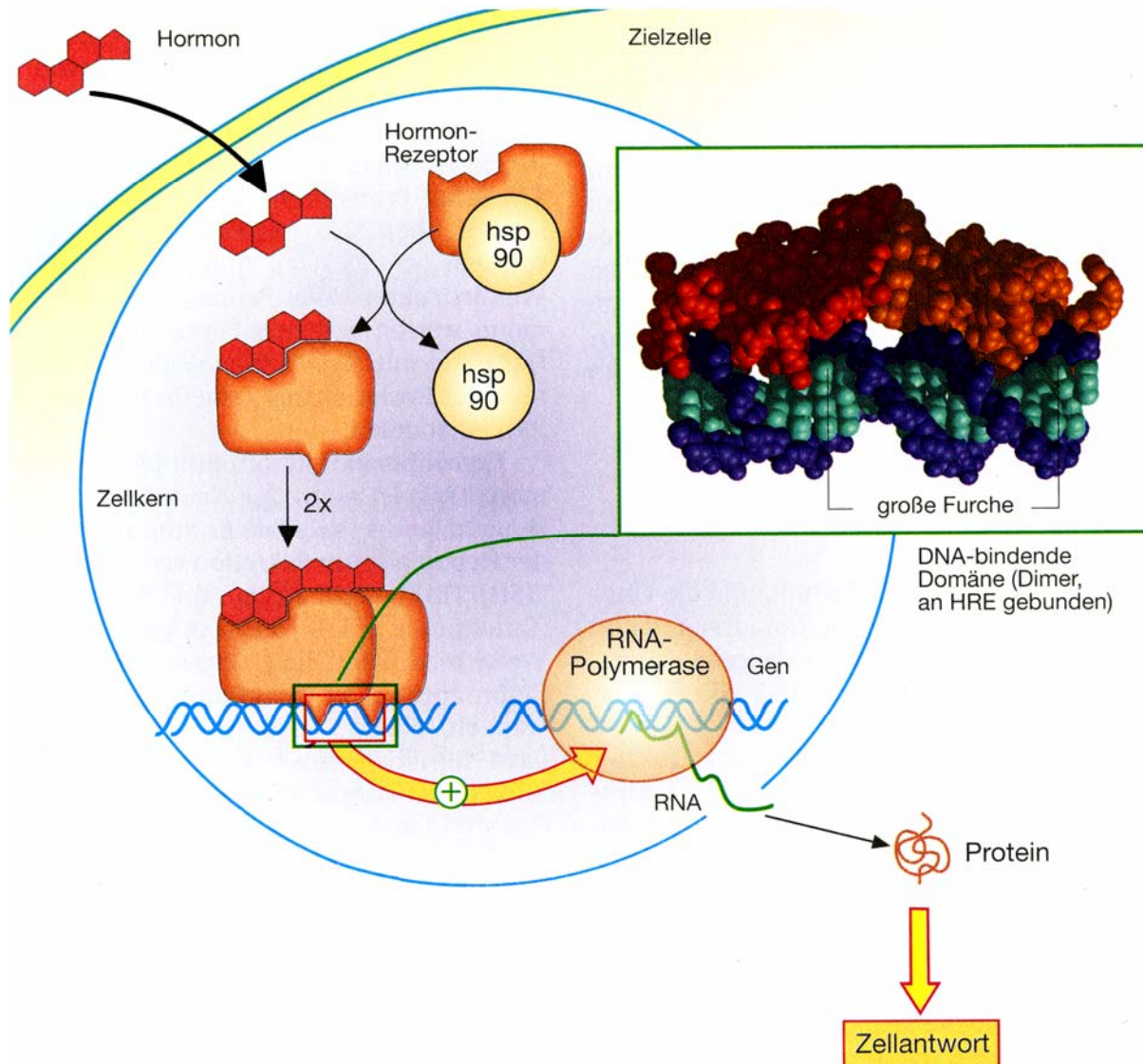
### 3.2.2 Wirkungsmechanismus von lipophilen Hormonen (Steroide)

Zu den lipophilen Signalstoffen gehören vor allem die Steroidhormone, das Thyroxin und das Retinoat (Anion der Retinsäure). Der wichtigste Wirkort dieser Stoffe liegt im Zellkern der Zielzellen. Dort kontrollieren sie das Muster der Gen-Expression wie in Abbildung 3 dargestellt. Für den Transport im Blut sind die lipophilen Steroidhormone an Plasma-Trägerproteine (Albumin, Orsomucoid, Transcortin, Sexualhormon-Bindendes Globulin und  $\alpha_1$ -Fetoprotein) gebunden. Diese Komplexe sind selbst

physiologisch inaktiv und setzen an der Oberfläche der Zielzelle die Hormone zur Diffusion in die Zelle frei.

Hormonrezeptoren sind seltene Proteine. Sie kommen in geringer Zahl ausschließlich in den Zielzellen vor und zeigen eine hohe Affinität ( $K_d = 10^{-8}$ - $10^{-10}$  M) und hohe Spezifität für ihren Hormonliganden. Die Bindung des Hormons an den Rezeptor führt zu einer allosterischen Veränderung des Rezeptor-Proteins, das als Komplex mit anderen Proteinen vorliegt. Dadurch dissoziiert ein Protein aus der Familie der Hitzeschock-Proteine (hsp90) ab; der Rezeptor kann dimerisieren, und seine Affinität für spezifische Nucleotid-Sequenzen der DNA nimmt zu.

Entscheidend für die Hormonwirkung ist die Bindung des Hormonrezeptor-Dimers an den DNA-Doppelstrang. Der Komplex bindet an Nucleotid-Sequenzen, die als *hormone response elements* (HRE) bezeichnet werden. Das sind kurze, punktsymmetrische DNA-Segmente, die im Allgemeinen als Verstärker(*Enhancer*)-Elemente die Transkription kontrollieren. In Abbildung 3 wird das HRE für Glucocorticoide gezeigt. Die HRE der anderen Hormone weisen Sequenzunterschiede auf, die für die Spezifität der Hormonwirkung wichtig sind. Jeder Hormonrezeptor erkennt nur sein HRE und steuert die Transkription der Gene, die von diesem kontrolliert werden. Die Bindung eines Hormonrezeptor-Dimers an das HRE führt meist zu einer Steigerung, selten zu einer Verringerung der Transkription benachbarter Gene. So führt die Hormonwirkung in einem Zeitraum von Stunden zu einem veränderten Spiegel an mRNA für Schlüsselproteine des Zellgeschehens. Bei Säugern erfolgt die Aktivierung der meisten Steroidhormone über eine dreistufige Kaskade, die vom Hypothalamus ausgeht. Ein externer Reiz stimuliert den Hypothalamus zur Freisetzung von Releasing-Hormonen, die zu einer spezifischen Aktivierung des Hypophysenvorderlappens (Adenohypophyse) führt. Dort kommt es zur Freisetzung trophischer Hormone, die im Blut zu den peripheren Geweben (Nebennieren, Hoden, Ovarien) transportiert werden und die Sekretion der Steroidhormone auslösen. Die Releasing- und trophischen gehören zur Klasse der Peptid-Hormone. Diese wirken auf Rezeptoren der Zelloberfläche, die die Signale intrazellulär über verschiedene Wege zu ihren Zielorten weiterleiten und z.B. im Zellkern eine Genexpression auslösen, was zur Enzymsynthese führt oder, die NADPH-Produktion erhöhen, so dass die Hydroxylierungsreaktionen zunehmen.



**Abbildung 3:** Wirkungsmechanismus von Steroidhormonen in der Zielzelle (Abbildung entnommen aus [2])

Im Gegensatz zu diesem *second messenger*-System wirken die Steroidhormone, die bei dieser Kaskade gebildet werden, direkt. Da in unterschiedlichen Organen verschiedene Gene aktiviert werden, kann dasselbe Hormon die Synthese verschiedener Proteine kontrollieren. Die sezernierten Hormone haben einen Rückkopplungseffekt auf Hypothalamus und Hypophyse. Die Reaktionskaskade wird also nur kurzzeitig aktiviert. Darüber hinaus zeigen die Steroidhormone nur kurze Halbwertszeiten (10 - 90 min). Beide Effekte begrenzen den Konzentrationsanstieg von Steroidhormonen und ermöglichen es dem System, schnell auf sich verändernde Situationen zu reagieren. Eine Ausnahme ist Aldosteron, das durch das Renin-Angiotensin-System reguliert wird, welches vom Blutvolumen und von der Elektrolytkonzentration im Plasma abhängt.



### 3.2.3 Biosynthese der Corticosteroide

Die Biosynthese der Corticoide beginnt beim Cholesterol. Sein Kohlenstoff-Skelett besteht aus 27 C-Atomen und bildet 4 Ringe, von denen der vierte eine längere Seitenkette trägt. Sowohl die Benennung der Ringe als auch die Nummerierung der Kohlenstoffe des Cholesterols sind genau festgelegt (siehe Abbildung 1)

Das zur Biosynthese der Corticosteroide benötigte Cholesterol entstammt verschiedenen Quellen. Es wird entweder mit Lipoproteinen des Typs LDL in die hormonsynthetisierenden Drüsenzellen aufgenommen oder von diesen aus Acetyl-CoA selbst synthetisiert. Überschüssiges Cholesterol wird in Lipidtröpfchen als Fettsäure-Ester gespeichert. Durch Hydrolyse kann das Cholesterol aus dieser Reserve schnell wieder mobilisiert werden.

Die Biosynthese der Corticosteroide wird durch spezifische Enzymsysteme katalysiert. Die Reaktionen lassen sich in folgende Reaktionstypen einteilen:

- Hydroxylierung
- Dehydrierung
- Isomerisierung
- Hydrierung
- Hydrolyse
- Aromatisierung

Wie in Abbildung 4 dargestellt, führt die Aufeinanderfolge mehrerer Enzymreaktionen vom Cholesterol zu den einzelnen Corticoiden.

Die  $17\alpha$ -Hydroxysteroidoide 11-Desoxycortisol, Hydrocortison und Cortison werden in der *Zona fasciculata* durch Hydroxylierung an den Positionen  $17\alpha$ , 21 bzw.  $11\beta$  aus Pregnenolon synthetisiert. Das ist vor allem beim Menschen und beim Kaninchen der Fall, bei Ratten werden diese Verbindungen hingegen aus Progesteron gebildet.

Progesteron ist auch die Vorstufe der 17-Desoxycorticoide Cortexon, Corticosteron, 11-Dehydrocorticosteron und Aldosteron, die in der Zona glomerulosa durch Hydroxylierung an den Positionen 21,  $11\beta$  bzw. 18 entstehen. Oleyl-Corticosteron ist die aktive Form dieses Hormons

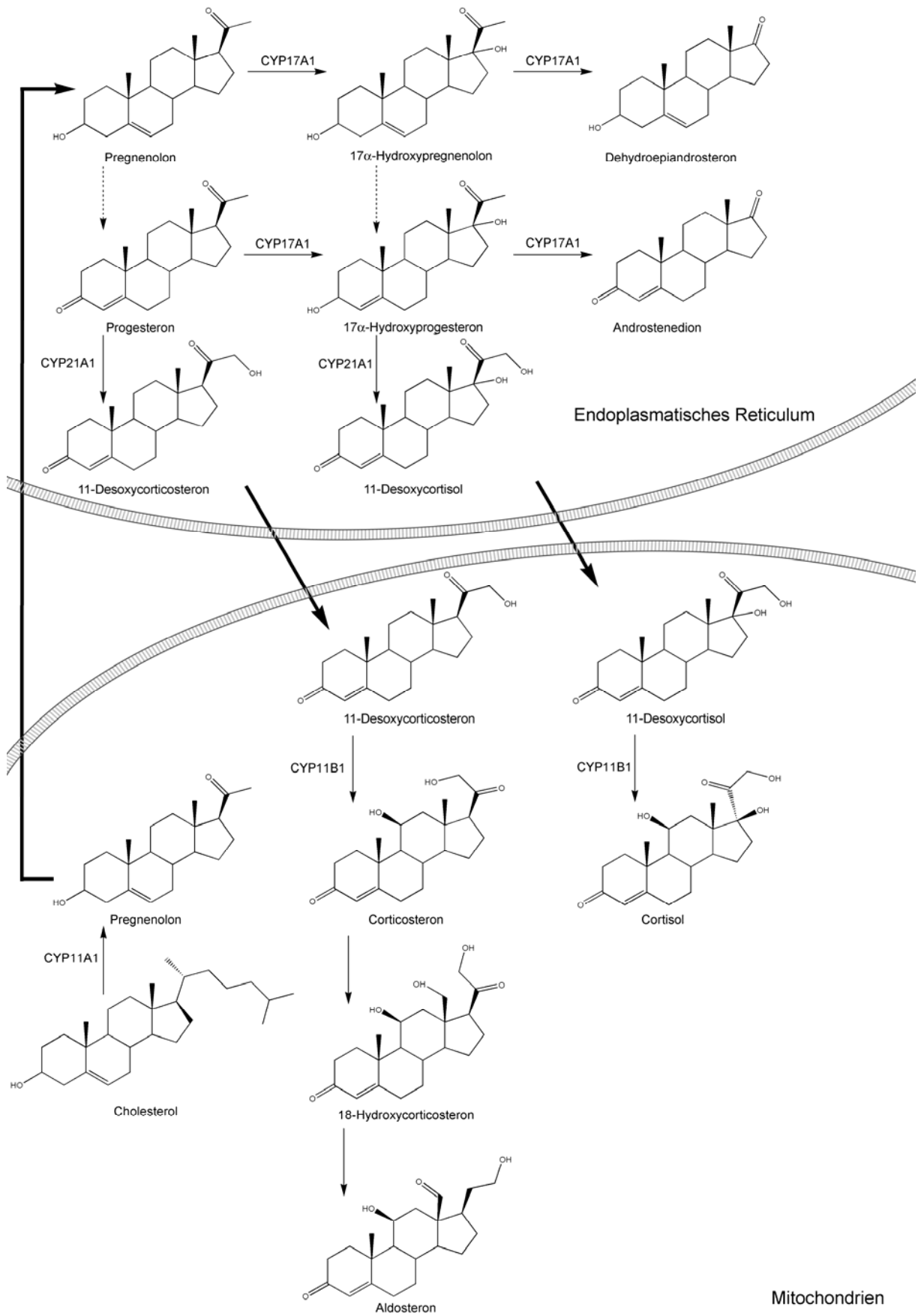


Abbildung 4: Darstellung der Biosynthese der Corticoide

Obwohl in beiden Reaktionswegen die Hydroxylierungen an denselben Positionen (11 und 21) erfolgen, unterscheiden sich die Enzyme offensichtlich. Bei einigen Spezies gibt es aufgrund einer nur mäßigen Spezifität der beteiligten Enzyme keine genaue Reihenfolge der Reaktionen. Ein auffälliges Merkmal ist der wiederholte Wechsel zwischen den Kompartimenten, in denen die Reaktionen erfolgen (Abbildung 4). Cholesterin aus dem Cytosol wird in den Mitochondrien zu Pregnenolon umgewandelt, im glatten endoplasmatischen Reticulum isomerisiert und weiter hydroxyliert, während die abschließenden Schritte der Hydroxylierung und der Dehydrogenierung wieder in den Mitochondrien stattfinden. Die Sekretion in die Lymphe erfordert einen weiteren Durchtritt durch das Cytosol. Diese Trennung der Syntheseorte ermöglicht wahrscheinlich eine genaue Abstimmung der Regulation.

Störungen des Corticoidmetabolismus verursachen eine Reihe schwerer Krankheiten. Defekte Hydroxylasen führen häufig zu einer Verschiebung des Corticoid-Hormonmusters. In Tabelle 2 sind eine Reihe von Krankheiten bei gestörtem Corticoid-Stoffwechsel aufgeführt.

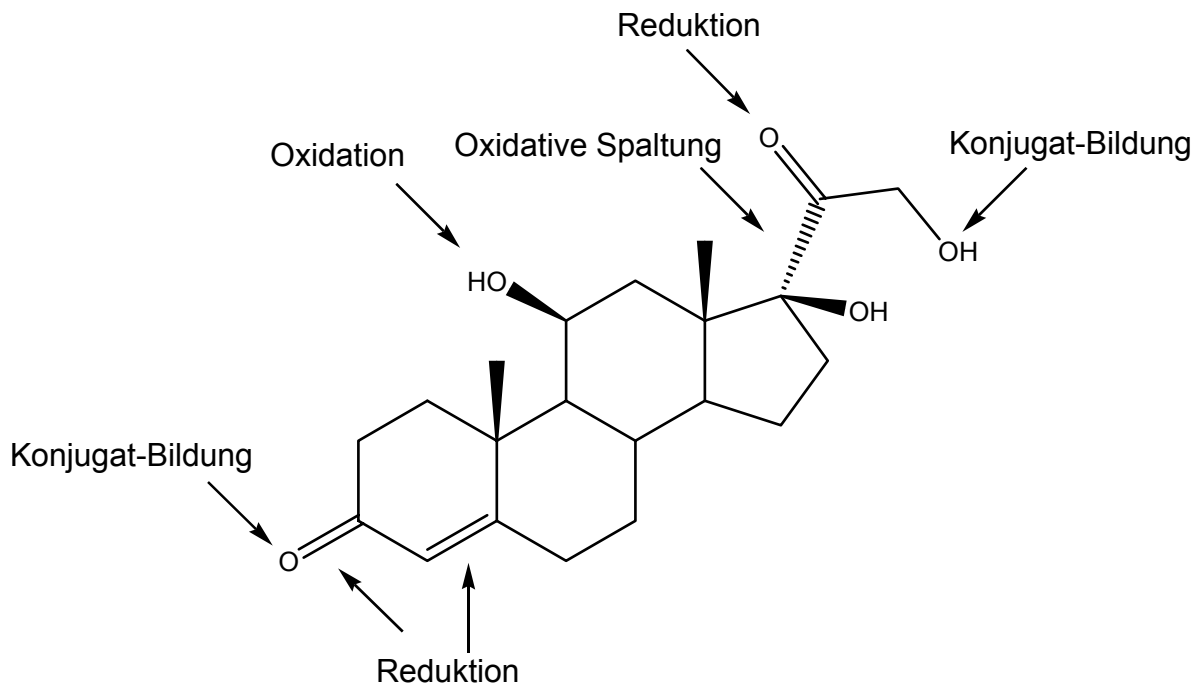
### **3.2.4 Abbau von Corticosteroiden**

Bei Tieren erfolgt die Desaktivierung und Modifikation der Corticosteroide für die Ausscheidung in der Leber in geringen Maß auch in der Niere und Lunge. Dort werden die Steroide reduziert oder hydroxyliert und dann in Konjugate überführt. Die Reduktionsreaktionen greifen an Oxogruppen und der Doppelbindung in Ring A an. Die Bildung der Konjugate in der Leber besteht aus der Veresterung mit Schwefelsäure oder der Glycosylierung mit Glucuronsäure und führt zu Produkten, die gut wasserlöslich sind. Die wichtigsten Reaktionen, die die Löslichkeit in der wässrigen Phase erhöhen, sind die Reduktion der 3-Oxo und der 3-Hydroxylgruppe und die Hydrierung der Doppelbindung in Ring A. Zudem werden weitere Hydroxylgruppen durch Cytochrom P450-abhängige Enzyme eingeführt. Bei C21-Steroiden erfolgt ein oxidativer Abbau der Seitenkette. Durch die Kombination mehrerer Inaktivierungsreaktionen entstehen viele verschiedene Steroidmetabolite, die ihre Hormonaktivität weitgehend verloren haben.

Tabelle 2: Liste wichtiger und bekannter Defekte in der Steroid-Biosynthese und deren Auswirkung (aus [1])

Krankheit	Organ	Ursache	Stoffwechseleffekte	Klinisches Bild
Cushing-Syndrom	Hypothalamus Hypophyse, Nebennieren	Überproduktion von CRH und ACTH, Überproduktion von Hydrocortison	Hydrocortison ↑, ACTH ↑ (nicht durch Hydrocortison inhibierbar) Hydrocortison ↑ (ohne Erhöhung von ACTH)	Steroid Diabetes, Muskelatrophie, Knochenabbau, verminderte Antikörperbildung
Addison-Krankheit	Nebennieren	Chronische Insuffizienz der Nebennierenrinde	Hydrocortison ↓ (trotz erhöhtem ACTH) Na <sup>+</sup> ↓, K <sup>+</sup> ↑	Wasserverlust, Myasthenie, Hypoglycämie, Blutdruck, Genitalatrophie
Waterhouse- Friederichsen- Syndrom	Nebennieren	Akute Insuffizienz der Nebennierenrinde	Hydrocortison ↓↓	Koagulationsnekrose nach Meningokokken- Sepsis
Angeborene Nebennieren- Hyperplasie	Nebennieren	Defekte 21- Hydroxylase	Plasma- Hydrocortison ↓, Androgene ↑	Adrogenital- Syndrom, Virilisierung, Salzverlust- Syndrom
Conn-Syndrom	Nebennieren	Überproduktion von Aldosteron	Aldosteron ↑, Na <sup>+</sup> ↑, K <sup>+</sup> ↓	Erhöhte Kaliumexkretion, Alkalose, Ödem
Sekundärer Aldosteronismus	Nebennieren	Arteriosklerose, Hypertonie, Alkalose	Renin ↑, verursacht Aldosteron ↑	siehe Conn- Syndrom
Hypoaldosteronismus	-	18-Hydroxylase Mangel	Na <sup>+</sup> ↓, K <sup>+</sup> ↑	Salzverlust

Es ist interessant, dass Säugetiere nicht zu einem Abbau des Steroid-Grundgerüst in der Lage sind. Schließlich werden die Steroide mit dem Urin, zum Teil auch mit der Galle, ausgeschieden. Steroide im Urin können zur Untersuchung des Hormonstoffwechsels herangezogen werden. Die verschiedenen Abbau-Reaktionen sind in Abbildung 5 am Beispiel von Hydrocortison dargestellt.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Abbau-Reaktionen von Corticosteroiden

### 3.2.5 Geschichte der Entdeckung von Cortison

Cortison und seine Derivate gehören zweifelsohne zu den ganz "großen" Medikamenten der Pharmakotherapie. Vor fünfzig Jahren entdeckte eine Forschergruppe an der Mayo-Klinik die klinischen Grundlagen dieser "Wunderdroge" des letzten Jahrhunderts. Die antirheumatische Wirkung des Cortisons wurde ab April des Jahres 1949 publik gemacht; die hauptsächlich beteiligten Forscher erhielten bereits 1951 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie. Die ungewöhnlich rapide Entwicklung von der Beobachtung zum Breitereinsatz als marktgängiges Medikament kennt in der Geschichte nur eine einzige Parallele: die Entdeckung der Insulinwirkung und die Anwendung des Hormons bei Diabetes mellitus in den Jahren 1921 bis 1923. Zunächst aber war ein griffiger, allgemein akzeptabler Name für die Substanz zu finden. Chemisch handelte es sich um das 17-Hydroxy-11-dehydro-

corticosteron, eine Abwandlung des natürlichen Nebennierenrindenhormons, das während der Forschungsarbeiten unter dem Namen "*compound E*" figuriert hatte – eine zu nüchterne Bezeichnung für ein potenziell so vielfältig wirksames Medikament. Außerdem hatte es bereits Verwechslungen mit Vitamin E gegeben, was Rheumakranke zu vermehrtem Kauf dieses Vitamins veranlasst hatte. Nach einem Vortrag der Forschergruppe auf dem internationalen Kongress für Rheumakrankheiten wurde der Begriff „Cortison“ vorgeschlagen, der in der medizinischen Fachwelt bald weite Verbreitung fand.

Mit dem Siegeszug des Cortisons endete eine Entwicklung, die sich von den Anfängen der Endokrinologie her nachzeichnen lässt. Diese Vorgeschichte dauerte nahezu ein Jahrhundert. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts setzte ein gewisses Interesse der chemisch-pharmazeutischen Industrie an der sich neu konstituierenden Endokrinologie ein. Seit etwa 1920 fand die Hormon- und speziell die Nebennierenforschung nicht nur an Universitäten und wissenschaftlichen Instituten, sondern auch an spezialisierten Forschungslaboratorien der Industrie statt. Die Industrie suchte nach Medikamenten, die medizinisch eingesetzt und industriell produziert, einen ökonomischen Gewinn versprachen. Im Jahre 1927 legten verschiedene Labors Nebennierenrindenextrakte vor, so etwa das "Interrenalin", das "S-Katin" und insbesondere das "Kortin". Letzteres wurde von der Arbeitsgruppe um Frank A. Hartmann gewonnen und war weitgehend adrenalinfrei. Es wurde vom Pharmamarkt rasch akzeptiert und bildete bis in die 40er Jahre den Inbegriff für die Wirksubstanz der Nebennierenrinde. An nebennierenlosen Tieren konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass die Injektion des Extraktes deren Leben wesentlich verlängert. Zusätzlich beobachtete man auch Veränderungen im Natrium- und Kaliumhaushalt der Patienten, was erste Hinweise auf die physiologischen Effekte des nach wie vor unbekanntes Nebennierenrindenhormons gab.

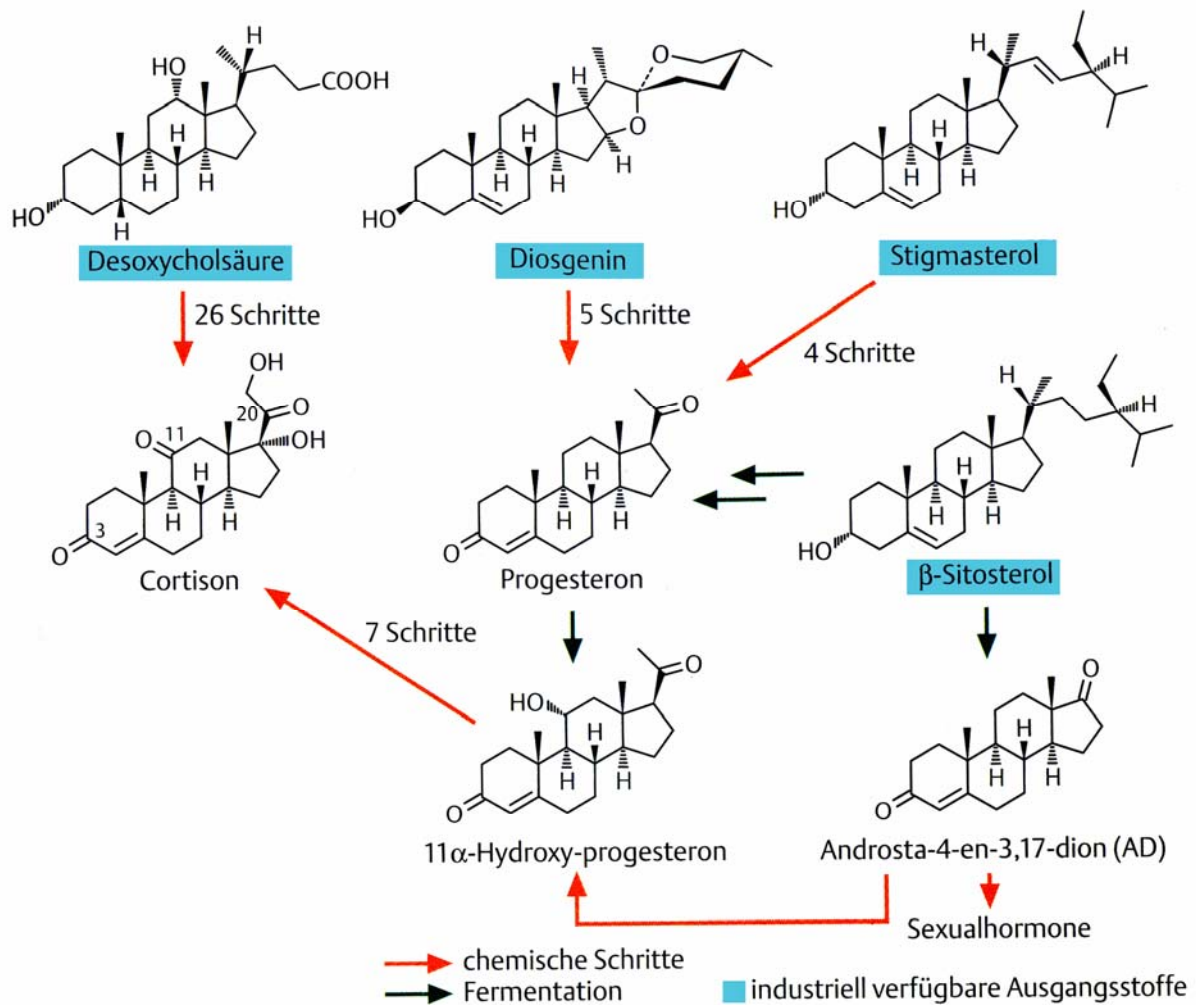
Nun galt es, das wirksame Prinzip der Nebennierenrinde zu isolieren und dessen Struktur aufzuklären. Wesentlicher Promotor dieser Phase war Edward C. Kendall, Leiter des biochemischen Labors an der Mayo-Klinik. Außer der Mayo-Klinik-Gruppe wandten sich noch mehrere Labors in den USA sowie auch der Chemiker Tadeusz Reichstein von der Firma Ciba in Basel dem Problem der Extraktion und Reindarstellung von Nebennierenrindenhormonen zu. Die Arbeitsgruppe um Reichstein konnte 1936 wahrscheinlich machen, dass die gesuchten Hormone

chemisch zur Stoffklasse der Steroide gehören. In rascher Folge extrahierten mehrere Arbeitsgruppen eine Anzahl chemisch ähnlich gebauter Substanzen. Insbesondere wurde die später so genannte Substanz "Cortison" gleich dreimal isoliert und unterschiedlich bezeichnet: als "*compound F*" von Wintersteiner, als "Substanz Fa" durch Reichstein und als "*compound E*" von der Arbeitsgruppe um Kendall. Das spätere Hydrocortison wurde 1937/38 von Reichstein hergestellt. Zahlreiche weitere Substanzen wurden in Tierexperimenten gewonnen, verändert und teilweise halbsynthetisch hergestellt, so dass bis 1946 nicht weniger als 29 verschiedene Steroide aus Nebennierenrindenextrakten isoliert und chemisch definiert werden konnten.

Es blieb dem Forscher Hans Selye vorbehalten, eine prägnante Unterteilung der Nebennierenrindenhormone in "Glucocorticoesteroid" und "Mineralocorticoesteroid" vorzunehmen, also in Hormone, die primär auf den Kohlenhydratstoffwechsel oder primär auf den Wasser- und Mineralhaushalt einwirken. Das mit Abstand wichtigste therapeutische Rindenhormon der 40er Jahre war Desoxycorticosteron, das die Phase der inhaltlich schlecht definierten Extraktpräparate ablöste. Durch die breitere Anwendung dieser Mittel wurde auch deutlich, dass es unter Corticoidanwendung zur Hypokaliämie und zu entsprechenden Lähmungssymptomen kommen konnte. Während in den USA das Desoxycorticosteron zumindest für dringliche Fälle ausreichend zur Verfügung stand und die Firma Ciba in der Schweiz ebenfalls ein Desoxycorticosteronacetat-Präparat auf den Markt brachte, waren die in Deutschland hergestellten Präparate vergleichsweise teuer, was ihren Einsatz in der Nachkriegszeit nicht gerade erleichterte. Insgesamt aber ist hervorzuheben, dass für die Ärzte der westlichen Welt die Nebennierenrinden- und Corticosteroidtherapie bereits vor der Entdeckung des Cortisons eine Gewohnheit war.

### **3.2.6 Steroidherstellung – Gestern und Heute**

Zur Herstellung von Cortison und anderen Steroiden wurden zu Beginn hauptsächlich Gallensäure aus Schlachttieren als Ausgangsprodukt verwendet. Aus Desoxycholsäure wurde durch eine aufwendige und unwirtschaftlich chemische Synthese Cortison gewonnen (siehe Abbildung 6).

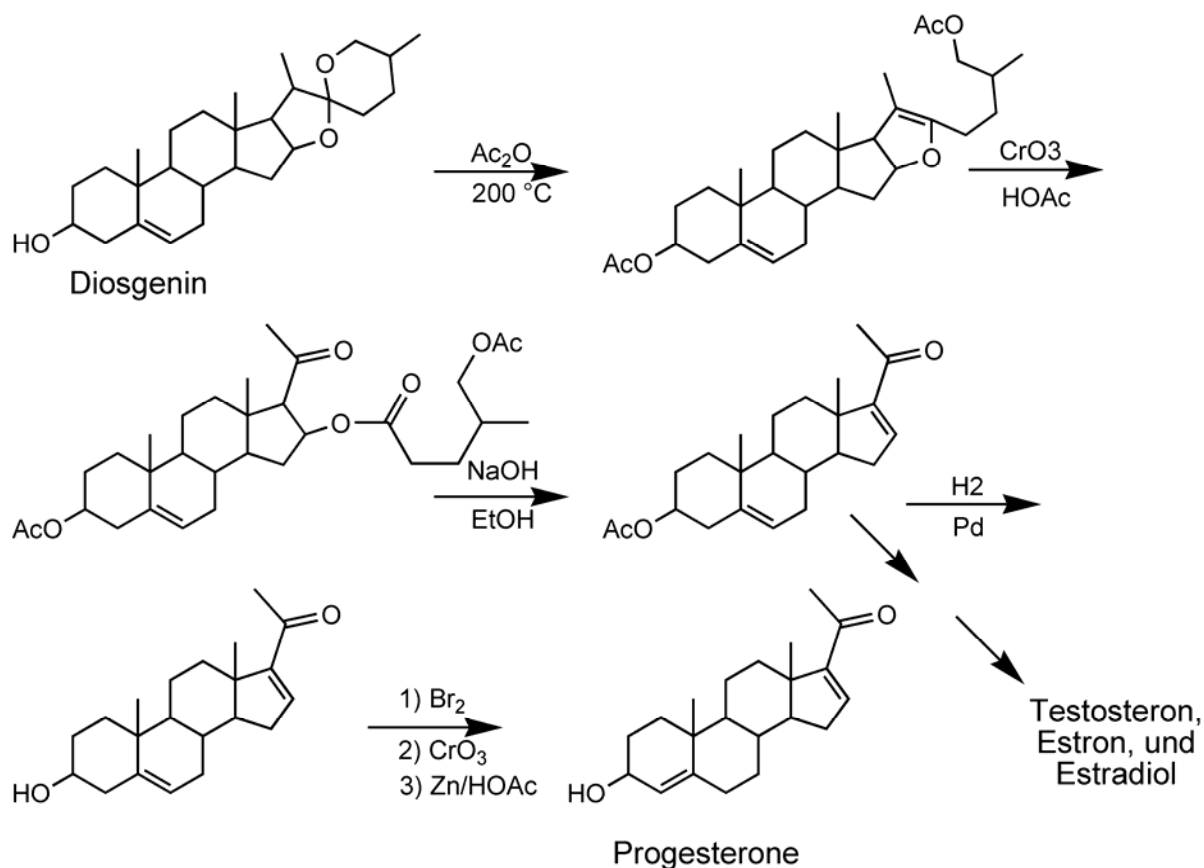


**Abbildung 6:** Synthese von Steroiden aus verschiedenen Ausgangsprodukten (entnommen aus [3])

Als weiteres Ausgangsprodukt für die Herstellung von Steroiden findet Stigmasterol Verwendung. Die Seitenkette von Stigmasterol, welches bei der Herstellung von Vitamin E aus Sojaöl als Nebenprodukt anfällt, wird durch Ozonolyse in Progesteron überführt. Eine wichtige Entdeckung gelang Marker 1941; er konnte aus der Wurzel von Dioscorea (Yams) Diosgenin extrahieren, ein Pflanzensteroid, welches durch chemischen Abbau der Seitenkette und weitere chemische Schritte in Progesteron überführt werden konnte. In Abbildung 7 ist der Syntheseweg von Disogenin zu Progesteron dargestellt.

Um die teils unwirtschaftlichen und komplizierten chemischen Synthesen einzelner Steroide zu umgehen, werden immer häufiger Mikroorganismen verwendet, welche einen kontrollierten Abbau von Seitenketten und/oder regio- und stereospezifische Hydroxylierungen am Steroid-Grundgerüst durchführen können.

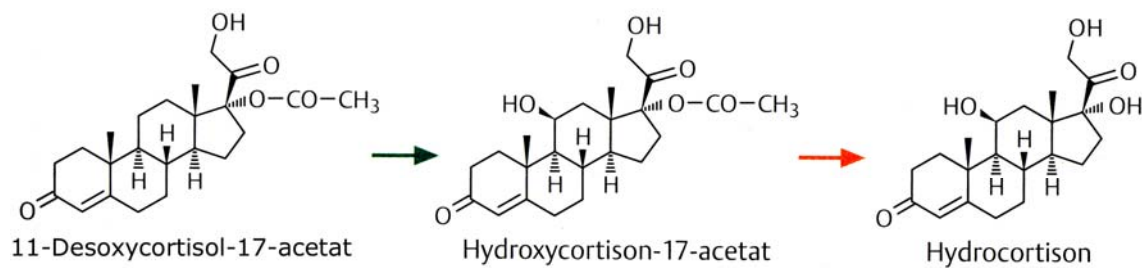




**Abbildung 7:** Syntheseweg von Disogenin zu Progesteron

Als Beispiel hierfür sei die Abspaltung der Seitenkette von  $\beta$ -Sitosterol durch Bakterien der Gattung *Mycobacterium*, *Arthrobacter* und *Corynebacterium* so wie die  $11\beta$ -Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol zu Hydrocortison durch *Curvularia lunata* genannt. Diese nicht regioselektive Hydroxylierung wurde von Zuidweg et al. 1962 ausführlich beschrieben [4,5]. Um die Bildung von Nebenprodukten (Hydroxylierung an Position 14 und 7 des Steroid-Grundgerüsts) bei dieser Biotransformation zu verhindern, wurden Acetat-Schutzgruppen eingeführt (siehe Abbildung 8). Durch den Einsatz von *C. lunata*-Klonen konnte die Nebenproduktbildung nahezu eliminiert werden [6]. Trotz umfangreicher Forschung ist es bis heute jedoch nicht gelungen, das für diese Hydroxylierung zuständige P450 aus *C. lunata* zu klonieren. Untersuchungen des Zell-Lysats von *C. lunata* lassen einige Eigenschaften dieses Enzyms erkennen [7].

1981 konnte Hörhold zeigen [8], dass auch *Cochliobolus lunatus*, wie *C. lunata* ein filamentöser Pilz,  $11\beta$ -Hydroxylase-Aktivität besitzt, jedoch im Gegensatz zu *C. lunata* regioselektiv nur in Position 11 eine Hydroxylierung durchführt.



**Abbildung 8:** Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol-17-acetat durch *Curvularia lunata* (aus [3])

Auch bei der Synthese andere Steroide kommen vermehrt Mikroorganismen zu Einsatz. Tabelle 3 zeigt einige der wichtigsten Syntheseschritte, die bei der Herstellung von Steroiden von Mikroorganismen katalysiert werden. Durch die Entwicklung neuer Synthesewege konnten die enormen Preise für Steroide seit Beginn ihrer Entdeckung drastisch reduziert werden. Kostete ein Gramm Cortison 1949 noch 200 \$, waren es zwei Jahre später noch 10 \$ pro Gramm. Durch die Entdeckung des Diosgenin reduzierte sich der Preis von 10 \$ pro Gramm auf 3, 50 \$ pro Gramm Cortison. Auch der Preis von Progesteron sank von 2,00 \$ auf 0,15 \$. Durch die entwickelten Fermentationsverfahren unter Verwendung von *C. lunata* kostet ein Gramm Cortison heute ca. 0,30 \$.

Tabelle 3: Einige kommerziell wichtige Steroid-Biotransformationen

Reaktion	Substrat → Produkt	Mikroorganismus	Hersteller
11 $\alpha$ -Hydroxylierung	Progesteron → 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron	<i>Rhizopus nigricans</i>	The Upjohn Company
11 $\beta$ -Hydroxylierung	RSS → Hydrocortison	<i>Curvularia lunata</i>	Pfizer, Schering
16 $\alpha$ -Hydroxylierung	9 $\alpha$ -Fluorocortisol → 9 $\alpha$ -Fluoro-16 $\alpha$ -hydroxycortisol	<i>Streptomyces roseochromogenus</i>	E.R. Squibb and Sons, Lederle Laboratories
1-Dehydratation	Hydrocortison → Prednisolon Dienediol → Triendiol	<i>Arthrobacter simplex</i> <i>Septomyxa affinis</i>	Schering, The Upjohn Company
1-Dehydratation Seitenkettenabbau D Ring Erweiterung	Progesteron → 1-Dehydrotestololacton	<i>Cylindrocarpon radicola</i>	E.R. Squibb and Sons
Seitenkettenabbau	$\beta$ -Sitosterol → Androstadiendion	<i>Mycobacterium spp.</i>	G.D. Searle and Company

### 3.3 Die Enzymklasse der Cytochrom-P450-Monooxygenase

Cytochrom P450-Enzyme gehören zur Klasse der Monooxygenasen (E.C.1.14.-.-). Sie sind in der Natur weit verbreitet und besitzen Schlüsselfunktionen beim Metabolismus exogener und endogener Verbindungen. Strukturell enthalten alle P450-Enzyme ein Häm-System im katalytischen Zentrum, das als Besonderheit zu anderen Häm-Enzymen ein Cysteinat als fünften Liganden am Porphyrinsystem enthält. Dieser Aufbau ist verantwortlich für die charakteristischen spektralen Eigenschaften von P450-Enzymen, wie beispielsweise ein Absorptionsmaximum bei 450 nm in Kohlenmonoxid-Differenzspektren, das den P450-Systemen ihren Namen gab. Funktionell ist allen P450-Enzymen gemeinsam, dass sie Sauerstoff-Atome auf aktivierte und nicht aktivierte aliphatische oder aromatische X–H Bindungen übertragen (X = –C, –N, –S). Darüber hinaus können P450-Enzyme –C=C–Doppelbindungen epoxidieren. Für diese Oxygenierungsreaktionen benötigen die meisten P450-Systeme Cofaktoren wie NADPH oder NADH als Elektronenquelle. Entsprechend dem Aufbau des Elektronentransfer(Reduktase)-Systems werden die P450-Systeme in vier Klassen unterteilt. Die zumeist mitochondrialen oder bakteriellen P450-Enzyme der Klasse I erhalten ihre Elektronenäquivalente über eine FAD-Reduktase und ein weiteres Fe-S-Protein. Die mikrosomalen P450-Enzyme der Klasse II benötigen eine FAD/FMN-Reduktase zum Elektronentransfer. Klasse III-P450-Enzyme benötigen keine weiteren Reduktionsäquivalente; sie setzen peroxygenierte Substrate um, die den Sauerstoff bereits in gebundener Form enthalten. Das einzige P450-Enzym der Klasse IV (P450<sub>nor</sub> bzw. CYP55A1) erhält seine Elektronen ohne Transfersystem direkt von NADH [9].

#### 3.3.1 Die P450-Superfamilie – eine der größten bekannten Enzymfamilien

Garfinkel [10] und Klingenberg [11] fanden 1958 ein Kohlenmonoxid-bindendes Pigment in Lebermikrosomen von Ratten und Schweinen, welches sich sowohl durch NADPH als auch durch Natriumdithionit reduzieren ließ. Der reduzierte Kohlenmonoxid-Pigmentkomplex zeigte bei 450 nm ein Absorptionsmaximum. Auf Grund dieser Beobachtung erhielten diese Pigmente die Bezeichnung **P450**. Erst 1964 konnten Omura und Sato [12] zeigen, dass es sich bei diesem Kohlenmonoxid-bindenden Pigment um ein Protein handelt, welches ein Häm-System im

katalytischen Zentrum trägt. Das Absorptionsmaximum bei 450 nm, welches diesen Proteinen ihren Namen gab, beruht auf der Wechselwirkung eines Thiolat-Anions (Cystein), welches als fünfter Ligand an das Porphyrinsystem bindet.

Die P450-Superfamilie ist mit etwas über 3000 bekannten Gensequenzen eine der größten und ältesten heute bekannten Genfamilien. Sie entwickelte sich vermutlich aus einem ca. 3,5 Milliarden Jahre alten Urgen [13]. Ihre ursprüngliche Funktion in thermophilen [14], anaeroben und autotrophen Prokaryonten könnte in der Entgiftung von atmosphärischem Sauerstoff bestanden haben, der durch das aufkommende Photosystem II in frühen Cyanobakterien allmählich gebildet wurde und eine Anpassung an aerobe Umweltbedingungen erforderte [15]. In Adaption an weiter veränderte Umweltbedingungen und durch Entwicklung von komplexen Nahrungsketten bildeten sich in den letzten 400 Millionen Jahren durch Genduplikationen und anschließende divergente Entwicklungen sprunghaft multiple P450-Formen mit einem einzigartig breiten Spektrum von Substratspezifitäten aus [16].

Nach der neuesten publizierten Liste bekannter P450-Gene (siehe Homepage Nelson, <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>) sind zurzeit 3043 P450-Gene in 368 Genfamilien bekannt. Von diesen Genfamilien kommen 18 in allen Säugern vor. Die Zahl bekannter P450-Gene erhöhte sich in jüngster Vergangenheit dramatisch, so fand man bis heute allein im Genomsequenzierungsprojekt der Pflanze *Arabidopsis thaliana* 273 und in der Reispflanze *Oryza sativa* 458 P450-Gensequenzen.

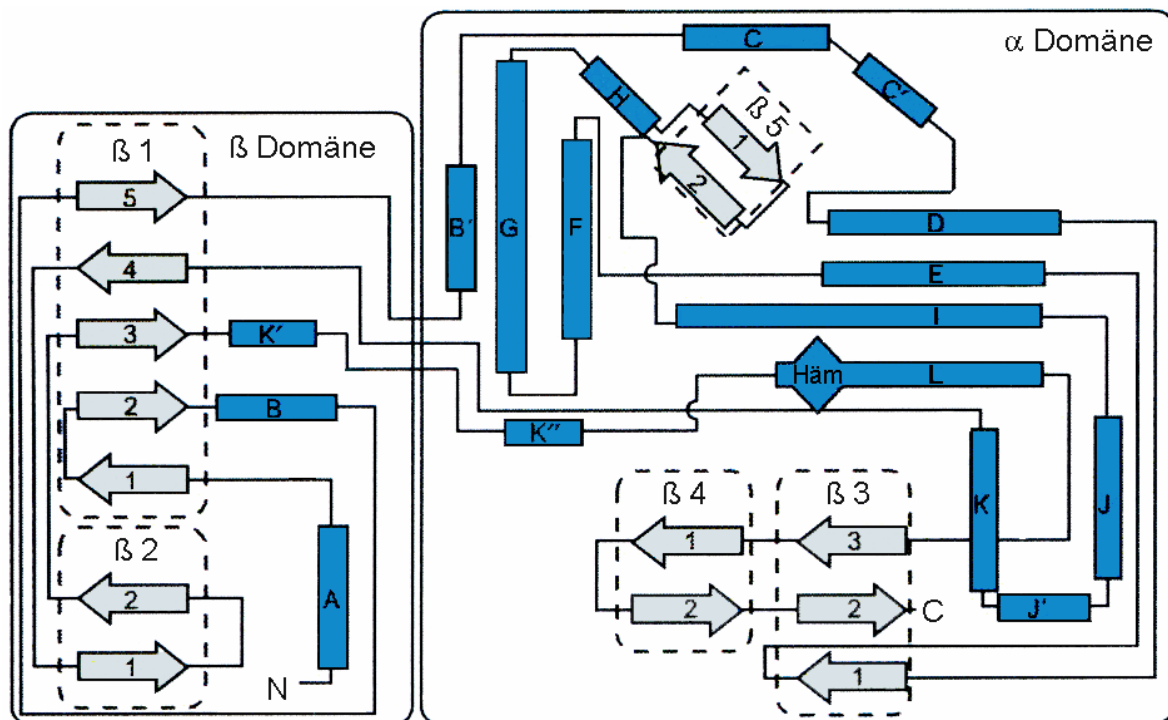
Die von Nebert [17] vorgeschlagene Klassifizierung basiert auf P450-Primärsequenz-Homologien. Hierbei wird die Superfamilie in einzelne Familien und Subfamilien aufgeteilt. Zu einer Genfamilie werden P450-Gene mit einer Protein-Sequenzhomologie von über 40 % und Subfamilien mit einer Protein-Sequenzhomologie von mehr als 55 % zusammengefasst. Die Gene werden mit dem Stamm *CYP* (Ausnahme: Mausgene mit *Cyp*), Proteine und mRNA mit dem Stamm CYP oder P450 bezeichnet. Die Familie oder Subfamilie wird mit nachfolgenden Buchstaben oder Zahlen angegeben, gefolgt von der jeweiligen Nummer des jeweiligen P450, z.B. CYP11B1 für die 11 $\beta$ -Monooxygenase aus Säugetieren, welche die Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol zu Hydrocortison katalysiert.

### 3.3.2 Struktur und Aufbau von P450-Systemen

Bis heute sind ca. 15 Strukturen von P450-Monooxygenase aus verschiedenen Mikroorganismen bekannt. P450<sub>cam</sub> (CYP101) aus *Pseudomonas* [18], eine Campher-5-exo-Hydroxylase, stellt mit 20 Kristallstrukturen das bestuntersuchte System dar. Für P450 BM-3 (CYP102A1) aus *Bacillus megaterium* sind vier Strukturen bekannt [19,20]; in einer dieser Strukturen liegt das Enzym komplexiert mit Palmitoleinsäure vor, [21], in einer weiteren mit *N*-Palmitoylglycin [22]. Drei Kristallstrukturen sind von CYP119 aus *Sulfolobus sulfataricus* [23, 24] bekannt. Zwei Kristallstrukturen existieren von P450 BS $\beta$  (CYP152A1) aus *Bacillus subtilis* [25] und CYP51 aus *Mycobacterium tuberculosis* [26]. Jeweils eine Kristallstruktur liegt für P450<sub>terp</sub> (CYP108) aus *Pseudomonas* sp. [27], P450<sub>eryF</sub> (CYP107A1) aus *Saccharopolyspora erythraea* [28], P450<sub>nor</sub> (CYP55A1) aus *Fusarium oxysporum* [29] CYP154C1 aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) [30] und CYP175A1 aus *Thermus thermophilus* [31] vor. Nach langjährigen Bemühungen gelang es der Arbeitsgruppe um Williams, mit CYP2C5 ein membrangebundenes eukaryotisches P450-Enzym zu kristallisieren, das aus Kaninchen-Leberzellen isoliert wurde [32]. Zwei menschliche P450-Enzyme (CYP2C9 und CYP3A4) wurden von kommerziellen Firmen kristallisiert und in ihrer 3D-Struktur charakterisiert ([www.astex-technology.co.uk](http://www.astex-technology.co.uk)).

Trotz der Unterschiede in der Primärsequenz von P450-Enzymen und obwohl sich die Bindungstaschen der P450-Enzyme grundlegend voneinander unterscheiden müssen, um eine derartige Vielzahl von Substraten unterschiedlicher Größe, Form und elektrostatischen Eigenschaften mit hoher Regio- und Stereoselektivität gezielt umzusetzen, erscheinen etliche Bereiche strukturell hoch konserviert. P450-Enzyme enthalten im Allgemeinen 13  $\alpha$ -Helices und 4 bis 5  $\beta$ -Faltblätter. Das konservierte strukturelle Grundgerüst besteht aus einem Vier-Helix-Bündel (D, E, I, L), den Helices J und K sowie zwei  $\beta$ -Faltblattmotiven ( $\beta$ 1 und  $\beta$ 2) [33]. Helix I enthält ein hochkonserviertes Threonin, das sich direkt über dem Pyrrolring B des aktiven Zentrums befindet. Helix K enthält ein vollständig konserviertes Glu-X-X-Arg-Motiv mit bisher ungeklärter Funktion. Helix L bildet einen Teil der Häm-Bindungsregion. Darüber hinaus liegt auf der proximalen Seite im Motiv FXXGX $\beta$ CXG des Häm-Zentrums (X = beliebige Aminosäure, Y = Arg oder His) ein in allen P450-Systemen konservierter Cysteinrest, der als fünfter Ligand an das Eisenatom im katalytischen Zentrum bindet. Ebenfalls auf der proximalen Seite befindet sich ein kurzer Bereich

mit Zufallsknäuel-Struktur, die so genannte „Meander“-Region; diese bildet ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk und ist an der Bindung des Häms beteiligt [34]. Die F-G-Schleifenregion und die Faltblätter 1 und 2 des  $\beta$ 1-Bündels bilden den hydrophoben Substrateingangskanal, der das Substratprofil von P450-Enzymen entscheidend beeinflusst. Abbildung 9 zeigt sind diese Strukturelemente am Beispiel von P450 CYP102A1.



**Abbildung 9:** Topologie-Diagramm der sekundär Strukturen eines typischen P450 Proteins (CYP102A1) entnommen aus [35]. Die blauen Boxen stellen  $\alpha$ -Helices, die gelben Pfeile  $\beta$ -Faltblätter dar.

Alle Vertreter der P450-Superfamilie besitzen eine Reihe gleichartiger Strukturelemente. Diese unterscheiden sich in einigen nur wenig charakterisierten Bereichen in Anordnung, Länge und Ladung, was aber die molekulare Grundlage für die vielfältigen Substratspezifitäten der P450-Superfamilie bildet. Ausgehend von Kristallstrukturen (mit und ohne Substrat), Sauerstoffmarkierungsexperimenten mit  $^{18}\text{O}$ , EXAFS-Messungen zur Charakterisierung der ersten Koordinationssphäre des Metalls, ESR-, Mössbauer-, und Schwingungsspektren (Unterschiede in den Valenzschwingungsfrequenzen von Disauerstoff, Superoxid, Peroxid) und UV-VIS-Studien wurde der folgende, heute allgemein akzeptierte Katalysezyklus aufgestellt [36,37] (siehe Abbildung 10), und in den letzten Jahren weitgehend gesichert [38,39].

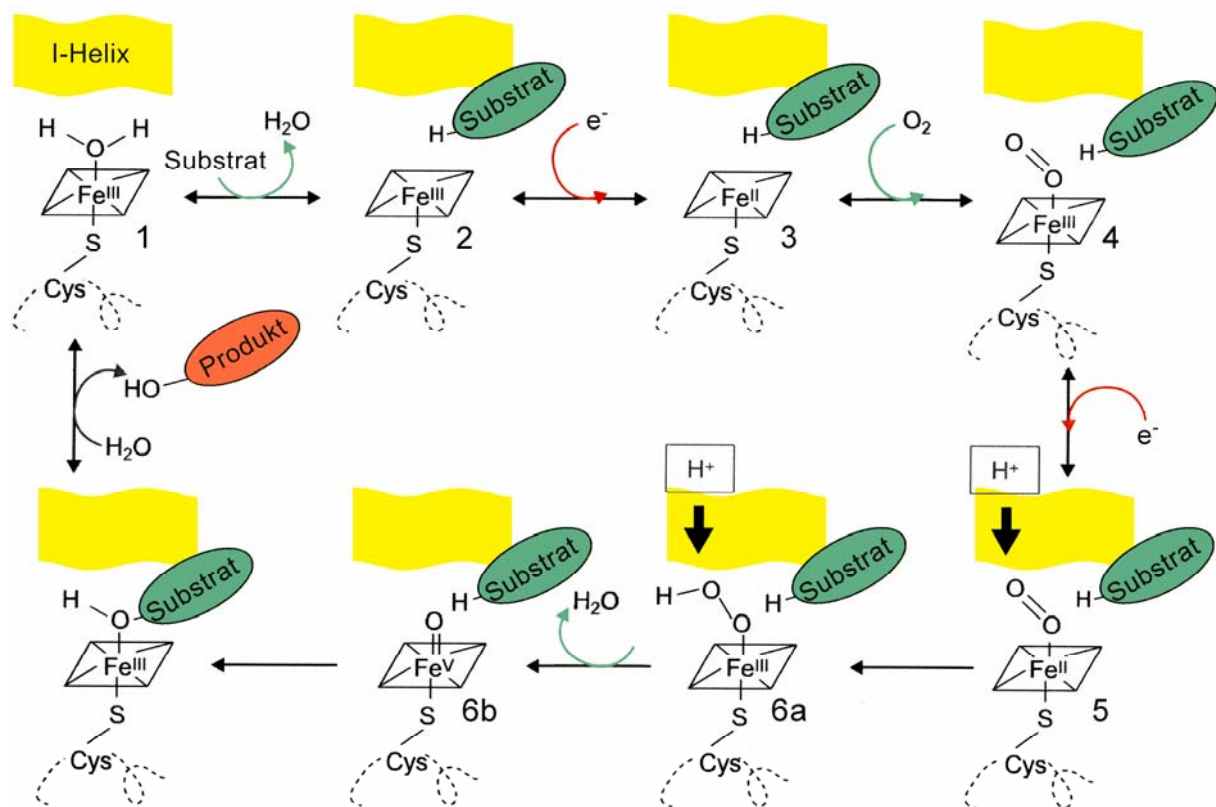


Abbildung 10: Cytochrom P450-Katalysezyklus (aus [35])

Im inaktiven, substratfreien System liegt ein low-spin  $\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $d^5$ ,  $S=1/2$ )-System **1** mit sechsfach koordiniertem Metall vor (Porphyrin, Cysteinat, Wasser). Wasser fungiert hier an der sechsten Koordinationsstelle als Platzhalter. Die Substratbindung bewirkt (durch überwiegend hydrophobe Wechselwirkungen) in der Nähe der sechsten Koordinationsstelle einen Übergang zur high-spin  $\text{Fe}(\text{III})$ -Form **2** mit offener Koordinationsstelle; dabei ist das Eisen-Atom in einer ausgeprägten *out of plane*-Struktur weit vom gewölbten Porphyrinring entfernt. Beim Campher-Addukt zeigen Röntgenstrukturanalysen, dass das Substrat an einen hydrophoben Bereich des Proteins in der Nähe des Häm-Eisenzentrums gebunden wird und das dort vorhandene Wassermolekül verdrängt. Die Substratbindung bewirkt nur eine geringe Umordnung der Atome des Rückgrats und der Seitenketten des Polypeptids, das Redoxpotential wird jedoch von  $-300$  auf  $-173$  mV erhöht, so dass das Enzym leichter reduzierbar ist. Von dieser  $\text{Fe}(\text{III})$ -Stufe kann direkt durch starke Oxidationsmittel wie Periodat oder Wasserstoffperoxid in einem so genannten Peroxid-Shunt der hochoxidierte Komplex **6a** erhalten werden. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt zunächst eine Einelektronenreduktion unter Bildung einer high-spin  $\text{Fe}(\text{II})$ -Stufe **3**. Diese ist aufgrund ihrer vier ungepaarten Elektronen ( $S=2$ ) und ihrer *out of plane*-Konformation ideal für die Bindung von Triplett-Sauerstoff geeignet.

Die nach der Bindung von O<sub>2</sub> entstandene Oxy-low-spin Form **4** konnte isoliert und charakterisiert werden; sie enthält mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Fe(III)-Superoxid mit *in plane*-Konformation. Der nächste Reaktionsschritt ist eine weitere Einelektronenreduktion zu dem sehr labilen Peroxo-Eisen(II)-Komplex **5**, der bei P450<sub>cam</sub> durch Kristallstrukturanalyse direkt charakterisiert werden konnte [38]. Dieser aktivierte Komplex geht durch Aufnahme von Protonen in den reaktiven Eisen-Peroxo-Komplex **6a** und nach Abspaltung von Wasser in den Eisen-Oxo-Komplex **6b** über [40]. Die genaue Struktur dieser kurzlebigen aktivierten Komplexe ist noch nicht eindeutig gesichert; nach neueren Untersuchungen [38,39] liegt ein Gemisch der beiden elektrophilen Formen **6a** und **6b** vor. Die Eisen-Peroxo-Form **6a** kann ein OH<sup>+</sup> auf das Substrat übertragen. Die dabei gebildeten protonierten Alkohole reagieren über kationische Umlagerungen weiter. Der reaktive Komplex **6b** geht durch einen Rebound-Mechanismus in den Ausgangskomplex über und setzt dabei das Produkt frei. Die Geschwindigkeit der radikalischen Sauerstoffübertragung wird auf 10<sup>9</sup> s<sup>-1</sup> geschätzt [37]. Der gebildete Alkohol bleibt vor seiner Abdissoziation noch kurzzeitig über das Sauerstoffatom an das Fe(III)-Porphyrin-System koordiniert und blockiert so die sechste Koordinationsstelle. Dieser Tatsache und den Unterschieden im Redoxpotential ist es zuzuschreiben, dass aus Alkanen keine Diole gebildet werden.

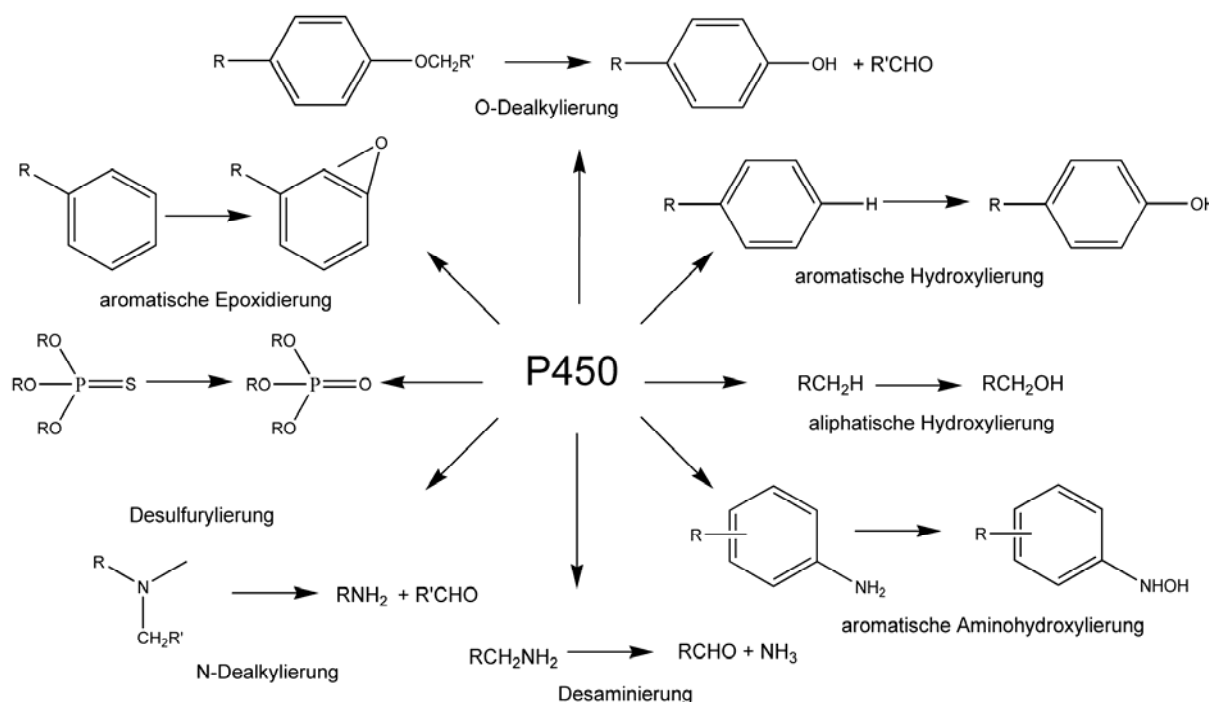
### 3.3.3 Katalysierte Reaktionen durch P450-Monooxygenase

In Organismen dienen Cytochrom P450-Enzyme unter anderem der Ergosterol-Synthese [41], der Biosynthese von Insekten- und Phytohormonen [42,43], der Ausbildung von Fruchtreife, Geruch und Farbe bei Pflanzen [44], der Biosynthese von Gluko- und Mineralkortikoiden, der Aromatisierung von Androgenen zu Östrogenen [45,46], dem Metabolismus von Retinoiden zur Regulation von epitheliale Wachstum und Differenzierung sowie dem Arachidonsäurestoffwechsel zur Bildung von Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen [45,47] und der Bildung vasoaktiver Produkte. Darüber hinaus dienen sie zur Aktivierung und Detoxifizierung von Xenobiotika.

P450-Enzyme gehören zu den so genannten Phase I-Enzymen, die durch Oxygenierung wasserunlösliche oder schwer lösliche Verbindungen zur weiteren Metabolisierung vorbereiten. Hierfür dienen Phase II-Enzyme wie Glutathion-Transferasen,



*N*-Acetyltransferase oder Sulfotransferase, die eine polare Gruppe an die hydroxylierten oder epoxidierten Verbindungen addieren. Dadurch werden diese Metabolite wasserlöslich und somit bioverfügbar [48]. Abbildung 11 zeigt eine Übersicht über alle von P450-Enzymen katalysierten oxidativen Reaktionen. In Tabelle 3 findet sich eine Liste der wichtigsten P450-Familien und der von ihnen katalysierten Reaktionen.



**Abbildung 11:** Zusammenfassung der von P450-Enzymen katalysierten Reaktionen

### 3.3.4 Eukaryotische P450-Monooxygenase

Dem Thema der vorliegenden Arbeit entsprechend werden im Folgenden die Familie der eukaryotischen P450-Enzyme, insbesondere jene Gruppe, die maßgeblich an der Biosynthese von Steroiden in der Nebennierenrinde beteiligt ist, näher beschrieben. Eukaryotische P450-Enzyme können abhängig von ihrem Vorkommen in der Zelle in zwei Gruppen unterteilt werden. Mikrosomale ebenso wie mitochondriale P450 verwenden NADPH als Elektronendonator. Ein mikrosomales P450-System besteht aus zwei an der Membran des Endoplasmatischen Reticulums gebundenen Komponenten, Cytochrom P450 und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase. Mikrosomale P450-Enzyme der Unterfamilien CYP1, CYP2 und CYP3 sind für die Metabolisierung der meisten endogenen Substanzen und Pharmaka in der Leber verantwortlich. Bei

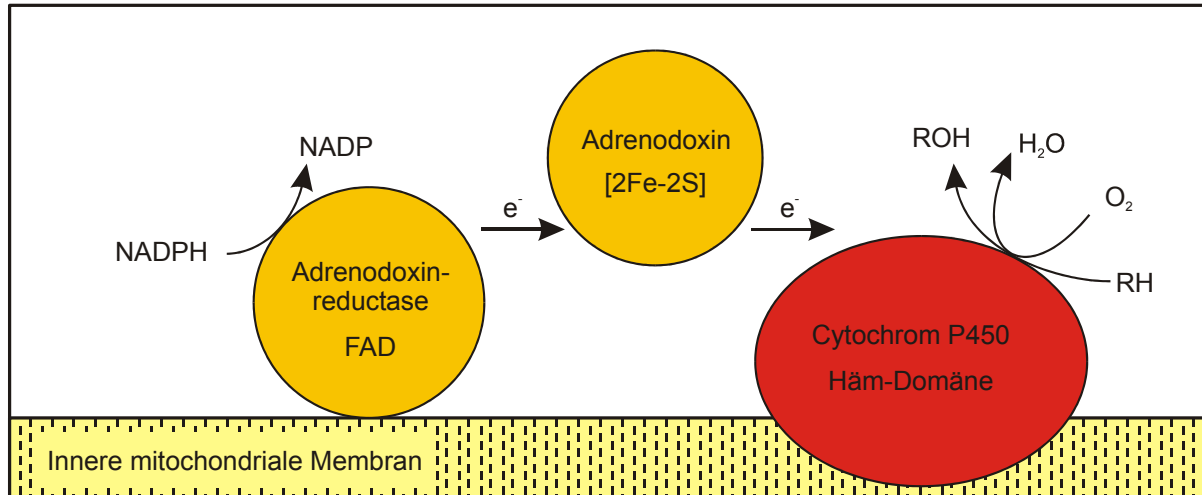
Tabelle 4: Liste wichtiger P450-Familien und der von ihnen katalysierten Reaktionen (aus [49,50])

P450-Familie	Reaktionen von P450-Enzymen
<b>CYP1-3</b>	Metabolisierung xenobiotischer Stoffe; CYP1: PCB, Dioxine, Aflatoxine; CYP2: Pflanzentoxine, Pestizide; CYP3: Cyclosporine, Erythromycin, ferner beteiligt am Steroid-metabolismus
<b>CYP4</b>	CYP4, 52, 102: terminale und / oder subterminale Oxidation von Fettsäuren
<b>CYP52</b>	
<b>CYP102</b>	CYP4: Oxidation von Eicosanoiden (Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen)
<b>CYP11</b>	Biosynthese von Gluko- und Mineralcorticoiden; CYP11: 11- $\beta$ -Hydroxylasen, Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol
<b>CYP17</b>	CYP17: Steroid-17 $\alpha$ -hydroxylase;
<b>CYP21</b>	CYP21: Steroid-21-hydroxylase
<b>CYP19</b>	Umsetzung von Steroiden zu Östrogenen; Aromatase
<b>CYP27</b>	Cholesterin-27-hydroxylase

mitochondrialen P450-Systemen werden die Elektronen wie in Abbildung 12 dargestellt über eine Adrenodoxin-Reduktase (AdR) auf das Eisen-Schwefel-Enzym Adrenodoxin (AdX) und von dort auf die Häm-Domäne des Cytochrom P450 übertragen [51,52].

Neben dem Abbau von exogenen Substanzen und Pharmaka haben eukaryotische P450-Enzyme auch eine wichtige Funktion bei der Biosynthese und dem Katabolismus von Steroiden. Auch bei der Biosynthese von verschiedenen Sterinen wie z.B. Cholesterin, Ergosterin und Phytosterin kommen P450-Enzyme zum Einsatz; entscheidend dabei ist die oxidative Abspaltung der 14 $\alpha$ -Methylgruppe dieser Sterine

durch CYP51. Sterine sind wichtige Bestandteile der Plasmamembran aller eukaryotischen Zellen. Wahrscheinlich stellt CYP51 daher evolutiv gesehen die älteste Form eukaryotischer P450 dar [54].



**Abbildung 12:** Darstellung der Elektronenübertragung bei mitochondrialen P450-Enzymen. Alle Proteine befinden sich hierbei auf der Matrix-Seite der inneren mitochondrialen Membran (entnommen aus [53]).

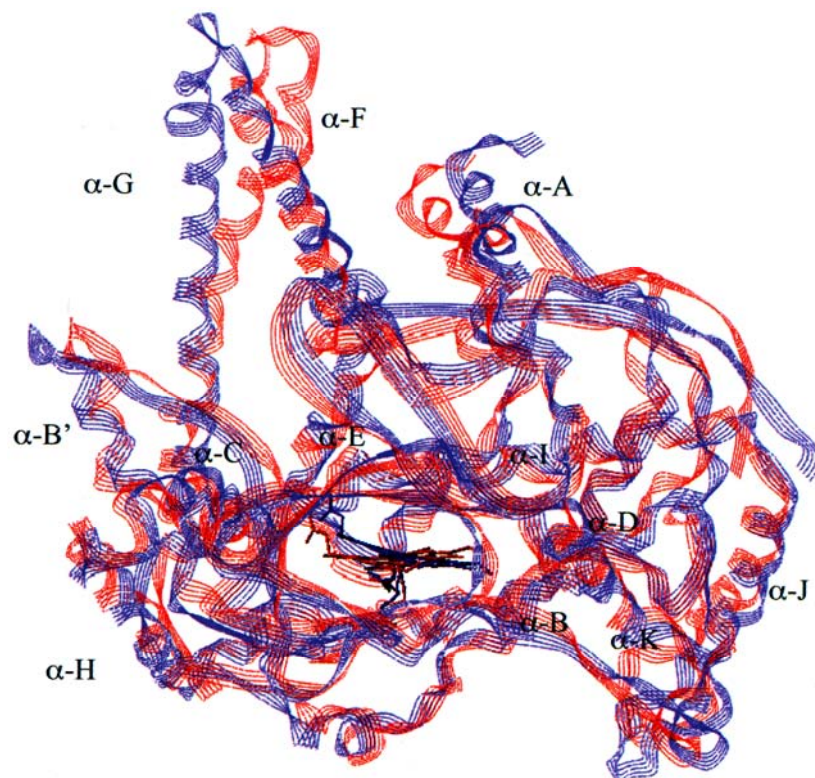
### 3.3.5 CYP11B1 und CYP11B2

CYP11B1 und CYP11B2 kommen hauptsächlich in der Nebennierenrinde vor. Die Hormone der Nebenniere werden stufenweise aus Cholesterin synthetisiert. An dieser Synthese sind fünf verschiedene P450-Enzyme beteiligt (siehe Abbildung 4): CYP11A1 (P450<sub>sc</sub>, seitenkettenspaltendes P450), CYP17 (Steroid-17 $\alpha$ -hydroxylase), CYP21 (Steroid-21-hydroxylase), CYP11B1 (Steroid-11 $\beta$ -hydroxylase) und CYP11B2 (Aldosterone Synthase). Die letzten Schritte in der Synthese von Hydrocortison und Aldosteron werden durch zwei eng verwandte P450-Enzyme katalysiert, CYP11B1 und CYP11B2 [55-57].

Bei der Untersuchung von P450-Enzymen der CYP11B-Familie anderer Spezies zeigte sich, dass in der Nebennierenrinde von Rind [58], Schwein [59] und Frosch [60] die Synthese der Gluco- und Mineralocorticoide von *einem* P450-Enzym katalysiert wird, während im Menschen [61], in der Ratte [61] und der Maus [62] *zwei* Isoenzyme speziell für die Synthese von Gluco- und Mineralocorticoiden verantwortlich sind.

Enzyme mit einer 11 $\beta$ -Hydroxylierungsaktivität wurden auch in verschiedenen Pilzen gefunden [4,5,63], doch konnte bis heute keines der Gene dieser Enzyme kloniert werden. Ihre Beziehung zu der CYP11B Familie bleibt unklar.

Humanes CYP11B1 und CYP11B2 werden als Präproteine mit einer Länge von 503 AS synthetisiert. Beide Präproteine enthalten eine 24 AS lange *N*-terminale mitochondriale Target-Sequenz, die nach der Translokation in die mitochondriale Matrix abgespalten wird. Beide Proteine werden an die innere mitochondriale Membran gebunden; ihre Massen betragen 50 kDa (CYP11B1) bzw. 48,5 kDa (CYP11B2). Während CYP11B1 eine reine 11 $\beta$ -Hydroxylase ist [64], besitzt CYP11B2 neben einer geringeren 11 $\beta$ -Hydroxylase- zusätzlich 18-Hydroxylase- und 18-Oxidase-Aktivität [57,65].



**Abbildung 13:** Überlagerung des Homologie-Modells der humanen CYP11B1 (blau) und CYP11B2 (rot) Monooxygenase (aus [53]).

Um die Beziehung zwischen der Struktur und Funktion der humanen CYP11B-Monooxygenasen zu verstehen, sind Informationen über die 3D-Struktur der Enzyme notwendig. Röntgenstrukturanalysen von membrangebundenen Proteinen sind

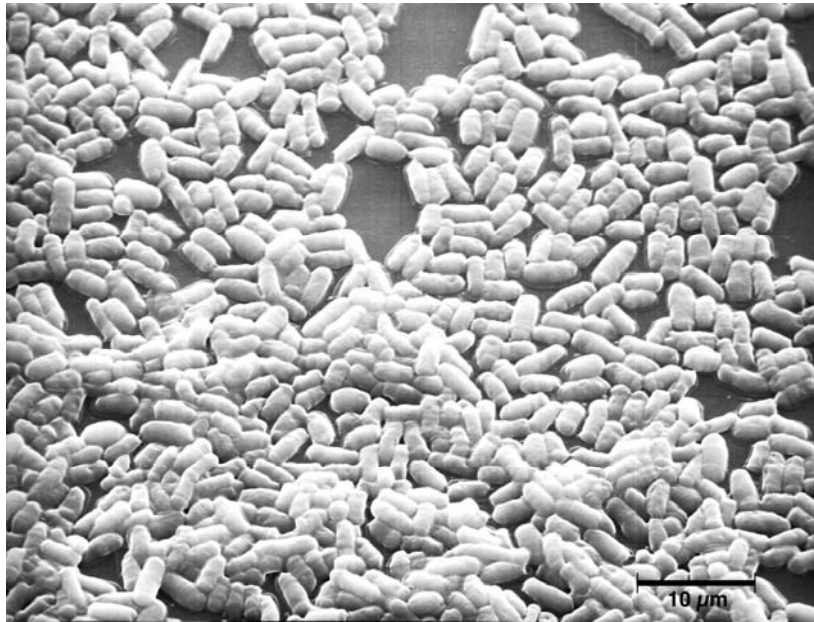
allerdings sehr schwierig. Erst vor einigen Jahren gelang es Williams durch Erhöhung der Löslichkeit von CYP2C5 über eine ortsgerichtete Mutagenese die Struktur des Enzyms aufzulösen [32]. Daneben wurden auch Versuche zu Erstellung von Strukturmodellen humaner P450 auf Basis von *homology modelling* unternommen, das auf bekannten Strukturen bakterieller P450 basiert. Die kürzlich vorgestellten Modelle für CYP11B1 und CYP11B2 [66] zeigen, dass der Hauptunterschied in der Position des Häm-Systems im aktiven Zentrum liegt (siehe Abbildung 13). Das aktive Zentrum von CYP11B2 ist etwas kleiner als das von CYP11B1, da hier das Häm-System in den Substratzugangskanal hineinreicht. Der Unterschied im Winkel der Häm-Position beträgt ca. 20°. Die größere Bindungstasche von CYP11B1 passt mit der Tatsache zusammen, dass das Substrat von CYP11B1 (RSS), bedingt durch die 17 $\alpha$ -Hydroxygruppe, größer ist als jenes von CYP11B2 (11-DOC).

### 3.4 Spaltheife – *Schizosaccharomyces pombe*

Hefen bieten als Modellorganismen für die Molekularbiologie viele Vorteile gegenüber der Zellkultur, da sie eine deutlich geringere Generationszeit besitzen. Die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* ist molekularbiologisch gut charakterisiert; ihr Genom wurde 2002 komplett sequenziert [67].

Die Spaltheife ist zur rekombinanten Expression humaner Steroid-11 $\beta$ -Hydroxylase (CYP11B1) geeignet. Innerhalb des Expressionssystems dieser Klasse I-P450-Enzyme konnte enzymatische Aktivität nachgewiesen werden, ohne dass eine Koexpression mit den eigentlich obligaten Komponenten AdR und Adx durchgeführt wurde. Diese Aktivität basiert auf dem endogenen Elektronentransportprotein 1 (etp1), das anstelle von Adx als Elektronenüberträger zur Aktivierung des rekombinanten Enzyms fungiert [68].

Der Stamm *Schizosaccharomyces pombe* (Spaltheife) wurde erstmals im Jahre 1893 von P. Lindner beschrieben. Er isolierte ihn aus afrikanischem Bier und gab der Hefe den Namen *pombe*, was Bier auf Suaheli bedeutet. Dieses Isolat bestand sowohl aus m<sup>+</sup>- und m<sup>-</sup>-Zellen (m = *mating type*), welche sich paarweise über so genannte Asci verbinden können. Diese Asci enthalten jeweils vier Ascosporen.



**Abbildung 14:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Schizosaccharomyces pombe*. (Dr. Frank Vogel, MDC Berlin)

Über die Jahre isolierten verschiedene Forschungsgruppen Spaltheefe vor allem aus zuckerhaltigen Fermentationsansätzen aus (sub)tropischen Regionen. Dabei wurden auch Isolate gefunden, welche nur einen Zelltyp ( $m^+$  oder  $m^-$ ) enthielten.

*Schizosaccharomyces pombe* gehört zur Familie der Ascomyceten-Pilze, welche sich in die drei Gruppen *Hemiascomycota*, *Archiascomycota* und *Euascomycota* aufteilt (siehe Abbildung 14). Spaltheefe gehört nach Analyse und Vergleich von DNA- und RNA-Sequenzen zur Gruppe der Archiascomycota. Die Linie der *Schizosaccharomyces* trennte sich demnach vor circa 1 Milliarde Jahren von den Ascomyceten, um den Zweig der Archiascomycota zu bilden, und ist damit evolutiv genauso weit von der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wie vom Mensch entfernt.

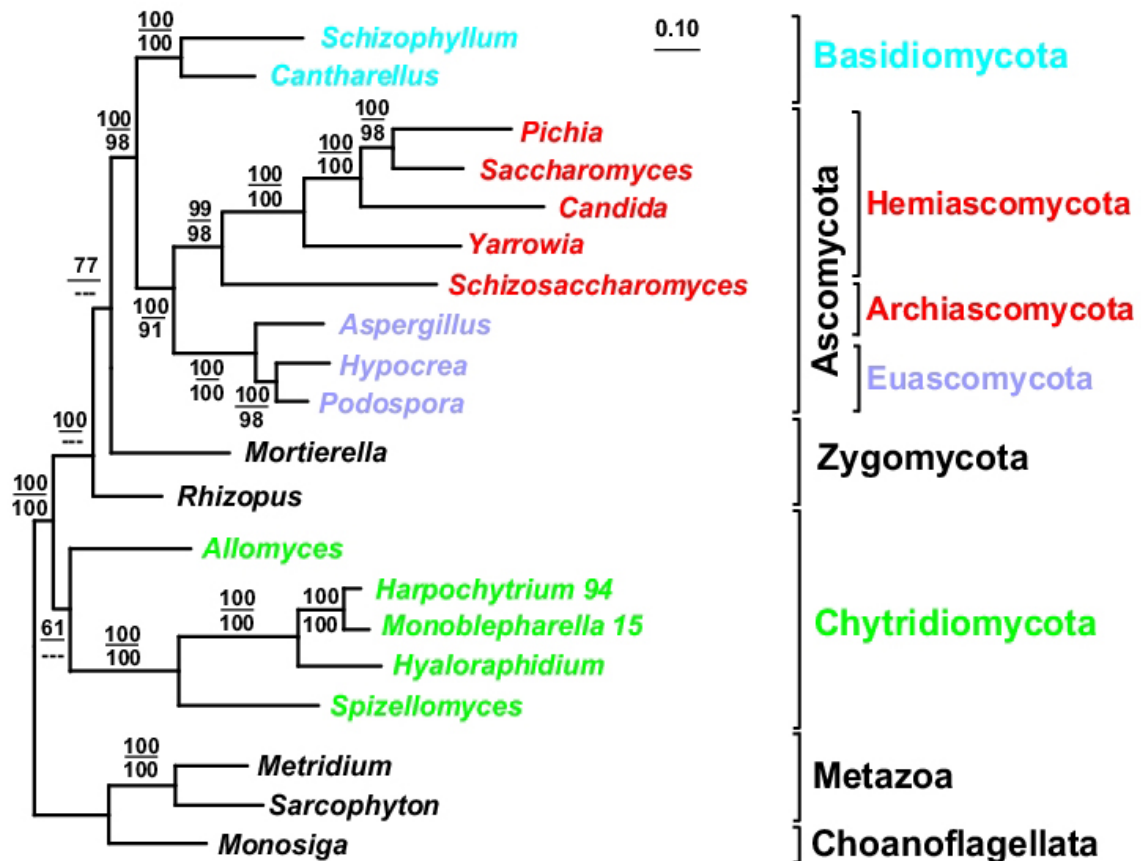


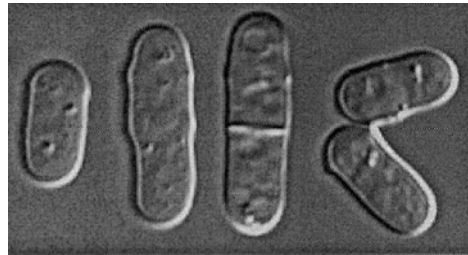
Abbildung 15: Ausschnitt aus einem phylogenetischen Baum mit der Gruppe der Ascomyceten

### 3.4.1 Zellzyklus von *S. pombe*

Das haploide Spaltheife-Genom hat eine Größe von 14 Millionen Basenpaaren (Mb) und ist in 3 Chromosomen unterteilt: Chromosom I (5,7 Mb), Chromosom II (4,6 Mb) und Chromosom III (3,5 Mb). Die Gendichte beträgt zirka 1 / 2300 bp. Das gesamte Genom enthält 5400 Gene.

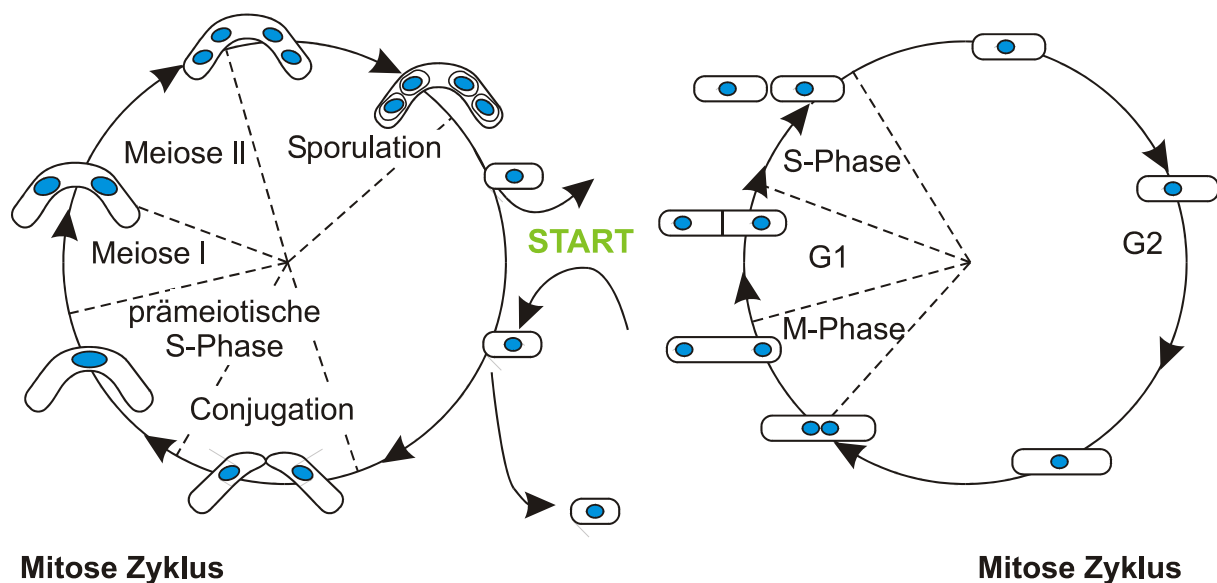
Während ihres normalen Zyklus sind Spaltheifezellen haploid, d.h. sie besitzen nur eine Kopie jedes Chromosoms und somit auch jedes Gens. Haploide Zellen werden meist für die Forschung verwendet, weil sich sowohl rezessive als auch dominante Mutationen in einem mutierten Phenotyp zeigen. Haploide Zellen vermehren sich asexuell durch Mitose. Die neu gebildeten Tochterzellen wachsen an der Spitze der stabförmigen Zellen. Wenn sie eine bestimmte Länge erreicht haben, stoppt das Wachstum, und es bildet sich ein Septum in der Mitte der Zellen. Dieses Septum trennt die beiden Mutterzellen in zwei gleichgroße Zellen (siehe Abbildung 16). Unter

optimalen Wachstumsbedingungen beginnen die neu gebildeten Tochterzellen den haploiden Zellzyklus von vorne.



**Abbildung 16:** Mikroskopische Aufnahme der Teilung eine Spalthefezelle

Jeder haploide Zellzyklus dauert etwa 3 Stunden im Vergleich zu 24 Stunden für den Säugetierzellzyklus. Abbildung 16 zeigt den Mitose-Zyklus der Spaltheefe. Sie besitzt zwei so genannte *mating types* ( $m^+$  und  $m^-$ ). Wenn nährstoffreiche Bedingungen mit nährstoffarmen abwechseln, konjugieren haploide Spalthefezellen mit unterschiedlichem *mating type* und fusionieren an den Spitzen der Zellen. Bei der anschließenden Fusion der Zellkerne bilden sich diploide Zellen. Diese sogenannten Zygoten durchlaufen einen Meiose-Zyklus (siehe Abbildung 16), an dessen Ende sich in den diploiden Zellen vier Sporen-Asci bilden. Die Sporen werden durch Autolyse der Zellwand freigesetzt und können längere Zeit überleben; sobald sie auf nährstoffreiche Bedingungen treffen keimen sie, und der haploide Zellzyklus beginnt erneut.



**Abbildung 17:** Meiose und Mitose Zyklus von *Schizosaccharomyces pombe*



## 4 Zielsetzung

Der Inhalt dieser Arbeit ist Teil des durch das BMBF finanzierten Projekts „Produktion von Hydrocortison (Cortisol) mit Hilfe rekombinanter Spaltheferzellen“. Innerhalb dieses Projektes, an welchem auch das Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes (Leitung Prof. Dr. Rita Bernhardt) und die Schering AG Bergkamen mit eingebunden sind, sollte am Institut für Technische Biochemie als dritter Teil dieses Projektes ein optimiertes Fermentationsverfahren für *Schizosaccharomyces pombe* entwickelt werden, um die Produktion von Hydrocortison aus 11-Desoxycortisol im Maßstab bis 30 L durchzuführen. Die Zielsetzung des gesamten Projektes ist es, ein Verfahren zur Produktion von Hydrocortison aus 11-Desoxycortisol zu etablieren, welches das im Säugerorganismus für diese Umsetzung verwendete Enzym (CYP11B1) oder gentechnisch erzeugte, aktivere Mutanten dieses Enzyms nutzt. Rekombinante Spalthefern (*Schizosaccharomyces pombe*), die dieses Enzym exprimieren, werden im Bioreaktor einen umweltgerechteren, ressourcenschonenderen und rentableren Prozess erlauben als das bei der Schering AG angewandte Verfahren, das einen filamentösen Pilz für die Biokonversion nutzt.

Die großtechnische Produktion von Steroidhormonen durch Mikroorganismen hat in den letzten Jahrzehnten erheblich an Bedeutung gewonnen, da sie gegenüber der klassischen organisch-chemischen Synthese eine Vielzahl von Vorteilen aufweist (Stereo- und Regioselektivität, quantitativer Umsatz im Fließgleichgewicht, Reaktion bei normalem Druck und moderater Temperatur u.a.). Mit Hilfe mikrobiologischer Verfahren konnten deswegen die Anzahl der erforderlichen Syntheseschritte in der Steroidsynthese deutlich reduziert und erhebliche Kosteneinsparungen erzielt werden. Ein entscheidender, weil sehr aufwendiger Schritt bei der technischen Synthese von Hydrocortison ist die 11 $\beta$ -Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol. Die rein chemische Durchführung dieser Reaktion über eine stereo- und regioselektiven Hydroxylierung erfordert eine Reihe von Einzelschritten.

Großtechnisch wird bei der Schering AG gegenwärtig ein filamentöser Pilz (*Curvularia lunata*) für die 11 $\beta$ -Hydroxylierung eingesetzt. Dieser Prozess wurde bereits 1955 eingeführt [69] und ist in Bezug auf Selektionierung geeigneter Stämme, Veränderungen der Wachstumsbedingungen und Variation der Substratderivate umfassend getestet worden. Von Optimierungsansätzen, die nicht auf

gentechnischen Methoden beruhen, sind daher keine wesentlichen Verbesserungen zu erwarten. In der Gruppe von R. Bernhardt wurden die cDNAs für CYP11B1 [70] sowie für das nahe verwandte CYP11B2 [68] sowohl aus der humanen Nebenniere als auch aus der des Meerschweinchens kloniert. Außerdem wurde von M. Bureik im Jahr 1997 ein Spalthefeexpressionssystem für humanes CYP11B2 und CYP11B1 entwickelt. Die in *S. pombe* exprimierten Enzyme konnten in einem rekonstitutiven System eingesetzt und ihre Aktivität nachgewiesen werden. Die P450-Monooxygenase CYP11B2 und CYP11B2 wurden unter dem nicht induzierbaren *nmt*-Promotor (no message with thiamine) kloniert und werden somit, bei Abwesenheit von Thiamin im Medium konstitutiv exprimiert. Notwendigerweise erfordert dieses System den Einsatz von thiaminfreien Medien bei der Fermentation.

In der Gruppe R. Bernhardt / M. Bureik konnte das zu Adrenodoxin homologe Spalthefeprotein *etp1* identifiziert [68] und teilweise charakterisiert werden [71]. Der C-terminale Teil von *etp1*, in dem sich der zu Adrenodoxin homologe Teil des Proteins befindet, wurde in Bakterien exprimiert und aufgereinigt. Es konnte gezeigt werden, dass *etp1 in vitro* Elektronen von Adrenodoxin-Reduktase auf Cytochrom-P450-Monooxygenase übertragen kann [71].

Es ist zu erwarten, dass beim Einsatz einer gentechnisch optimierten Spalthefe, die eine hochspezifische Hydroxylase in hoher Dichte exprimiert, sich eine wesentlich bessere Raum-Zeit-Ausbeute erzielt lässt als mit dem klassischen Verfahren, das die Biotransformation synthetischer Steroidderivate durch einen filamentösen Pilz nutzt. Hierzu sollen im Rahmen dieses Teilprojekts die in der Gruppe Bureik erstellten rekombinanten Spalthefestämme im Maßstab bis 40 L fermentiert werden. Zunächst wird die Optimierung wichtiger Fermentations- und Wachstumsparameter im Maßstab von 200 mL bis 5 L durchgeführt, da sich bis zum heutigen Zeitpunkt nur die Arbeitsgruppe um Williams [72,73] mit dem Thema der Fermentation bzw. Wachstumsoptimierung mit rekombinanten Spalthefestämmen beschäftigt hat. Bei der Optimierung der Umsatzrate der rekombinanten *S. pombe* Stämme sollen sowohl Batch- als auch Fed-Batch-Fermentationsverfahren verwendet werden, um durch eine möglichst hohe Zelldichte die im Vergleich zu dem derzeit bei Schering verwendeten Verfahren noch geringen Umsatzraten zu kompensieren.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute bei der Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol zu Hydrocortison mit rekombinanter Spalthefe ohne jede Optimierung 3.1  $\mu\text{M}/\text{d}$  beträgt. Dieser Wert liegt zwar noch deutlich unterhalb der Umsatzrate, die bei der Schering AG mit dem klassischen mikrobiellen Verfahren beobachtet wird, die Umsatzrate kann jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit durch gentechnische Methoden und gezielte verfahrenstechnische Optimierungen über den gegenwärtigen Stand der Technik hinaus verbessert werden.

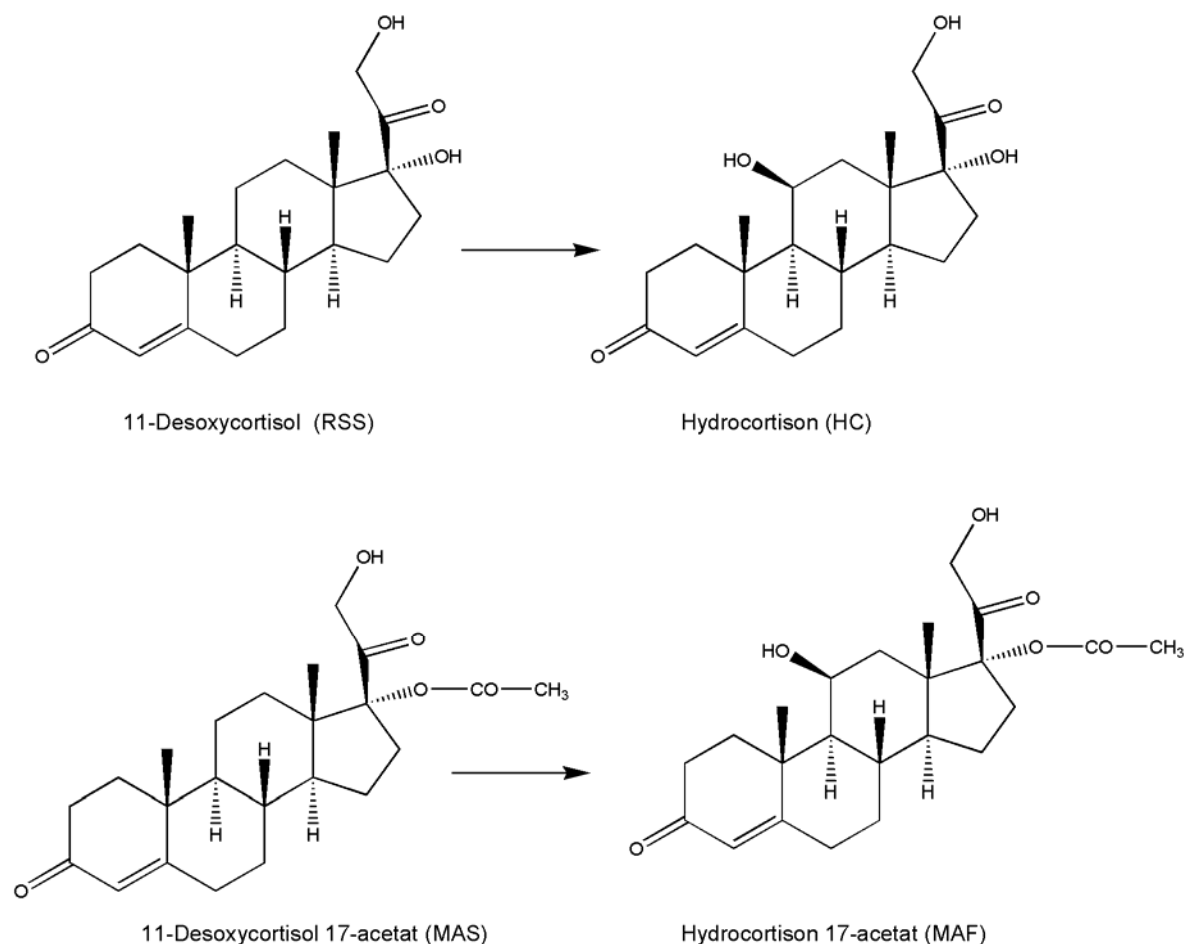
Für die vorliegende Arbeit ergeben sich dadurch im Einzelnen folgende Aufgaben:

- Entwicklung von Analysesystemen zum Nachweis von Hydrocortison während der Biotransformation. Hierbei ist es notwendig, sowohl eine quantitative Nachweismethode für die genaue Bestimmung der Cortisolmenge, als auch ein semiquantitatives Assaysystem für die Überwachung der Cortisolbildungsrate bei veränderten Wachstumsparametern während der Fermentationsoptimierung zu entwickeln.
- Entwicklung eines optimierten Fermentationsverfahrens hinsichtlich der Produktion von Hydrocortison. Hierbei sollte einerseits eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute der Hydrocortisonproduktion, andererseits eine möglichst hohe Zelldichte erreicht werden.
- Optimierung der Medienzusammensetzung für eine verbesserte Expression der Monooxygenase P450 CYP11B1 und eine daraus resultierende erhöhte Umsatzrate. Optimierung der Zulufrate für eine für die Umsetzung optimale Sauerstoffversorgung der Zellen und der P450 CYP11B1 Monooxygenase.
- Einsatz des Assaysystems als Screeningmethode zur Entdeckung von 11-Desoxycortisol hydroxylierenden Stämmen.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Assay-Entwicklung zum Nachweis von Hydrocortison und Hydrocortisonderivaten**

Ein wichtiger Teil der hier dargestellten Arbeit war die Optimierung der Fermentationsparameter hinsichtlich einer verbesserten Hydrocortisonproduktion. Um Änderungen der Bildungsrate des Hydrocortisons während der Fermentation zu messen, stand zu Beginn dieser Arbeit nur die HPLC-Analyse zur Verfügung. Diese Methode gewährleistet eine präzise Quantifizierung des Hydrocortisons; nachteilig ist allerdings die Zeitverzögerung zwischen Probennahme und Messergebnis. Daher erschien es notwendig, eine schnelle, semi-quantitative Methode zur Detektion von Hydrocortison zu entwickeln. Diese Nachweismethode sollte die Detektion über die Bildung eines Chromophors zur photometrischen Bestimmung des Hydrocortisons ermöglichen. Idealerweise sollte der Nachweis auch für das von der Schering AG bereitgestellte 11-Desoxycortisol Derivat MAS und das daraus gebildete MAF (siehe Abb. 18) verwendbar sein.



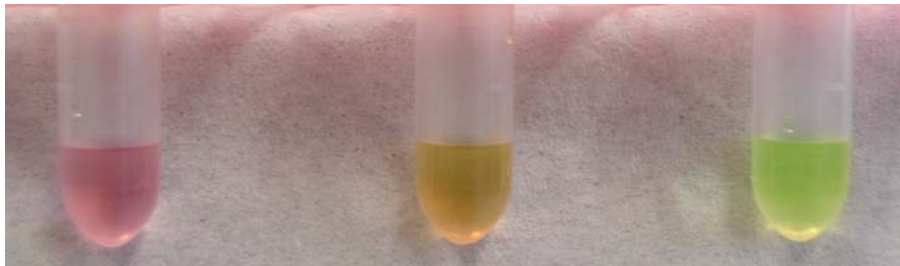
**Abbildung 18:** Reaktionsschema von 11-Desoxycortisol und 11-Desoxycortisol-17-acetat zu Hydrocortison und Hydrocortison-17-acetat

In der Literatur finde sich einige Arbeiten aus den Jahren 1950-1960 zum Nachweis von Steroiden durch Bildung von Chromophoren [74-79]. Zumeist wird dabei die Bildung eines farbigen, teilweise auch fluoreszierenden Farbstoffes bei Inkubation von Steroiden mit starken Säuren wie  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $\text{H}_3\text{PO}_4$  genutzt [80-87]. Diese Methoden wurden ausschließlich zur Charakterisierung von Steroiden oder zum Nachweis bestimmter Steroide aus Blut- und Urinproben entwickelt.

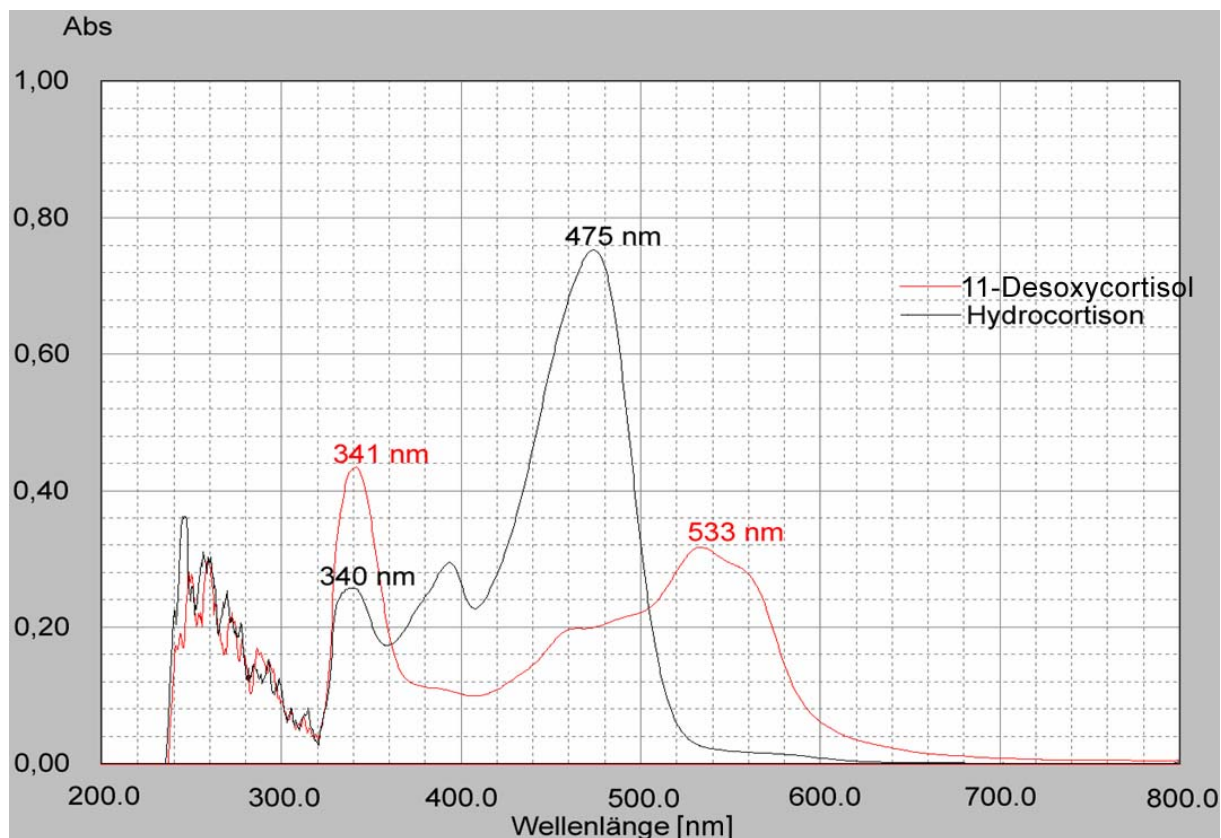
### 5.1.1 Nachweis von 11-Desoxycortisol und Hydrocortison mit konz. Schwefelsäure

Nach eingehenden Experimenten mit den in den genannten Publikationen beschriebenen Methoden lässt sich eine farbliche Unterscheidung von 11-Desoxycortisol und Hydrocortison nur bei Verwendung von konz. Schwefelsäure erreichen. Bei allen anderen beschriebenen Reaktionen unter Verwendung von 2,6-Di-tert-

butyl-*p*-cresol, Metaperiodat, Phenylhydrazin oder anderen starken Säuren wie z. B. Phosphorsäure bildete sich entweder kein Chromophor, oder es ist keine farbliche Unterscheidung zwischen 11-Desoxycortisol und Hydrocortison möglich. Abbildung 20 zeigt UV/VIS-Spektren der gebildeten Chromophore bei Inkubation (30 min) 11-Desoxycortisol und Hydrocortison mit konz. Schwefelsäure. Die Spektren werden gegen konz. Schwefelsäure als Referenz aufgenommen. Wie Abbildung 19 zeigt, lassen sich die gebildeten Chromophore auch direkt mit dem Auge unterscheiden: 11-Desoxycortisol bildet bei Inkubation mit Schwefelsäure einen rosa, Hydrocortison einen leuchtend gelben Farbkomplex. Eine 1:1 Mischung aus 11-Desoxycortisol und Hydrocortison ergibt eine orange Mischfärbung.



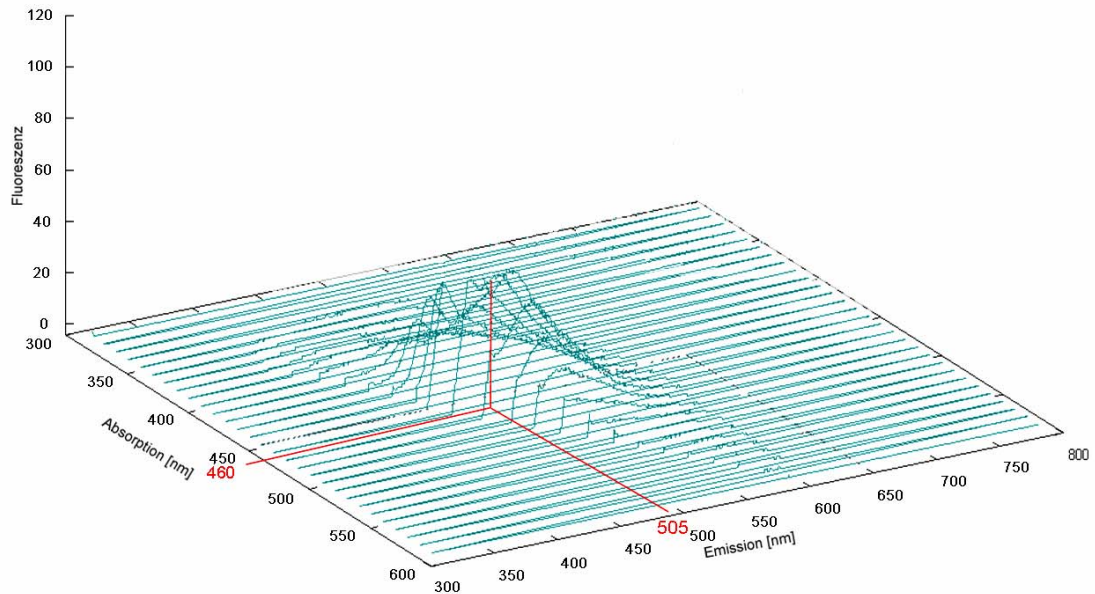
**Abbildung 19:** Farbkomplexe von 11-Desoxycortisol und Hydrocortison nach der Inkubation mit konz. Schwefelsäure



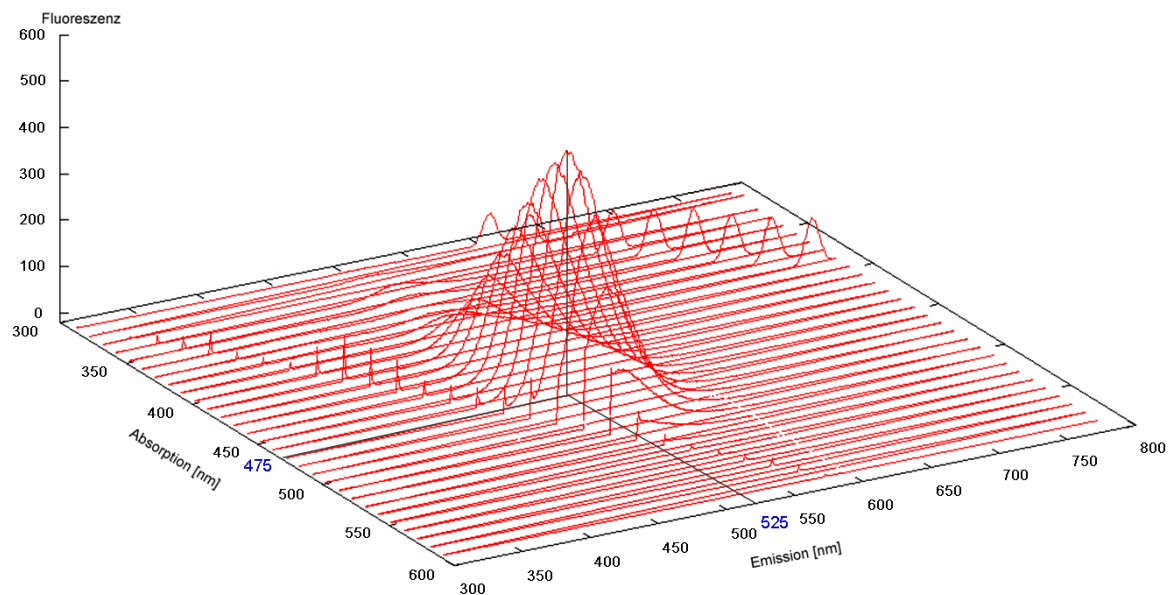
**Abbildung 20:** UV/VIS-Spektrum der Farbkomplexe von 11-Desoxycortisol und Hydrocortison nach der Inkubation mit konz. Schwefelsäure

### 5.1.2 Fluoreszenzspektren von Hydrocortison und 11-Desoxycortisol

Die brillanter Gelbfärbung des mit Hydrocortison gebildeten Chromophors legte die Vermutung nahe, dass dieser Farbkomplex auch eine Fluoreszenz im sichtbaren Bereich besitzt. Am Institut für Physikalische Chemie der Universität Stuttgart wurden daher Fluoreszenzspektren der Farbkomplexe von 11-Desoxycortisol und Hydrocortison aufgenommen (300 – 800 nm, Anregungswellenlänge 300 – 600 nm). Mit dem Programm Gnu-Plot ließen sich daraus die 3D-Diagramme in Abbildung 21 berechnen. Beim Farbkomplex von 11-Desoxycortisol liegt das Fluoreszenzmaximum bei einer Absorption von 460 nm und einer Emission von 505 nm (relative Intensität 40 FE). Für den mit Hydrocortison gebildeten Fluorophor liegt das Maximum bei 475 nm Absorption und 525 nm Emission (relative Intensität 390 FE).



**Abbildung 21:** 3D-Korrelationsdiagramm Absorption/Emission für die Fluoreszenz des mit 11-Desoxycortisol gebildeten Farbstoffes



**Abbildung 22:** 3D-Korrelationsdiagramm Absorption/Emission für die Fluoreszenz des mit Hydrocortisol gebildeten Farbstoffes

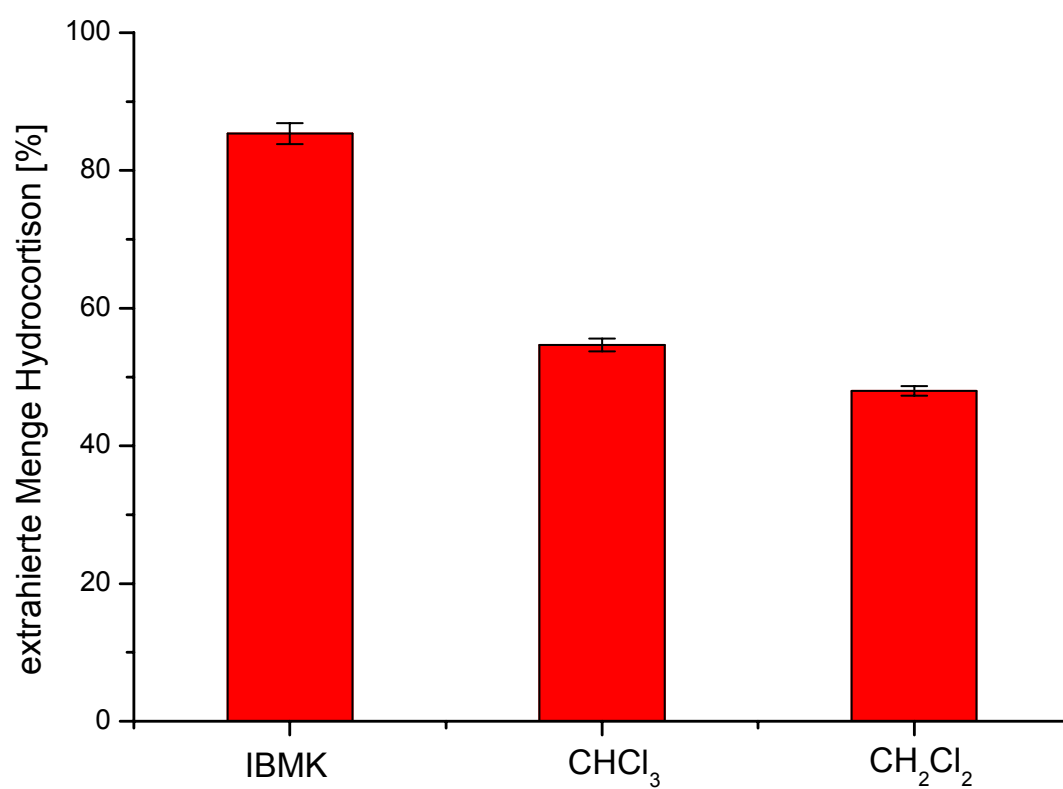


### 5.1.3 Entwicklung eines Fluoreszenz-Assay für den Nachweis von Hydrocortison

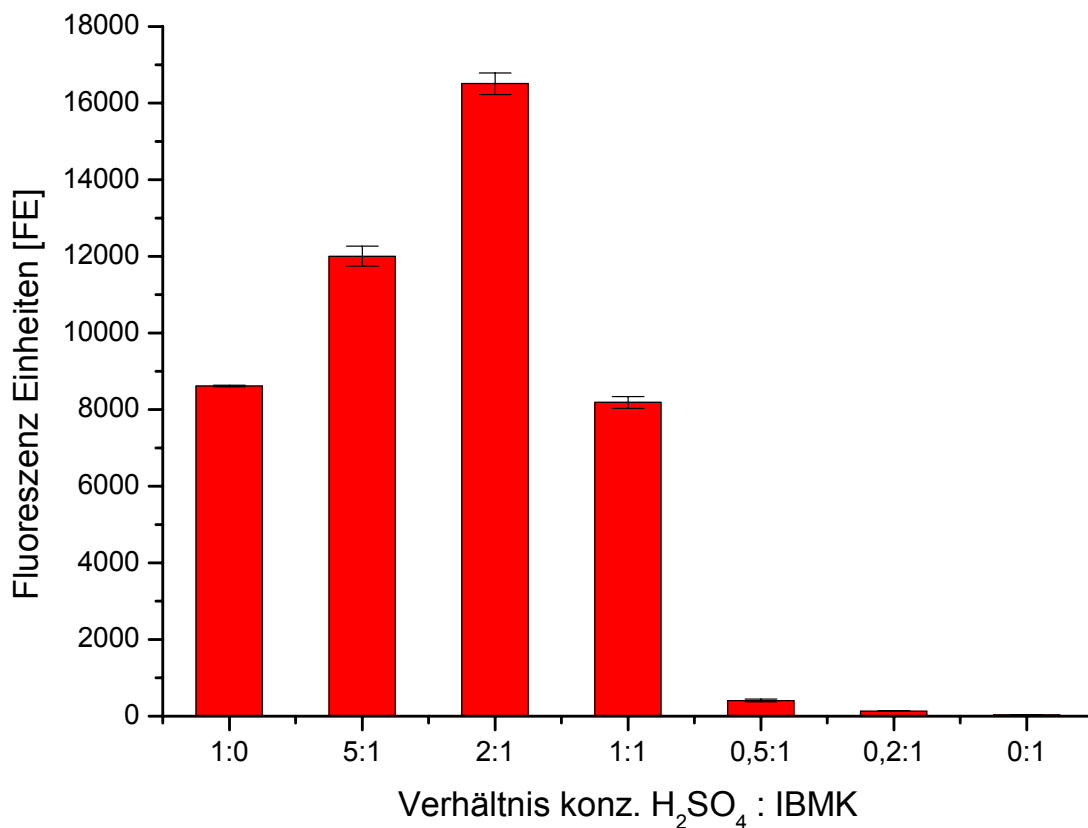
Für die nachstehend beschriebenen Messungen wurde ein Mikrotiterplatten-Fluorophotometer mit speziellen, säureresistenten 96 Well-Fluoreszenzmikrotiterplatten aus Polypropylen (NUNC) eingesetzt. Für die Anregungswellenlänge wurde ein 470 nm-Filter ( $\pm 6$  nm), für die Fluoreszenzdetektion ein 520 nm-Filter ( $\pm 6$  nm) verwendet.

Wie Experimente mit dem Hydrocortison-Fluorophor zeigten, ist die Fluoreszenz nur in einem wasserfreien System nachweisbar; bereits nach Zugabe von 1 % H<sub>2</sub>O zum gebildeten Fluorophor wird die Fluoreszenz gelöscht. Daher war eine Lösungsmittel-Extraktion der Steroide erforderlich. Zur Optimierung dieser Extraktion wurden jeweils 100  $\mu$ L ethanolische Hydrocortison-Lösung ( $c = 0,1$  mg/mL) in 5 mL Wasser gelöst und mit 500  $\mu$ L Chloroform, Dichlormethan bzw. Isobutylmethylketon (IBMK) extrahiert. Vom Extrakt wurden 200  $\mu$ L abgenommen und mit N<sub>2</sub> vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in 300  $\mu$ L konz. Schwefelsäure suspendiert und die Fluoreszenz gemessen. Diese Bestimmungen wurden für jedes Lösungsmittel zehnmal durchgeführt. Aus den Mittelwerten der so ermittelten Fluoreszenzintensität wurde die Menge an extrahiertem Hydrocortison gegen die Fluoreszenz von 30 nmol Hydrocortison als Referenz bestimmt. Abbildung 23 zeigt die Extraktionseffizienz für die drei Lösungsmittel: mit IBMK wurde das Hydrocortison zu 85 %, mit Chloroform zu 55 % und mit Dichlormethan nur zu 48 % extrahiert.

Wegen seines deutlich höheren Siedepunkts (102°C) ist bei Isobutylmethylketon allerdings eine Evaporationsdauer von 12 h bei 60°C erforderlich. Um trotzdem einen schnellen Nachweis von Hydrocortison zu ermöglichen, wurde auf das Abdampfen des Lösungsmittels verzichtet und die konz. Schwefelsäure direkt zum Extrakt zugegeben. Verblüffenderweise hat das IBMK einen positiven Effekt auf die Fluoreszenzintensität. Wie Abbildung 24 zeigt, erhöht sich bis zu einem Verhältnis Schwefelsäure / IBMK von 2:1 die Fluoreszenzintensität bis auf den doppelten Wert (Mittelwerte aus je 10 Einzelmessungen mit 30 nmol Hydrocortison; Inkubationszeit 30 min bei RT).

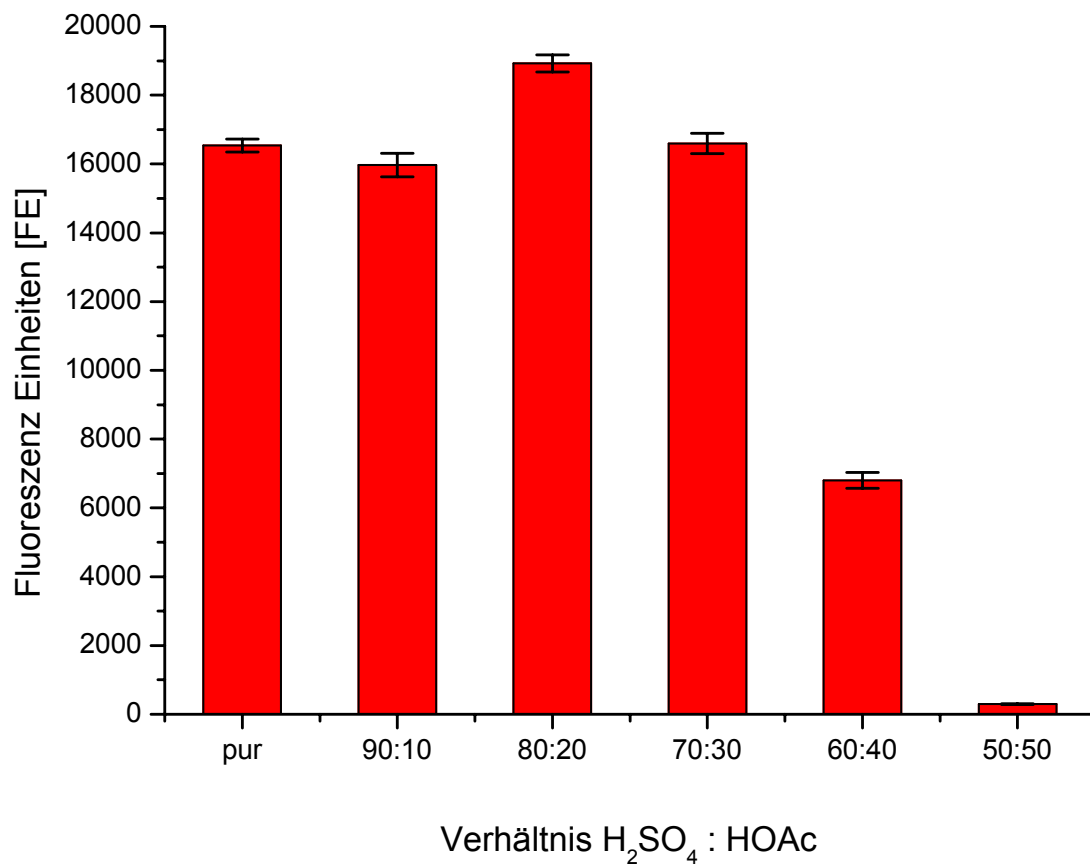


**Abbildung 23:** Bestimmung der extrahierten Hydrocortison-Menge mit verschiedenen Lösungsmitteln



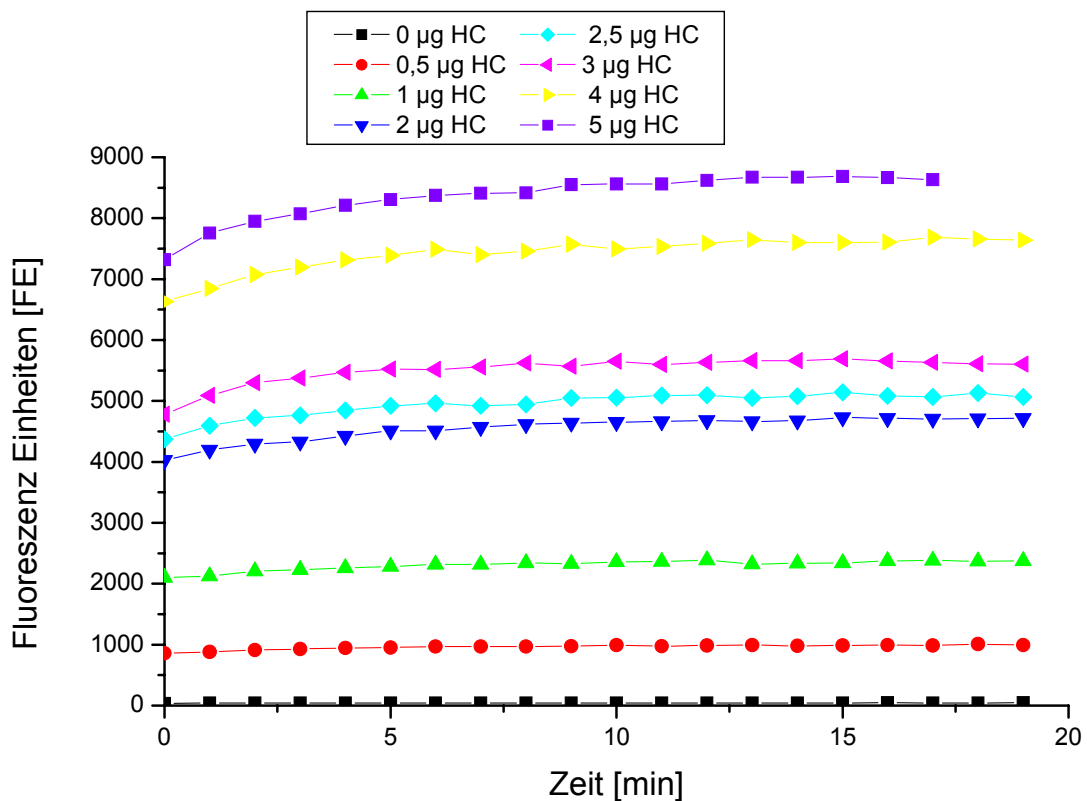
**Abbildung 24:** Bestimmung des optimalen Säure / IBMK Verhältnis

Konz. Schwefelsäure lässt sich auf Grund ihrer hohen Viskosität nur schlecht pipettieren, was einen erhöhten Fehler bei der Bestimmung der Hydrocortisonmenge bedingt. Daher wurden verschiedene Schwefelsäure-Verdünnungen mit konz. Essigsäure getestet. Wie Abbildung 25 zeigt, erhöht sich bei einem Mischungsverhältnis Essigsäure/Schwefelsäure von 20:80 die Fluoreszenzintensität nochmals um etwa 15 %, um bei einer weiteren Erhöhung der Essigsäuremenge wieder abzusinken. Das Volumenverhältnis Schwefelsäure-Essigsäure-Mischung zu IBMK war bei allen Messungen konstant 2:1 (jeweils 10 Einzelmessungen mit 30 nmol Hydrocortison).



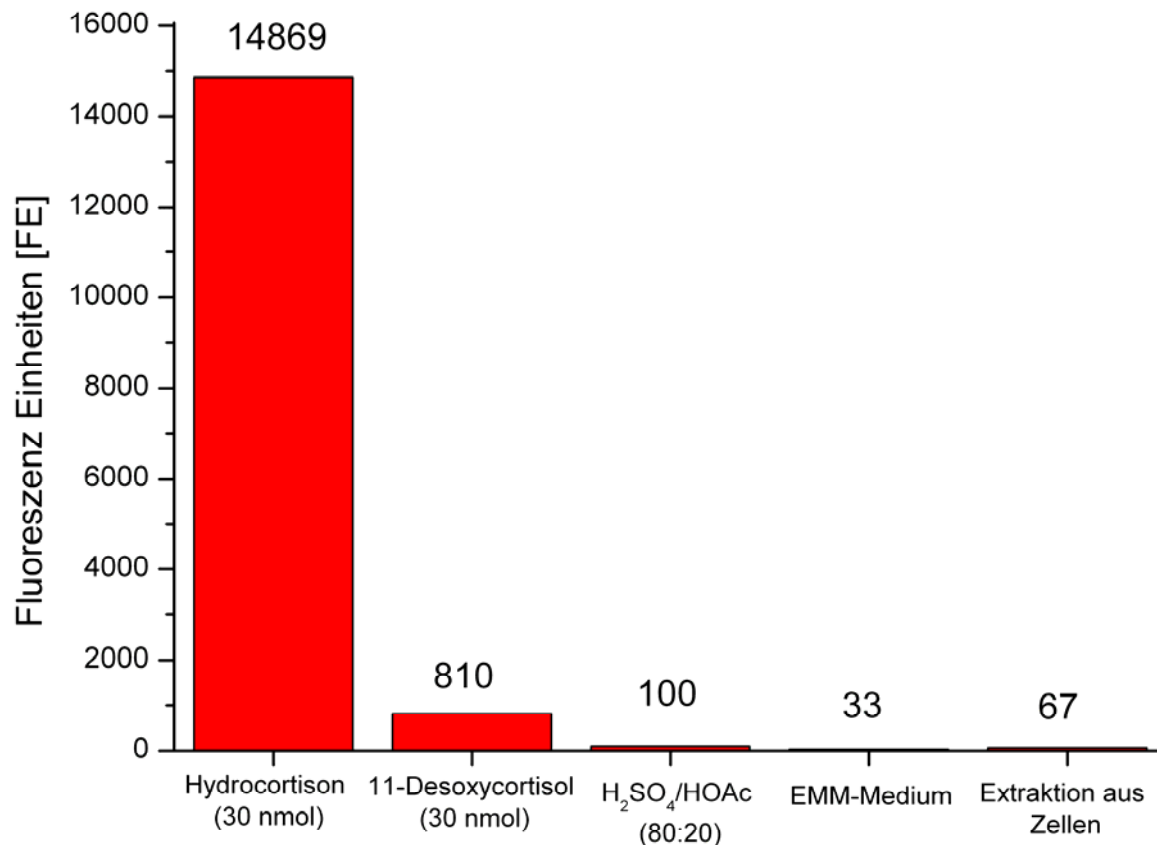
**Abbildung 25:** Optimierung des Mischungsverhältnisses von Schwefelsäure und Essigsäure

In einem letzten Optimierungsschritt wurde noch die Änderung der Fluoreszenzintensität mit der Zeit bestimmt, um so die optimale Inkubationsdauer zu ermitteln. Hierfür wurden unter den angegebenen Bedingungen verschiedene Konzentrationen an Hydrocortison mit der optimierten IBMK/Säure-Mischung inkubiert und die Änderung der Fluoreszenzintensität verfolgt. Abbildung 26 zeigt, dass nach 15 min bei allen Konzentrationen ein Maximum der Fluoreszenzintensität erreicht ist.



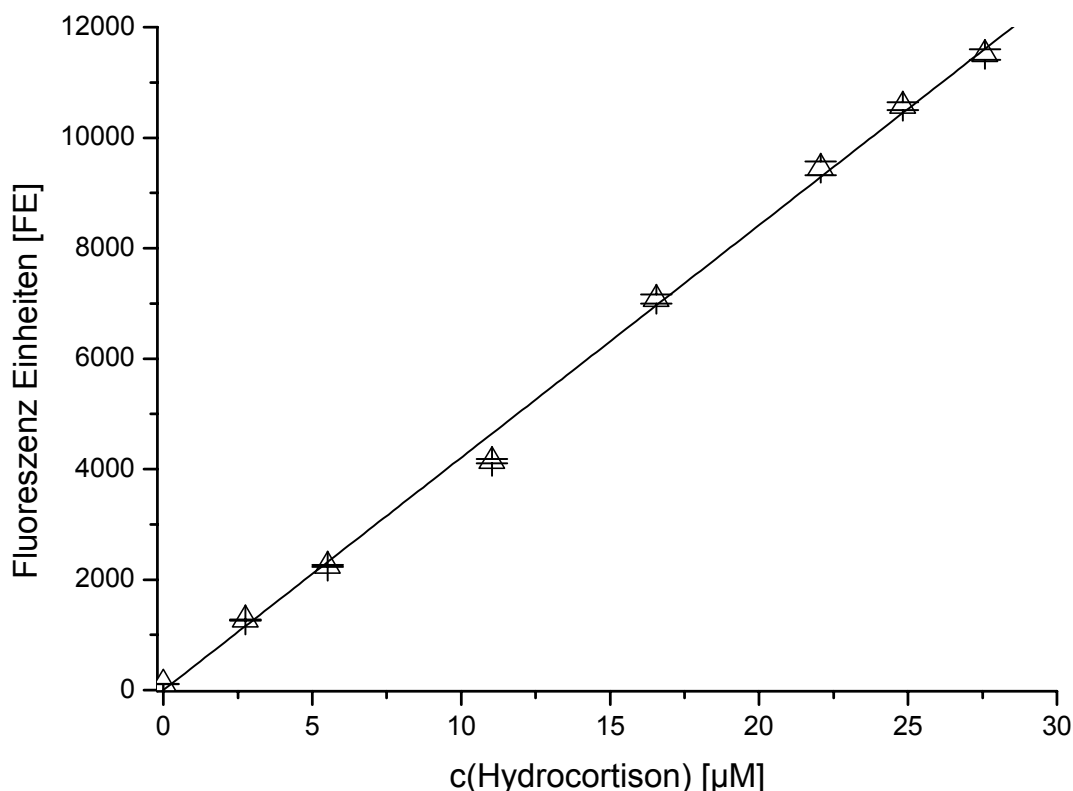
**Abbildung 26:** Optimierung der Inkubationszeit

Die Biotransformation von 11-Desoxycortisol zu Hydrocortison mit ganzen Zellen von *S. pombe* wird in einem synthetischen Medium durchgeführt, das zudem stets nicht umgesetztes 11-Desoxycortisol enthält. Bei der Extraktion mit IBMK werden daher Medienbestandteile, Zelltrümmer oder Zellinhaltsstoffe und nicht umgesetztes 11-Desoxycortisol extrahiert. Daher musste der Einfluss dieser Komponenten auf die Fluoreszenzintensität von Hydrocortison geprüft werden. Die Fluoreszenz der einzelnen Bestandteile wurde unter den optimierten Assay-Bedingungen (s. 5.3.2.1) bestimmt. Abbildung 27 zeigt, dass mit Glasperlen in der Retsch-Mühle aufgeschlossene und mit IBMK extrahierte Zellen von *S. pombe* bei der für die Messung verwendeten Wellenlänge nahezu keine Fluoreszenz zeigen. Das Gleiche gilt für das hier verwendete EMM-Medium. Nicht umgesetztes und mit IBMK ebenfalls aus der wässrigen Lösung extrahiertes 11-Desoxycortisol führt zu einem Fehler von max. 5,5 %.



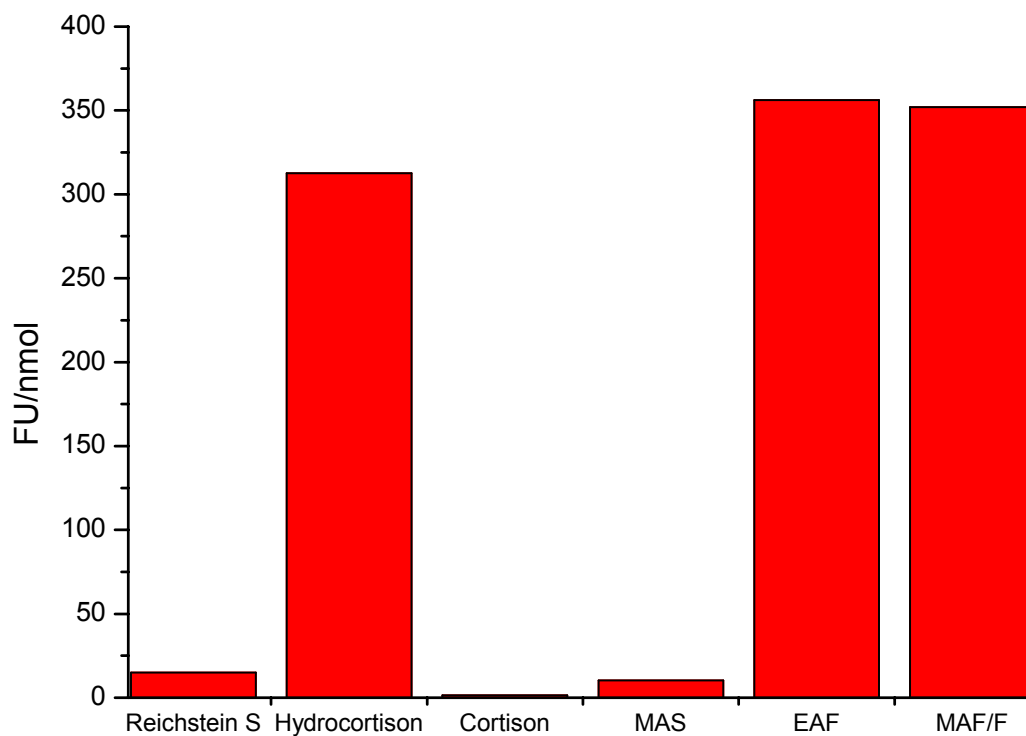
**Abbildung 27:** Fluoreszenzintensität bei 520 nm für die einzelnen Komponenten des Hydrocortison-Assay

Um den Standardfehler des Assay für die Bestimmung der Hydrocortison-Menge zu bestimmen, wurde eine Kalibrierfunktion im Konzentrationsbereich 0 – 30  $\mu\text{M}$  erstellt. Für jeden Messpunkt wurden 12 Einzelmessungen unter Standardbedingungen durchgeführt. Abbildung 28 zeigt die so bestimmte Korrelationsgerade (Korrelationskoeffizient  $r = 0,9988$ ). Für die einzelne Bestimmung der Hydrocortison-Menge liegt der Standardfehler im Bereich von 2,1 - 3,9 % (Berechnung s. 5.3.2.2). Unter Einbeziehung der relativen Fluoreszenzintensität von nicht umgesetztem 11-Desoxycortisol ergibt sich mit dem Standardfehler der Kalibrierfunktion ein Gesamtfehler für die Bestimmung der Hydrocortison-Konzentration bei der Biotransformation mit *S. pombe* von unter 10 %.



**Abbildung 28:** Messung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Hydrocortison-Konzentration

Da für die Umsetzung mit rekombinanter Spaltheife auch 11-Desoxycortisol-Derivate wie 11-Desoxycortisol-17-acetat (MAS) verwendet werden sollten und hierbei auch Hydrocortison-Derivate wie Hydrocortison-17-acetat (MAF) bzw. -21-acetat (EAF) entstehen, wurde auch für diese Verbindungen die Fluoreszenz unter den Standardbedingungen für den Assay untersucht. Alle Substanzen wurden in gleicher Konzentration in IBMK gelöst und bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm die Fluoreszenzintensität bei 520 nm bestimmt. Wie Abbildung 29 zeigt, weisen die acetylierten Hydrocortison-Derivate eine geringfügig höhere Fluoreszenzquantenausbeute als Hydrocortison. Acetyliertes 11-Desoxycortisol zeigt wie 11-Desoxycortisol selbst nur eine minimale Fluoreszenz. Das weitere Oxidationsprodukt Cortison zeigt keine messbare Fluoreszenz.

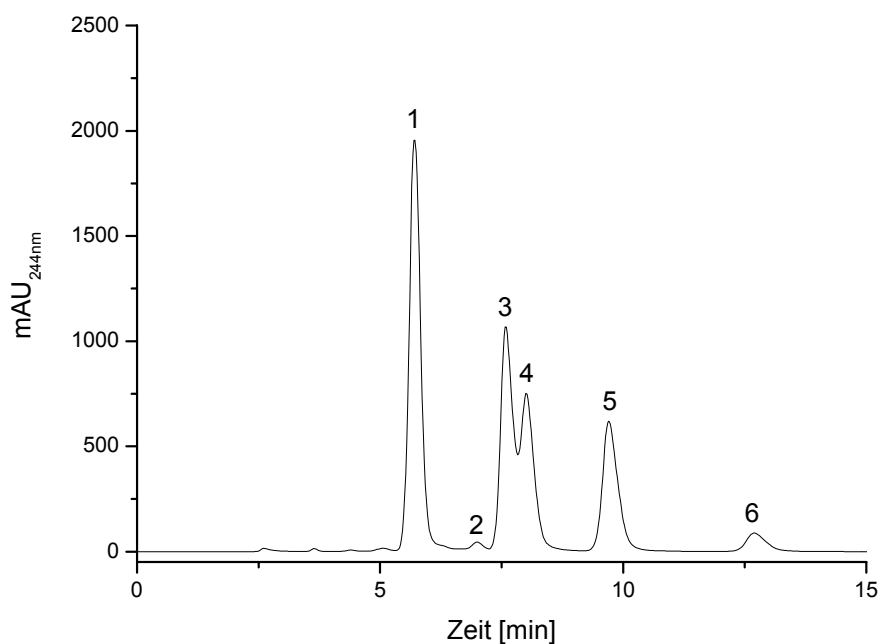


**Abbildung 29:** Fluoreszenzintensität von verschiedenen Hydrocortison- und 11-Desoxycortisol-Derivaten

## 5.2 HPLC-Analytik – Retentionszeiten der Standardsubstanzen

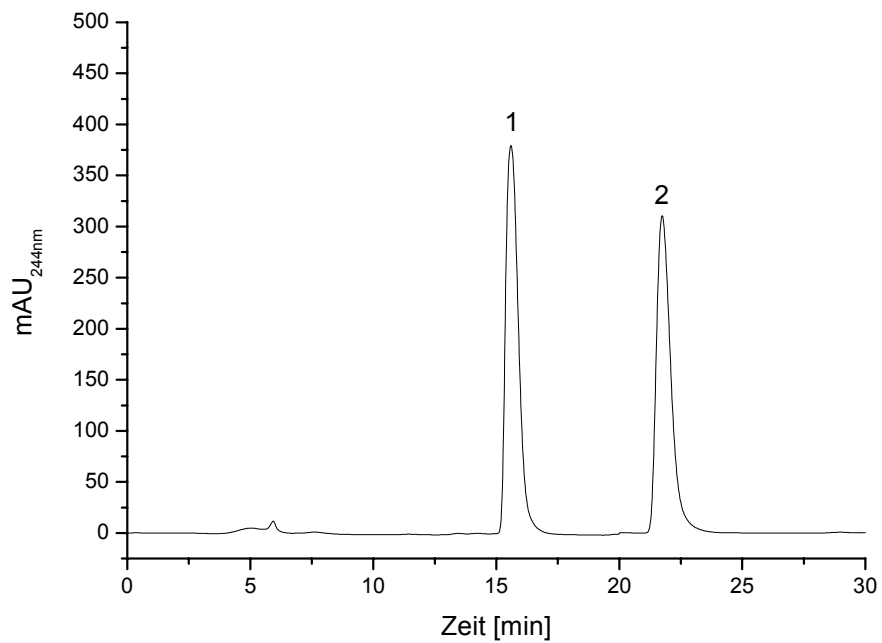
Um das durch *S. pombe* produzierte Hydrocortison exakt zu quantifizieren, wurde zusätzlich zu dem oben beschriebenen Assay eine HPLC-Analyse unter den in Abschnitt 7.3.1.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Abbildung 30 zeigt die Trennung von Hydrocortison, 11-Desoxycortisol und den acetylierten Derivaten MAS, EAS, MAF und EAF (Strukturformeln s. Abbildung 33) an einer analytischen Säule (Nucleosil C18 100 Å 5µm).



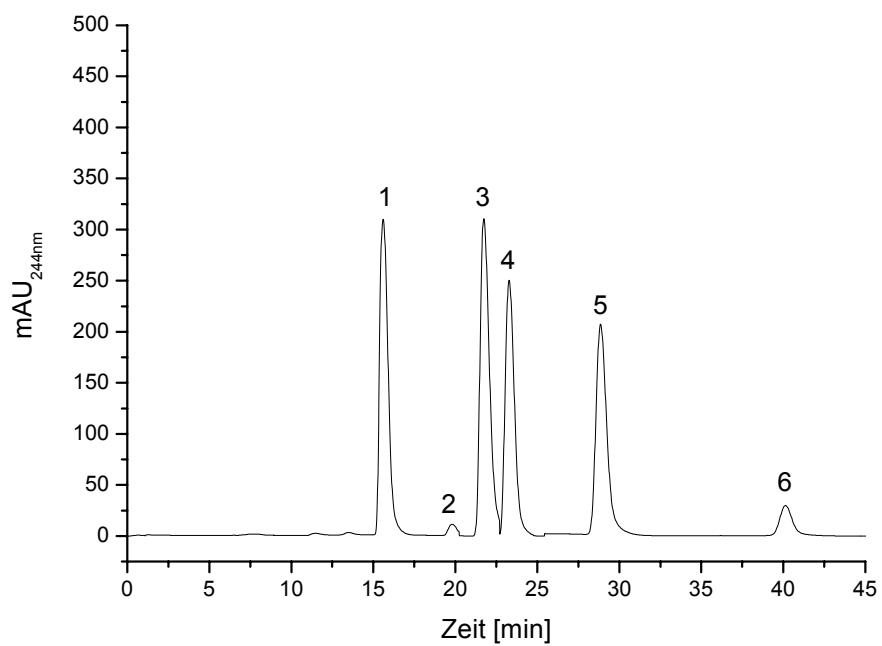


**Abbildung 30:** Retentionszeiten ( $t_R$ ) für die Trennung eines Steroidgemisches an einer analytischen Säule (Nucleosil C18 100 Å 5  $\mu$ m, Fließgeschwindigkeit 0,5 mL/min): Hydrocortison (**1**, 5,75 min), MAF (**2**, 7,05 min), 11-Desoxycortisol (**3**, 7,61 min), EAF (**4**, 8,06 min), MAS (**5**, 9,76 min), EAS (**6**, 12,69 min).

Für die Auftrennung von Steroidgemischen für die NMR-Analyse wurde eine präparative C18 100 Å 5  $\mu$  Säule eingesetzt (s. 5.3.1.3), die im Vergleich zur analytischen Säule erhöhte Retentionszeiten aufweist. Abbildung 31 zeigt das Chromatogramm für die Trennung von Hydrocortison und 11-Desoxycortisol, Abbildung 32 das Chromatogramm für die Mischung mit den entsprechenden 17- bzw. 21-Acetylderivaten (MAS, EAS, MAF und EAF).



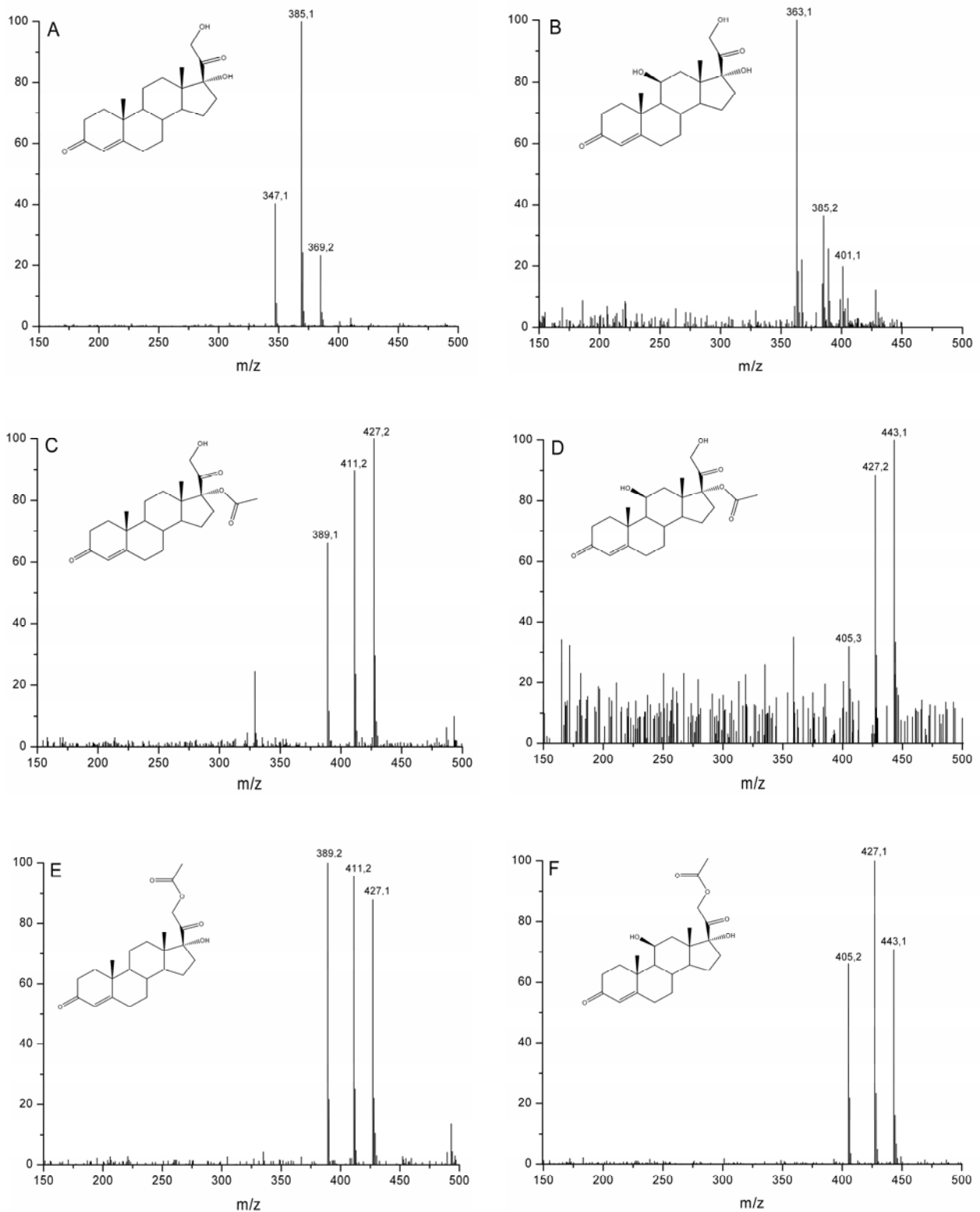
**Abbildung 31:** 1. Hydrocortison  $t_R$ : 15,25 min 2. 11-Desoxycortisol  $t_R$ : 22,47 min auf einer präparativen Säule Nucleosil C18 100 Å 5 µm, Fließgeschwindigkeit 4 mL/min.



**Abbildung 32:** Retentionszeiten von 1. Hydrocortison  $t_R$ : 15,57 min 2. MAF  $t_R$ : 19,80 min 3. 11-Desoxycortisol  $t_R$ : 21,70 min 4. EAF  $t_R$ : 23,30 min 5. MAS  $t_R$ : 28,84 min 6. EAS  $t_R$ : 40,70 min bei Verwendung einer präparativen Säule Nucleosil C18 100 Å 5 µm, Fließgeschwindigkeit 4 mL/min.

### 5.3 HPLC/MS-Analytik – Massenspektren der Standardsubstanzen

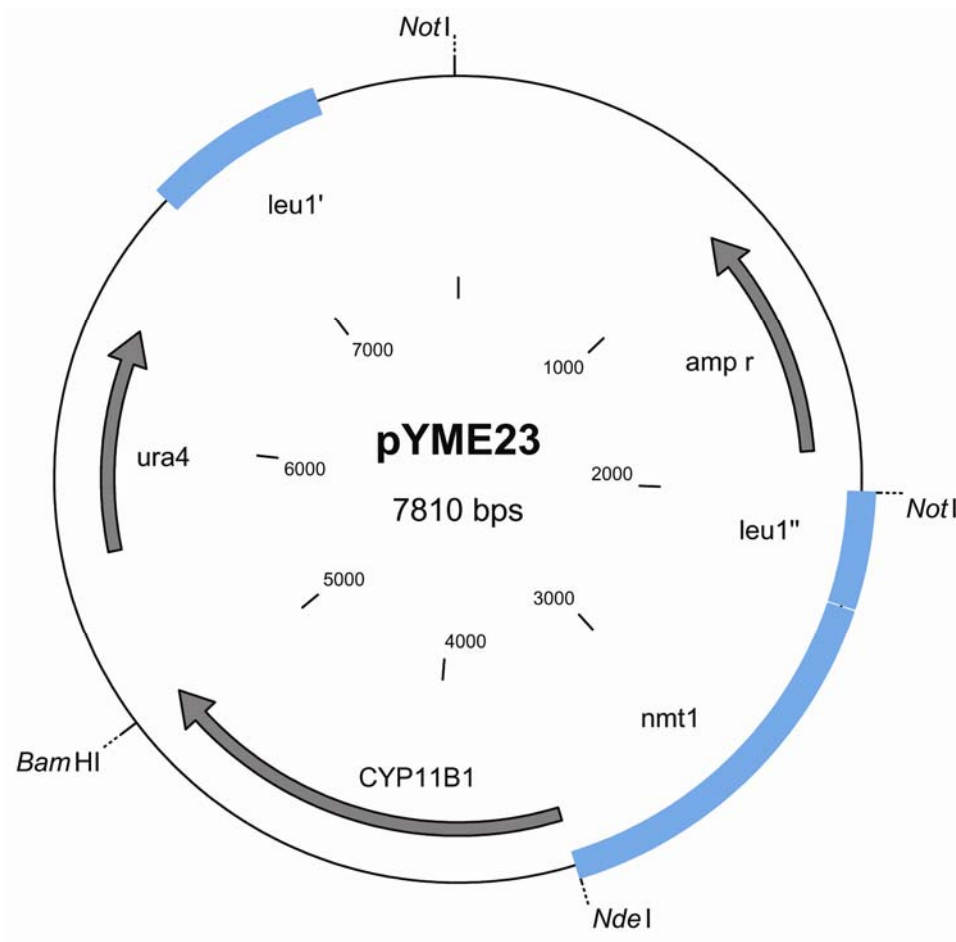
Um genauere Aussagen über die Struktur der aus 11-Desoxycortisol und den 11-Desoxycortisol-Derivaten MAS und EAS gebildeten hydroxylierten Steroide zu treffen, wurden am Institut für Klinische Pharmakologie des Robert Bosch Krankenhauses, (Stuttgart) HPLC/MS-Analysen durchgeführt. Für die Auftrennung des Steroidgemisches wurden die gleichen Bedingungen (Säule, Laufmittel, Fließgeschwindigkeit) wie für die analytische HPLC gewählt. Bei der Elektronenspray-Ionisation [(+)-ESI] wird in der Regel keine Fragmentation beobachtet, so dass die Massenspektren in Abbildung 33 nur die jeweiligen Quasimolekülonen  $MH^+$  und die Addukt-Ionen mit Natrium und Kalium zeigen ( $M + 1/23/39$ )



**Abbildung 33:** Massenspektren der für die HPLC/MS-Analyse eingesetzten Steroide: 11-Desoxycortisol (A, m/z 346 Da), Hydrocortison (B, m/z 362 Da), MAS (C, m/z 388 Da), MAF (D, m/z 404 Da), EAS (E, m/z 388 Da), EAF (F, m/z 404 Da)

## 5.4 Fermentationsoptimierung des rekombinanten *S. pombe* Stammes CAD1

Alle in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Spaltheferstämme wurden am Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes in der Arbeitsgruppe von Dr. Matthias Bureik entwickelt. Die fertigen Stämme wurde auf Agarplatten an das Institut für Technische Biochemie zur Optimierung der Hydrocortison-Ausbeute übergeben. Als erster rekombinanter Spaltehefe-Stamm wurde für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurde der *S. pombe* Stamm CAD1 eingesetzt, mit dem alle Schüttelkolbenexperimente und einige Fermentationsexperimente im Maßstab bis 5 L durchgeführt wurden. Für die Expression der CYP11B1-Monooxygenase wurde das entsprechende Gen unter einen nmt-Promotor kloniert. Das in Abbildung 34 dargestellte Plasmid wurde über die *leu1'* und *leu1''* Regionen in den *leu1*-Locus, welcher sich auf Chromosom II des *S. pombe* Genoms befindet, inseriert. Durch diese Insertion wird der *leu1*-Locus von *S. pombe* zerstört und der Stamm Leucin auxotroph. Diese Auxotrophie dient als Selektionsmarker für eine erfolgreiche Insertion der CYP11B1-Monooxygenase in das Genom von *S. pombe*. Um die korrekte Insertion zu überprüfen, trägt das verwendete Plasmid pYME23 ein *ura4*-Gen, welches dem vorher Uracil auxotrophen Stamm die Fähigkeit der Uracilsynthese ermöglicht. Das humane CYP11B1 Gen wurde unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Nde* I und *Bam* HI in den Vektor kloniert. Für die Insertion wurde der Vektor mit *Not* I linearisiert und durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert.



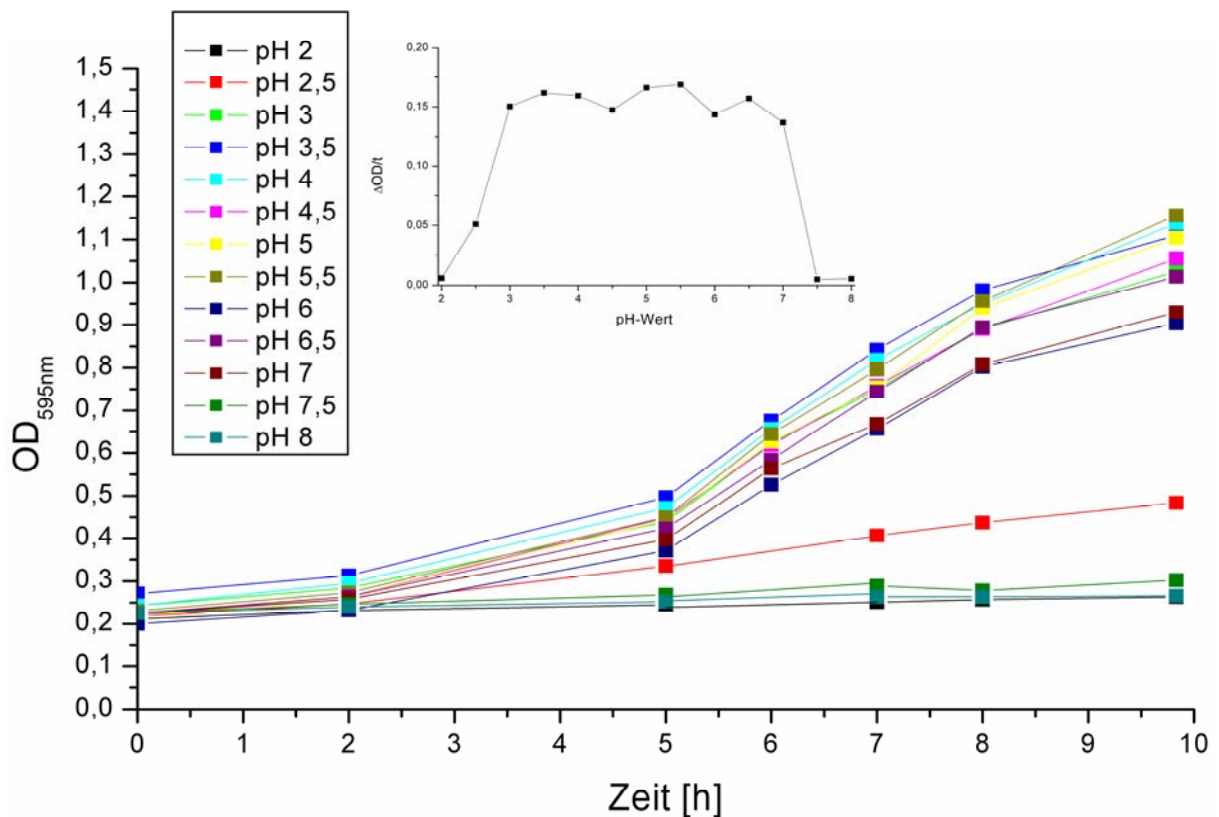
**Abbildung 34:** pYME23 Vektor mit rekombinanter CYP11B1 Monooxygenase

#### 5.4.1 pH-Optimum des rekombinanten Spalthefestammes CAD1

Um eine möglichst hohe spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\max}$  während der Batch- und der Fed-Batch-Phase der Fermentation zu erreichen, wurde zunächst der für das Wachstum optimale pH-Wert des rekombinanten *S. pombe* Stammes CAD1 bestimmt. Hierfür wurde EMM-Medium mit verschiedenen pH-Werten zwischen 2,0 und 8,0 verwendet. Für die Bestimmung des pH-Optimum wurden 200 mL Schüttelkolben mit 50 mL EMM-Medium befüllt und anschließend mit je 5 mL eine Über-Nacht-Kultur von *S. pombe* beimpft. Die OD der Kulturen lag zum Zeitpunkt  $t_0$  bei 0,2 - 0,3  $OD_{595nm}$  Einheiten.

Die Probennahme erfolgte in einem 1-stündigen Intervall. Aus den erhaltenen Werten wurde zum einen die Änderung der Optischen Dichte über die Zeit (Abbildung 35), zum anderen die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit abhängig vom pH-Wert

ermittelt. Der für die Fermentation optimale pH-Wert für *S. pombe* liegt im Bereich pH 4,5 - 5,5.

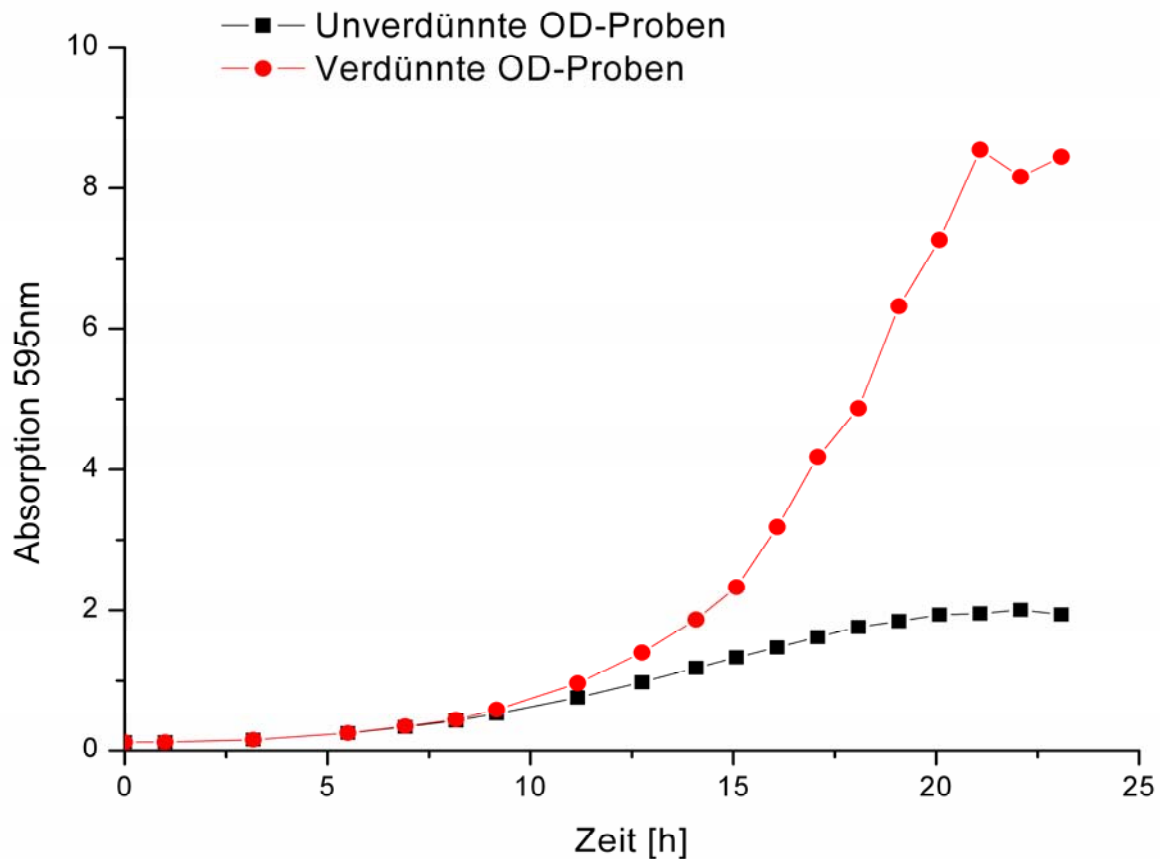


**Abbildung 35:** Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von *S. pombe* CAD1 vom pH-Wert.

#### 5.4.2 Inkubationsdauer der Fermenter-Vorkultur

Um die optimale Inkubationsdauer der 200 mL Vorkultur, mit welcher die Inokulation des Fermenters durchgeführt wird, zu bestimmen, wurden mehrere 1 L Schüttelkolben ( $V = 200$  mL EMM-Medium) mit 20 mL Über-Nacht-Kultur beimpft. Die Inkubation erfolgte bei  $30^{\circ}\text{C}$  und 120 Upm. Das Probenintervall betrug 1 h. Abbildung 36 zeigt, dass sich die Spalthefezellen nach 16 h in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Somit wurde die Inkubationsdauer der Vorkultur auf mindestens 16 h und höchstens 18 h festgelegt. Die maximale Wachstumsgeschwindigkeit in der Vorkultur beträgt  $\mu_{\max} = 0,11$ . Die Inkubationsdauer der Vorkultur muss für jeden *S. pombe* Stamm neu bestimmt werden, da auch schon in den Vorkulturen thiaminfreies Medium eingesetzt wurde, und die konstitutive Expression der

einklonierten humanen Monooxygenasen einen starken Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen hat.

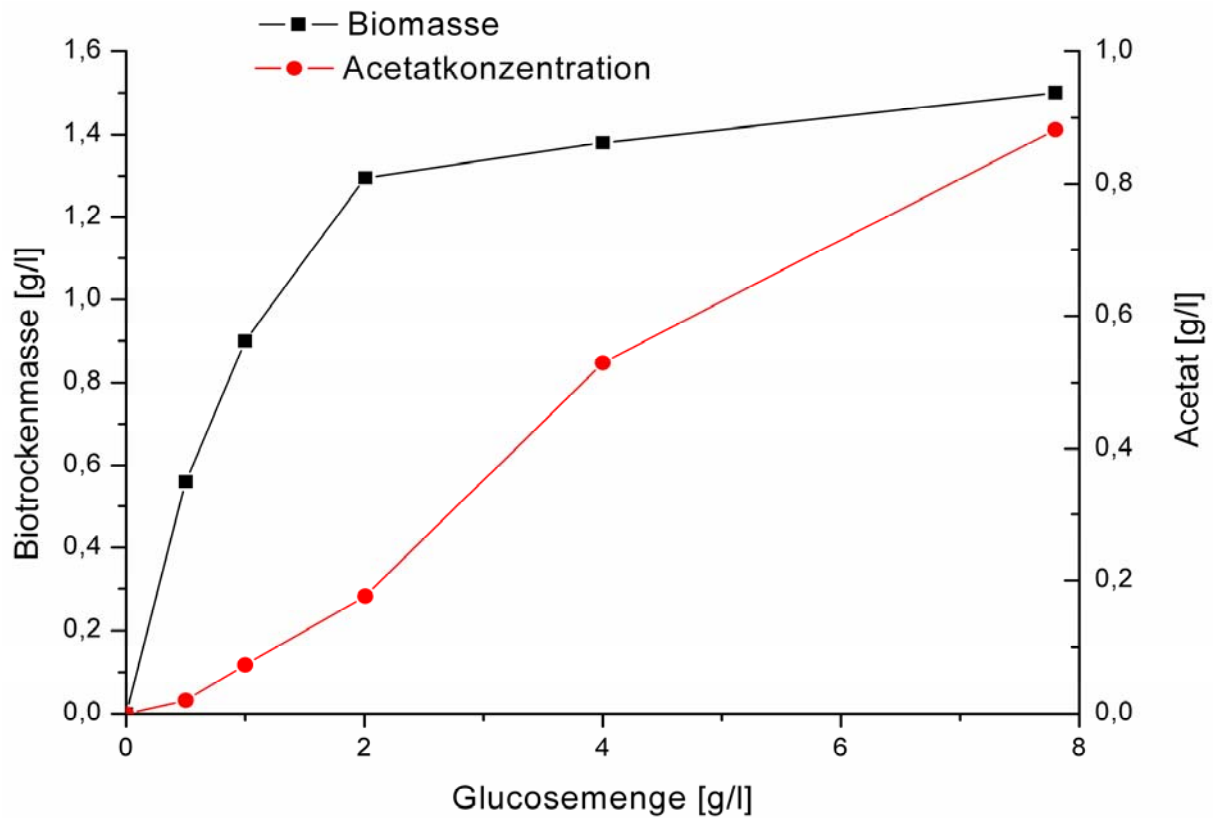


**Abbildung 36:** Wachstumskurve des CAD1-Stammes in einer 200 mL Fermenter-Vorkultur

#### 5.4.3 Einfluss der Glucosemenge auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *S. pombe*

Um während der Fed-Batch-Phase der Fermentation die Bildung von metabolischen Nebenprodukten wie Acetat zu verhindern, wurde die für den Fed-Batch kritische Glucosemenge  $c_{S,krit}$  in Schüttelkolbenversuchen im 200 mL Maßstab bestimmt und die dabei gebildete Menge an Acetat gemessen. In Abbildung 37 sind die maximalen Acetat-Werte dargestellt, die über die gesamte Versuchsdauer gemessen wurden. Die Biotrockenmasse wurde nach Abschluss des Experiments bestimmt.



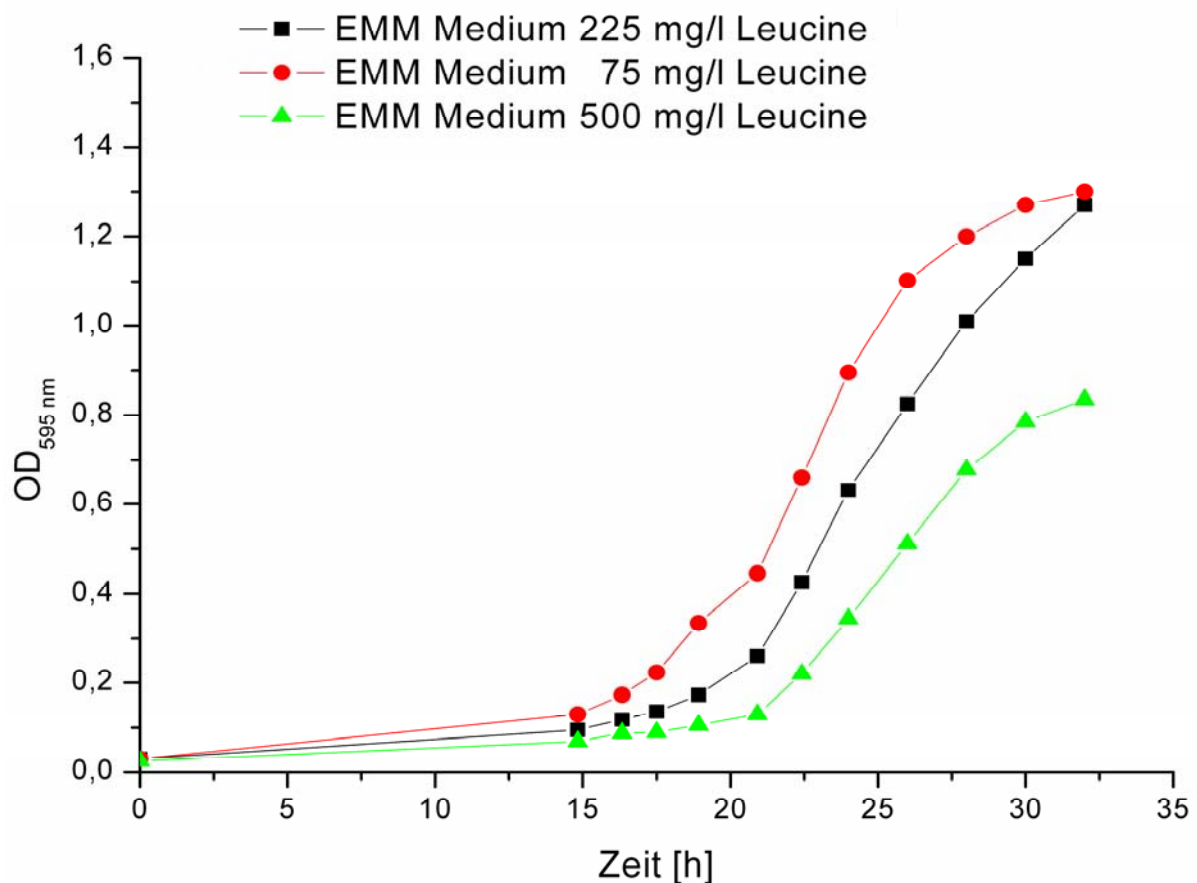


**Abbildung 37:** Bestimmung der kritischen Glucosemenge  $c_{S,krit}$  und der Acetatmenge

Die gemessenen Werte zeigen, dass bereits bei einer Glucosemenge von 1 g/L eine Acetatbildung von 0,1 g/L erfolgt. Bei einer Fed-Batch-Kultivierung muss die Bildung metabolischer Nebenprodukte wie Acetat und Ethanol minimiert werden, da bei längerer Kultivierung eine Anhäufung dieser Produkte toxisch auf die Zellen wirkt. Für die Fed-Batch-Kultivierung wurde deshalb eine Glucosekonzentration von 0,5 g/L verwendet.

#### 5.4.4 Einfluss der Leucinkonzentration auf die Wachstumsgeschwindigkeit des rekombinanten *S. pombe* Stammes CAD1

Um eine maximale Wachstumsrate des Leucin auxotrophen Spalthefermentstammes CAD1 während der verschiedenen Phasen der Fermentation zu gewährleisten, wurde in einem Schüttelkolbenversuch ( $V = 200 \text{ mL}$ ) die vom Stamm benötigte Leucinkonzentration bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass eine Leucinkonzentration über  $225 \text{ mg/L}$  zu einer Hemmung des Wachstums führt. Daher wurde für die Fermentationsversuche eine Leucinkonzentration von  $225 \text{ mg/L}$  verwendet.

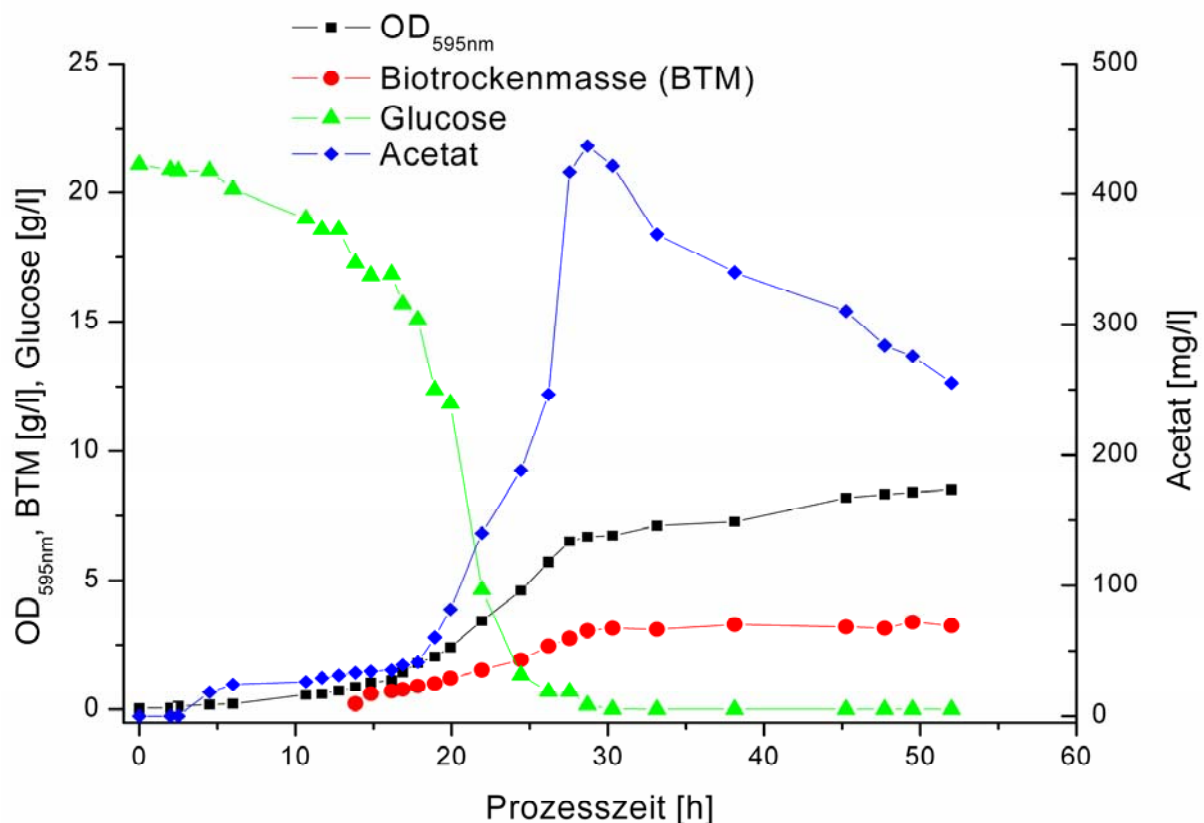


**Abbildung 38:** Bestimmung der optimalen Leucinkonzentration bei Verwendung des Leucin auxotrophen Spalthefermentstammes CAD1

### 5.4.5 5 L-Batch-Fermentation von *S. pombe* CAD1 zur Bestimmung der Biotrockenmasse

Um bei späteren Experimenten das Probenvolumen zu minimieren, wurde eine 5 L-Batch-Fermentation durchgeführt, um das Verhältnis zwischen Optischer Dichte bei 595 nm und der Biotrockenmasse (BTM) von *S. pombe* zu bestimmen. Gleichzeitig wurde die Wachstumsgeschwindigkeit von *S. pombe* CAD1 in der Batch-Phase bei einer Glucosekonzentration von  $c = 20$  g/L sowie die hierbei gebildete Acetatmenge gemessen. Für diese Fermentation wurde EMM-Medium mit einem pH-Wert von 5,5 verwendet wie im Abschnitt 7.1.3 beschrieben. Für die Fermentation wurden folgende Parameter festgelegt:

T: 30°C  
 Drehzahl: 600 Upm  
 Belüftung: 6 L/min  
 pH-Wert: 5,5  
 Glucose: 20 g/L



**Abbildung 39:** 5 L-Batch-Fermentation von *S. pombe* CAD1 zur Bestimmung der Biotrockenmasse und der maximalen Wachstumsrate  $\mu_{max}$ .

Aus den so erhaltenen Daten wurde die maximale Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\max}$  nach (3) zu 0,145 berechnet. Nach einer Prozesszeit von 50 h wurde eine Biotrockenmassemenge von 3,1 g/L gemessen. Bei einer Glucosekonzentration von 20 g/L errechnete sich der Ausbeutekoeffizient  $Y_{X/S}$  zu 0,16. Der Koeffizient  $BTM/OD_{595nm}$  beträgt bei *S. pombe*  $0,436 \pm 0,07$  ( $n = 16$ ). Dieser Koeffizient wurde bei allen weiteren Fermentationen zur Berechnung der Biotrockenmasse aus den gemessenen  $OD_{595nm}$ -Werten verwendet. Die nach 30 h sinkende Acetatkonzentration und die geringere Wachstumsrate von  $\mu = 0,01$  deuten auf eine Diauxie von *S. pombe* hin. In dieser Phase wird das zuvor gebildete Acetat als C-Quelle verwendet.

Die erhaltene Zellmasse von 3,1 g/L und die geringe Wachstumsrate des *S. pombe* Stamm CAD1 zeigten, dass eine Batch-Fermentation für die Biotransformation von 11-Desoxycortisol nicht geeignet ist. Um einen konstanten Anstieg der Biomasse über die gesamte Biotransformation zu gewährleisten, wurde in den weiteren Fermentationen eine Fed-Batch-Strategie mit vorgeschalteter Batch-Phase durchgeführt.

#### 5.4.6 5 L-Fed-Batch-Fermentation von *S. pombe* CAD1

Um die geringe Biomasseproduktion in den Batch-Fermentationen mit *S. pombe* CAD1 zu steigern und dadurch die Umsatzrate zu optimieren, wurden eine Fed-Batch-Fermentation mit vorgeschalteter Batch-Phase verwendet. Die Fermentation wird als Batch-Prozess gestartet und nach Verbrauch der vorhandenen Glucose (Glucose-Startkonzentration 20 g/L) auf einen Fed-Batch-Prozess umgestellt. In dieser Phase wird mit Hilfe des Trace-Monitors die Glucosekonzentration auf einen konstanten Wert eingestellt, unterhalb der kritischen Glucosemenge ( $c_{S,krit}$ ), um die Bildung von Nebenprodukten wie Acetat zu minimieren.

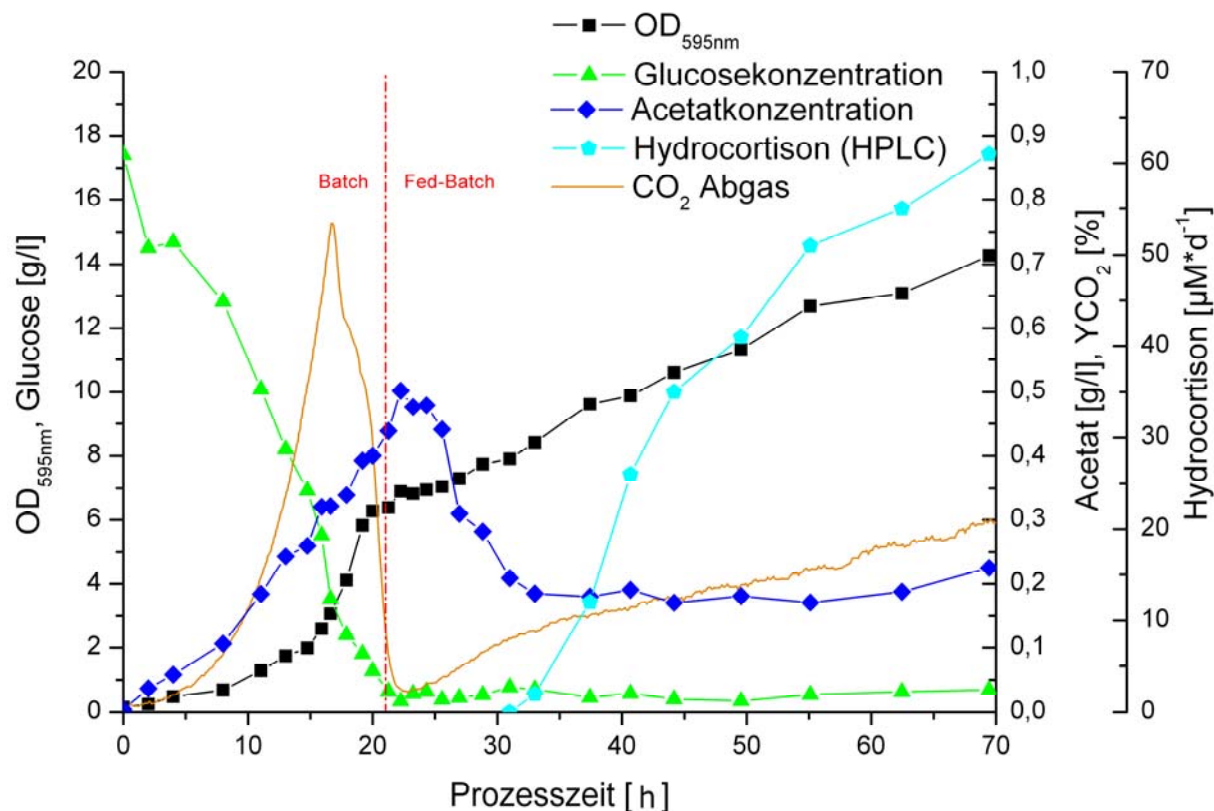
Für die folgenden Fed-Batch-Fermentationen wurde eine Glucosekonzentration von 0,5 g/L gewählt. Die Zufütterung in der Fed-Batch Phase wird durch den Trace-Monitor gesteuert, als Zulauf wurde 5-fach konzentriertes EMM-Medium verwendet, um die Volumenzunahme über die Zeit gering zu halten. Die Rührerdrehzahl wurde ausgehend von 600 Upm dynamisch vom System geregelt, um einen

Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) im Fermenter von mind. 50 % zu gewährleisten. Nach Erreichen einer konstanten Wachstumsgeschwindigkeit in der Fed-Batch-Phase ( $t = 21h$ ) wurde die Biotransformation durch Zugabe von 11-Desoxycortisol (in Ethanol gelöst) mit einer Endkonzentration von 1,0 mM gestartet.

Für die Fermentation wurden folgende Parameter festgelegt:

T:	30°C
Drehzahl:	Start 600 Upm, dynamisch
Belüftung:	6 L/min
pH-Wert:	5,5
Glucose:	Batch: 20 g/L, Fed-Batch: 0,5 g/L
$pO_2$ :	< 50 %
Zulauf Fed-Batch:	5 x EMM-Medium

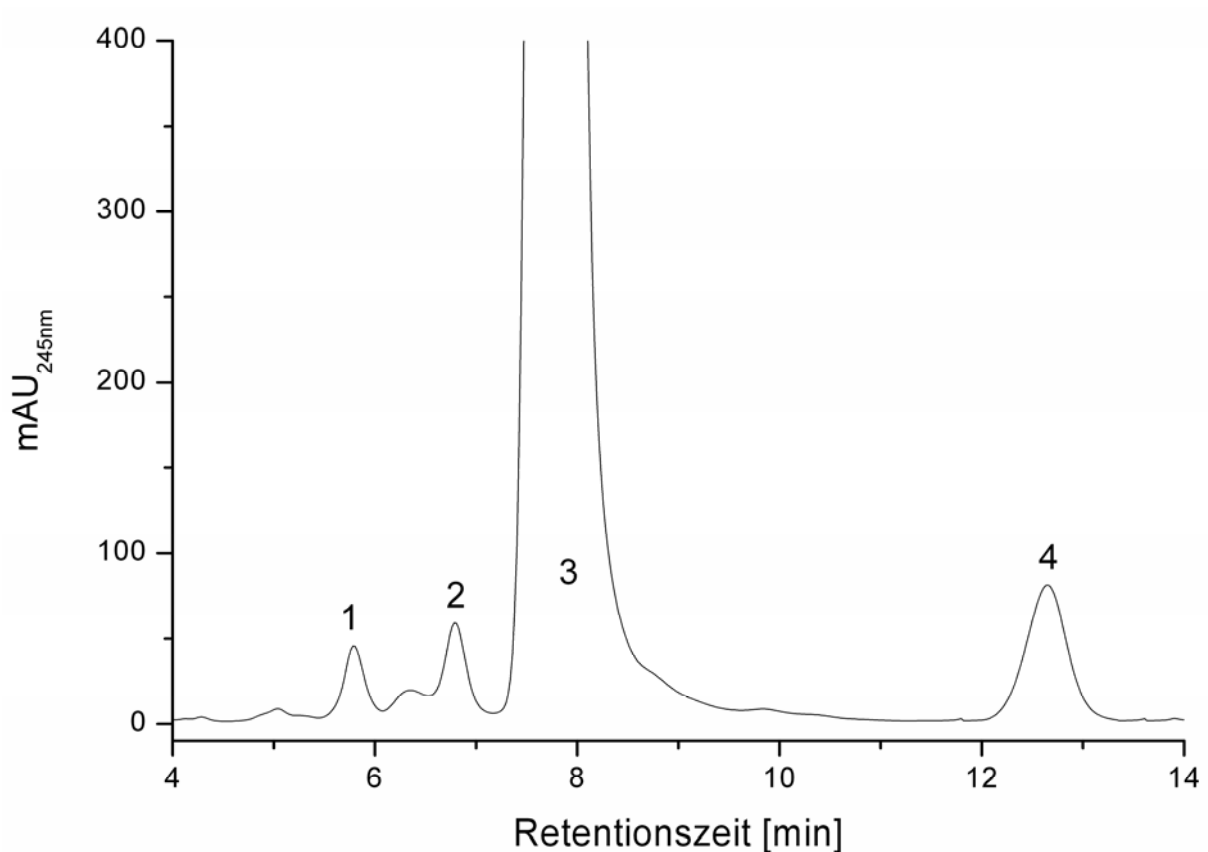
Die maximale Wachstumsgeschwindigkeit in der Batch-Phase der Fermentation betrug  $\mu_{max} = 0,12$ , in der Fed-Batch Phase  $\mu_{max} = 0,012$ . Die Gesamtbiomasse der Fermentation (6,22 g/L) wurde aus den gemessenen OD-Werten berechnet. Der Ausbeutekoeffizient der Fermentation in der Batch Phase errechnete sich zu  $Y_{X/S} = 0,17$ ; in der Fed-Batch-Phase zu  $Y_{X/S} = 0,23$ . Die maximale Umsatzrate von 11-Desoxycortisol zu Hydrocortison wurde mittels HPLC-Analytik auf  $51,3 \mu M \cdot d^{-1}$  berechnet. Die Umsatzrate, bestimmt durch den Fluoreszenz-Assay, während der Fermentation betrug  $56,2 \mu M \cdot d^{-1}$ .



**Abbildung 40:** 5 L-Fed-Batch-Fermentation von *S. pombe* Stamm CAD1 und Biotransformation von 11-Desoxycortisol

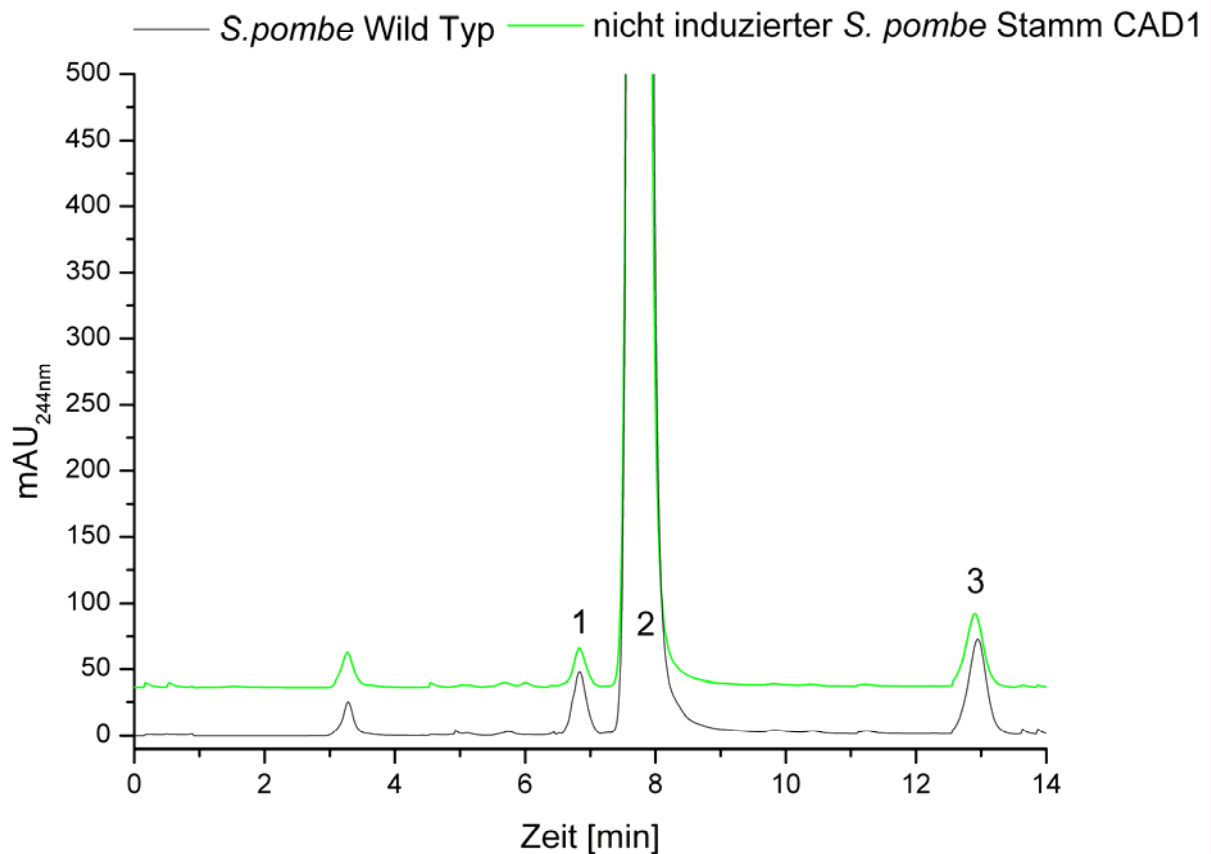
#### 5.4.7 Nebenproduktbildung bei Umsetzung von 11-Desoxycortisol mit *S. pombe* CAD1 – HPLC-Analyse

Die HPLC-Analysen der Proben aus der Fed-Batch-Fermentation mit *S. pombe* CAD1 zeigten neben den Peaks für Hydrocortison und 11-Desoxycortisol noch zwei weitere Substanzen. Beide Komponenten zeigten das typische Hormonspektrum (UV/VIS 200 – 800 nm) mit einem Maximum bei 245 nm. Das HPLC-Chromatogramm einer dieser Proben in Abbildung 41 zeigt deutlich die Peaks der beiden unbekannt Substanzen (im folgenden NP1 und NP2 genannt). Die Retentionszeit von NP2 (**4**) ist mit 12,65 min nahezu identisch mit der von EAS ( $t_R = 12,69$  min). Die Struktur der beiden unbekannt Substanzen wurde mit HPLC/MS aufgeklärt (s. 5.4.9).



**Abbildung 41:** Analyse der Umsetzung von 11-Desoxycortisol mit *S. pombe* CAD1. **1.** Hydrocortison  $t_R$  5,75 min **2.** Nebenprodukt 1 (NP1)  $t_R$  6,78 min **3.** 11-Desoxycortisol (RSS)  $t_R$  7,61 min **4.** Nebenprodukt 2 (NP2)  $t_R$  12,65 min unter Verwendung einer analytischen Säule Nucleosil C18 100 Å 5 µm, Fließgeschwindigkeit 0,5 mL/min

Um zu klären, ob die Nebenprodukte NP1 und NP2 durch die einklonierte CYP11B1-Monooxygenase oder durch indigene Enzyme von *S. pombe* gebildet werden, wurden der *S. pombe* Wild Typ und ein nicht induzierter *S. pombe* CAD1-Stamm im Schüttelkobenmaßstab ( $V = 200$  mL) mit 11-Desoxycortisol inkubiert. Hierfür wurde EMM-Medium ( $c_{\text{Gluc}} = 20$  g/L, pH: 5,5) mit 0,5 mM 11-Desoxycortisol (gelöst in Ethanol) verwendet. Für die Repression des CYP11B1 Gens im *S. pombe* Stamm CAD1 wurde eine Thiamin-Konzentration von 30 µM gewählt. Beide Kolben wurden bei 30°C, 120 Upm, 24 h inkubiert und die Umsetzung mit HPLC verfolgt. Die HPLC-Chromatogramme in Abbildung 42 zeigen, dass beide Nebenprodukte NP1 und NP2 sowohl vom Wild Typ als auch vom rekombinanten CAD1-Stamm produziert werden. Die Bildung von NP1 und NP2 kann daher nicht von der einklonierten CYP11B1-Monooxygenase herrühren; wahrscheinlich sind hierfür indigene Enzyme von *S. pombe* verantwortlich.



**Abbildung 42:** Retentionszeiten von **1.** NP1  $t_R$ : 6,82 min **2.** 11-Desoxycortisol (RSS)  $t_R$ : 7,82 min **3.** NP2  $t_R$ : 12,98 min bei Verwendung einer analytischen Säule Nucleosil C18 100 Å 5 µm, Fließgeschwindigkeit 0,5 mL/min.

#### 5.4.8 30 L-Fed-Batch-Fermentation von *S. pombe* CAD1 – Biotransformation von 11-Desoxycortisol zu Hydrocortison

Die hier dargestellte Fermentation entspricht im wesentlichen der oben beschriebenen 5 L-Fed-Batch-Fermentation (s. 5.4.6). Durch das Upscaling von 5 L auf 30 L sollte eine weitere Steigerung der Umsatzrate und Biomasseproduktion erreicht werden. Auch hier wurde nach Verbrauch der vorhandenen Glucose (ca. 24 h) die zweite Stufe, der Fed-Batch-Prozess gestartet. Hierbei wurde durch Zulauf von fünffach konzentriertem EMM-Medium die Glucosekonzentration während der Fed-Batch-Phase auf 0,5 g/L eingeregelt. Nach Erreichen einer konstanten Wachstumsgeschwindigkeit in der Fed-Batch-Phase der Fermentation ( $t = 62$  h) wurde die Biotransformation durch Zugabe von 11-Desoxycortisol mit einer Endkonzentration von 1,0 mM (gelöst in Ethanol) gestartet. Um ein Absinken der Sauerstoffmenge im Medium (nicht im Diagramm dargestellt) unter 50 % zu

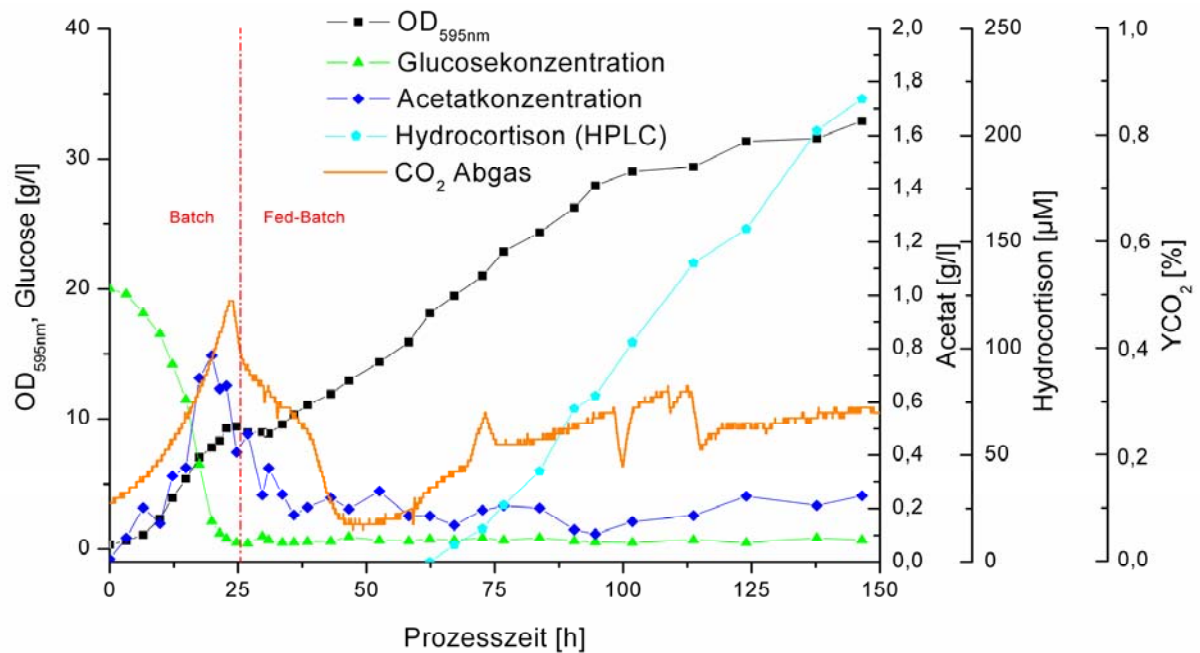


verhindern, wurde auch hier die Rührerdrehzahl dynamisch vom System geregelt. Folgende Parameter wurden für die Fermentation festgesetzt:

T:	30°C
Drehzahl:	Start: 600 Upm, dynamisch
Belüftung:	12,5 L/min
pH-Wert:	5,5
Dauer:	150 h
Glucose:	Batch 20 g/L, Fed-Batch 0,5 g/L
pO <sub>2</sub> :	< 50 %
Zulauf Fed-Batch:	5 x EMM-Medium

Aus den gemessenen OD-Werten wurde für die Batch-Phase der Fermentation die maximale Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\max} = 0,15$  und der Ausbeutekoeffizient  $Y_{X/S} = 0,205$  berechnet. Für die Fed-Batch-Phase ergab sich eine maximale Wachstumsgeschwindigkeit von  $\mu_{\max} = 0,02$ . Der Ausbeutekoeffizient betrug  $Y_{X/S} = 0,25$ . Nach 150 h Fermentationsdauer betrug die Gesamt-Biotrockenmasse 13,24 g/L. Die HPLC-Analyse ergab eine Hydrocortison-Umsatzrate von  $70,6 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$ . Die Messung der Hydrocortison-Konzentration während der Fermentation unter Verwendung des beschriebenen Fluoreszenz-Assays ergab eine Umsatzrate von  $75,8 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$ .

Aus dieser Fermentation wurden die Nebenprodukte NP1 und NP2 extrahiert, durch präparative HPLC aufgereinigt und mit HPLC/MS und NMR analysiert (s. 7.3.1.3 und 7.1.3.5).

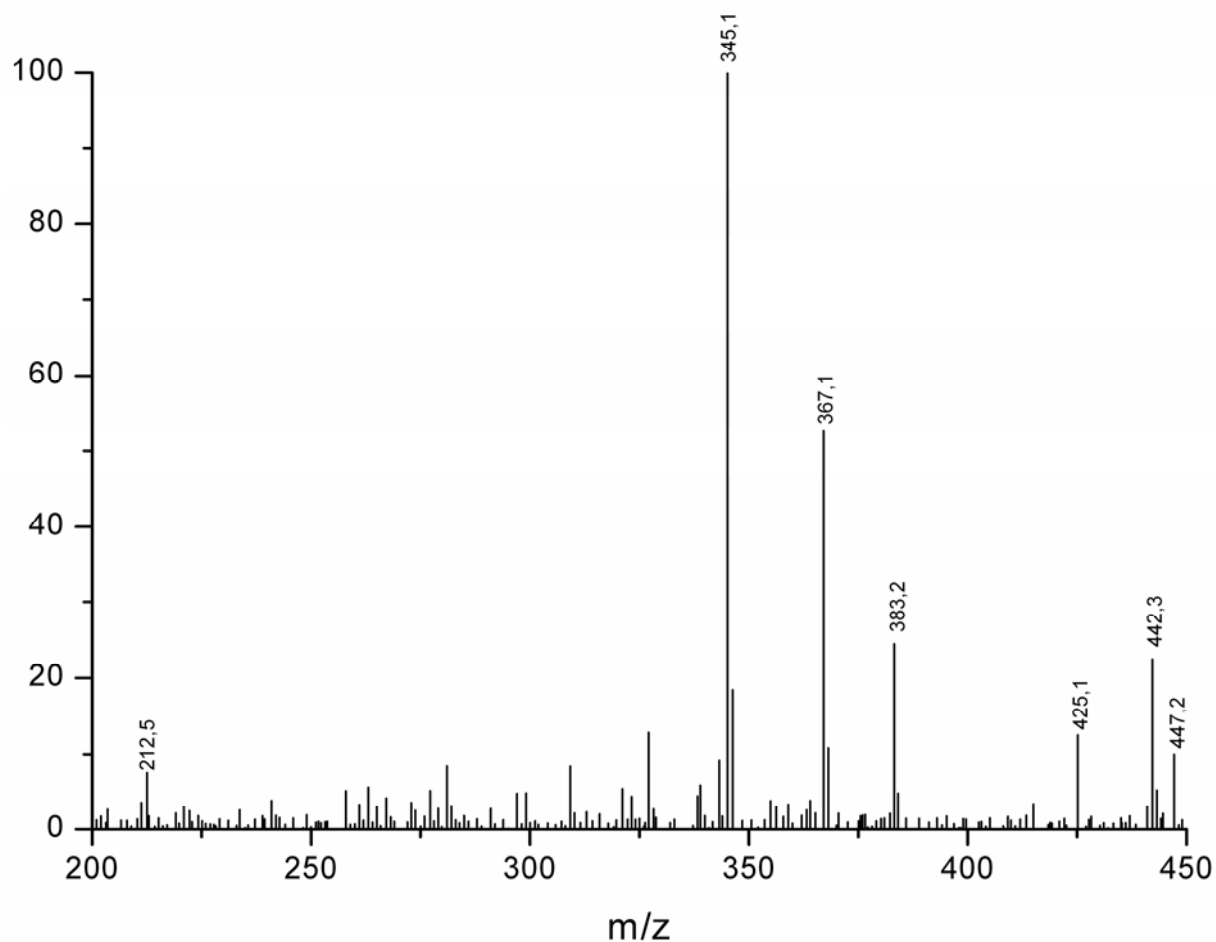


**Abbildung 43:** 30 L-Fed-Batch-Fermentation von *S. pombe* CAD1 und Biotransformation von 11-Desoxycortisol

#### 5.4.9 Struktursicherung der Nebenprodukte NP1 und NP2 durch HPLC/MS-Analyse

Die bei der Umsetzung von 11-Desoxycortisol zu Hydrocortison durch den rekombinanten Spalthefermentstamm CAD1 gebildeten Nebenprodukte NP1 und NP2 wurden auf der ersten Stufe der Strukturaufklärung durch HPLC/MS mit Elektronenspray-Ionisation [(+)-ESI] untersucht. Hierbei wird in der Regel keine Fragmentation beobachtet, so dass die Massenspektren nur die jeweiligen Quasimolekülonen  $MH^+$  und die Addukt-Ionen mit Natrium und Kalium zeigen ( $M + 1/23/39$ ). Die Zuordnung der Molekülonpeaks ist außer durch die Addukt-Ionen  $[M+Na]^+$  und  $[M+K]^+$  durch weitere Cluster-Ionen mit Solvensmolekülen zusätzlich abgesichert.

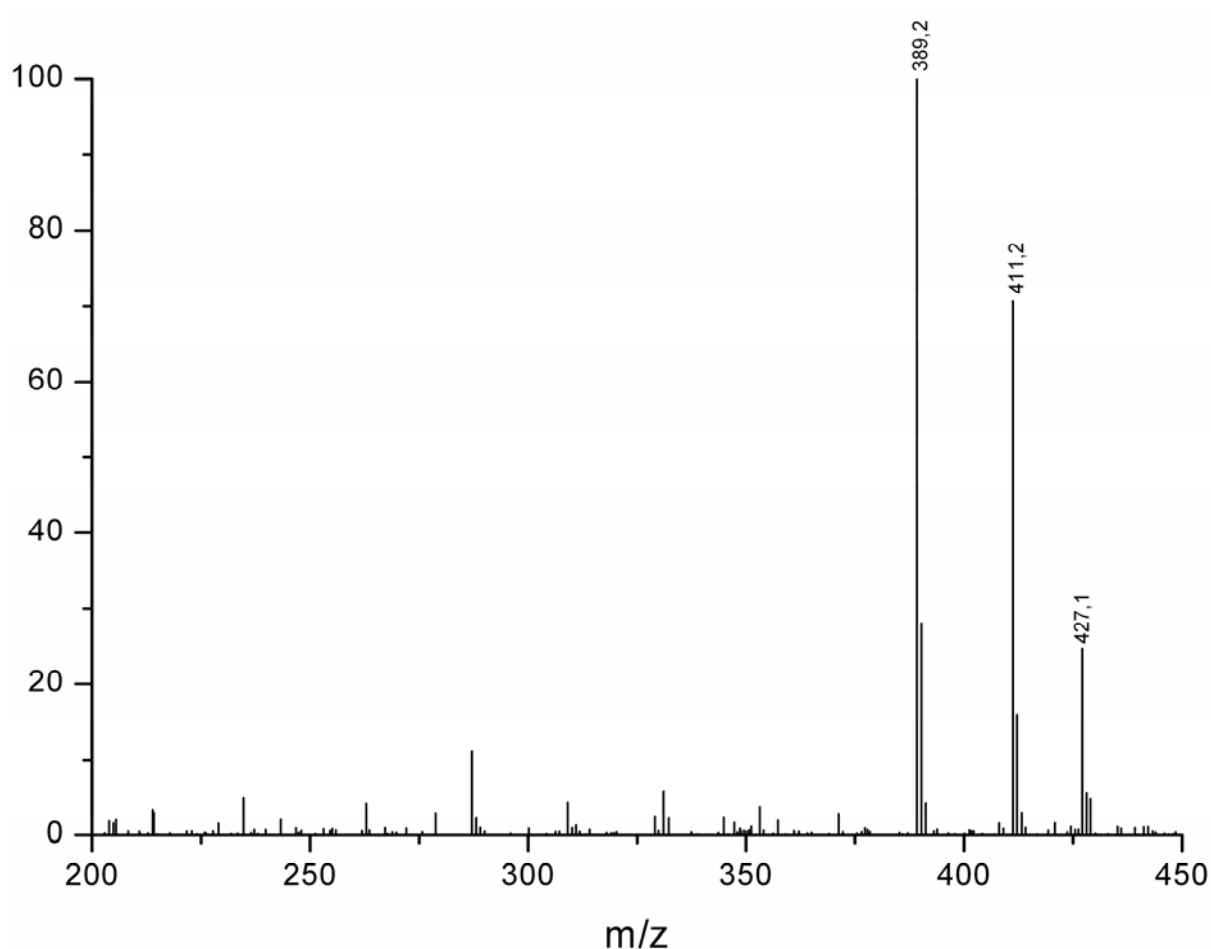
Abbildung 44 bzw. 45 zeigen die (+)-ESI-Massenspektren von NP1 und NP2; die einzelnen Ionen und ihre relative Intensität sind in Tabelle 5 und 6 zusammengestellt. Die Molekülmasse von NP1 wird zu  $m/z = 344$  bestimmt und ist durch die in Tabelle 5 aufgeführten Addukt-Ionen eindeutig verifiziert. Diese Molmasse zeigt, dass NP1 durch Dehydrierung von 11-Desoxycortisol entstanden sein muss.



**Abbildung 44:** Massenspektrum von NP1 mit einer Molekülmasse von m/z 344 Da

Tabelle 5: Molekül- und Addukt- bzw. Clusterionen von NP1

Spezies	m/z	Int. [% base peak]	Anm.
$[M + H]^+$	345,1	100	Quasimolekülion
$[M + Na]^+$	367,1	52	$Na^+$ -Addukt-Ion
$[M + K]^+$	383,2	24	$K^+$ -Addukt-Ion
$[M + K + H_2O + CH_3CN]^+$	442,3	22	
$[M + K + H + CH_3CN]^{++}$	212,5	7	Addukt-Ion doppelt geladen
$[M + H + N_2C_4H_4]^+$	425,1	12	
$[M + Na + N_2C_4H_4]^+$	447,2	10	



**Abbildung 45:** Massenspektrum von NP2 mit einer Molekülmasse von  $M = 388$  Da

Tabelle 6: Massentabelle für NP2 Massenspektrum

Spezies	m/z	Int. [% base peak]	Int. [% $^{13}\text{C}$ -Isotopenpeak]
$[\text{M} + \text{H}]^+$	389,2	100	28
$[\text{M} + \text{Na}]^+$	411,2	70	22
$[\text{M} + \text{K}]^+$	427,1	24	22

Die Molekülmasse von NP2 wird zu  $m/z = 388,2$  bestimmt und ist gleichfalls durch die entsprechenden  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Addukt-Ionen abgesichert (siehe Tabelle 6). Die Molmasse  $m/z = 388,2$  legt die Acetylierung einer der Hydroxy-Gruppen in Position 17 bzw. 21 nahe. NP2 und 11-Desoxycortisol-21-acetat (EAS) zeigen identische Retentionszeiten in der analytischen HPLC, die Identität wird durch Aufstocken mit authentischem EAS verifiziert.

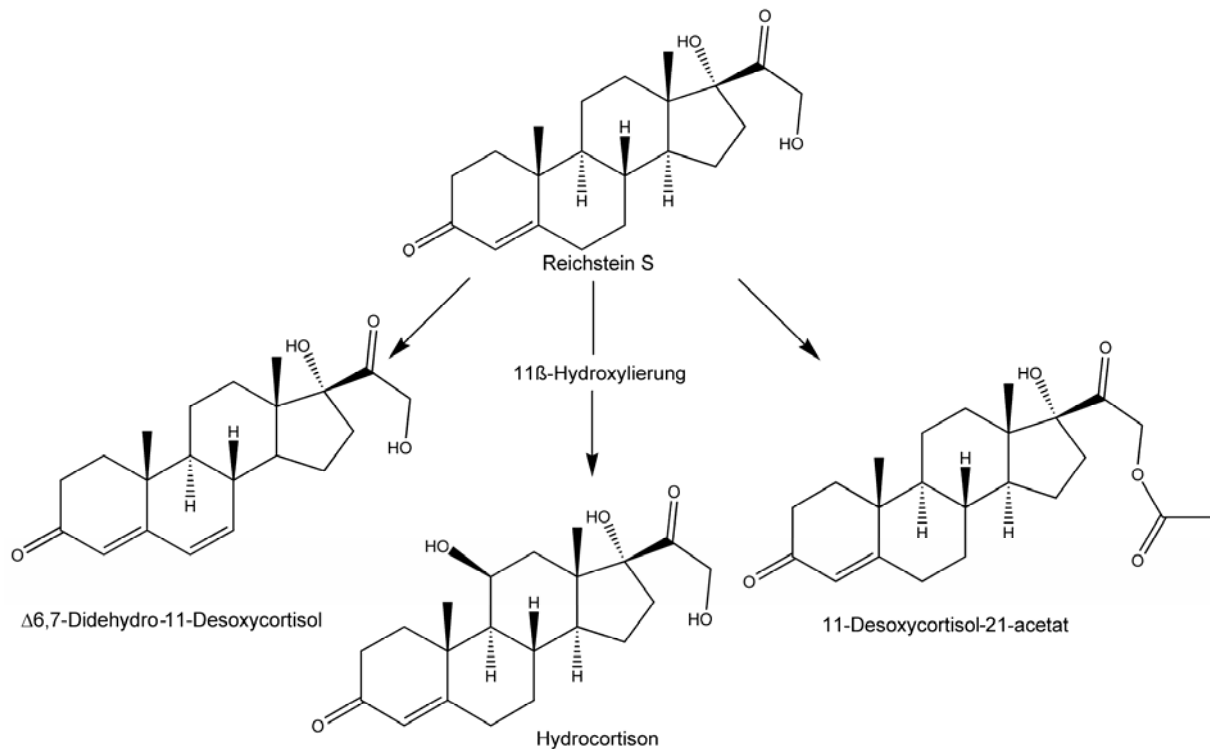
#### 5.4.10 Strukturaufklärung der Nebenprodukte NP1 und NP2 durch $^1\text{H-NMR}$

Die Festlegung der Position der Acetoxy-Gruppe bei NP2 (11 bzw 21) und die der zusätzlichen Doppelbindung im NP1 erfordert eine detaillierte  $^1\text{H-NMR}$ -Analyse.

Das 500 MHz  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von NP1 zeigt neben den Signalen für den Steroidkörper zwischen 0,95 und 2,65 ppm das charakteristische AB-Spektrum für die geminalen Methylenprotonen an C-21; chemische Verschiebung und Geminalkopplung sind identisch mit den Werten für 11-Desoxycortisol. Das olefinische H-Atom an C-4 ist gegenüber dem Substrat um 0,3 ppm zu tieferem Feld verschoben (6,083 ppm). Daneben erscheint ein zusätzliches Paar olefinischer Protonen bei 6,244 ppm und 7,042 ppm, das durch eine olefinische *cis*-Kopplung von 10,15 Hz miteinander verknüpft ist; dieser Wert ist charakteristisch für Cyclohexen-Struktur. Die extreme Tieffeldverschiebung des einen dieser beiden Protonen zeigt klar die Konjugation dieser Doppelbindung mit dem Enon-System im A-Ring und sichert so eindeutig die  $\Delta 6,7$ -Struktur für NP1.

Das NMR-Spektrum von NP2 zeigt ein gegenüber 11-Desoxycortisol hinsichtlich chemischer Verschiebung und Kopplungsfeinstruktur unverändertes Signal für das olefinische 4-H. Das AB-Spektrum für die beiden Methylenprotonen an C-21 dagegen ist um 0,35 ppm zu tieferem Feld verschoben, wie es für die  $\alpha$ -Protonen eines Alkohols bei einer Veresterung zu erwarten ist. Auch der Betrag für die Geminalkopplung erscheint um 2,5 Hz reduziert (17,45 gegenüber 19,85 Hz). Damit ist die Position der Acetoxy-Gruppe an C-21 eindeutig gesichert.

Die durch die detaillierte  $^1\text{H-NMR}$ -Analyse charakterisierten Strukturen von NP1 und NP2 sind in Abbildung 46 dargestellt.

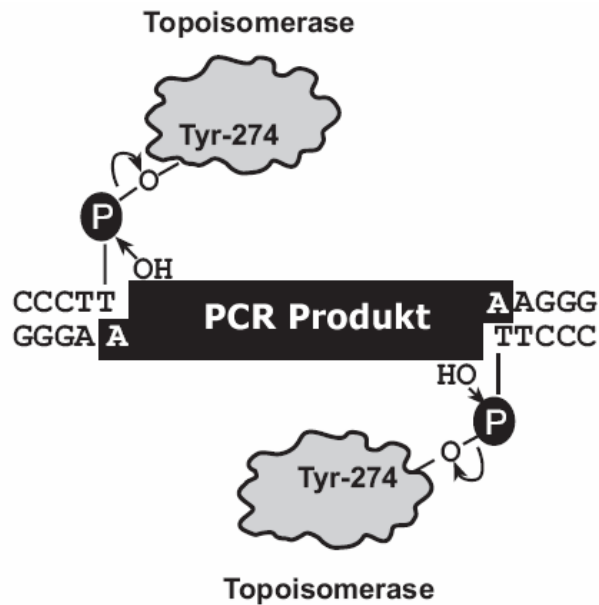


**Abbildung 46:** Struktur der bei der Umsetzung von 11-Desoxycortisol mit *S. pombe* charakterisierten Nebenprodukten NP1 und NP2.

## 5.5 Fermentationsoptimierung des rekombinanten *S. pombe* Stamms CAD13

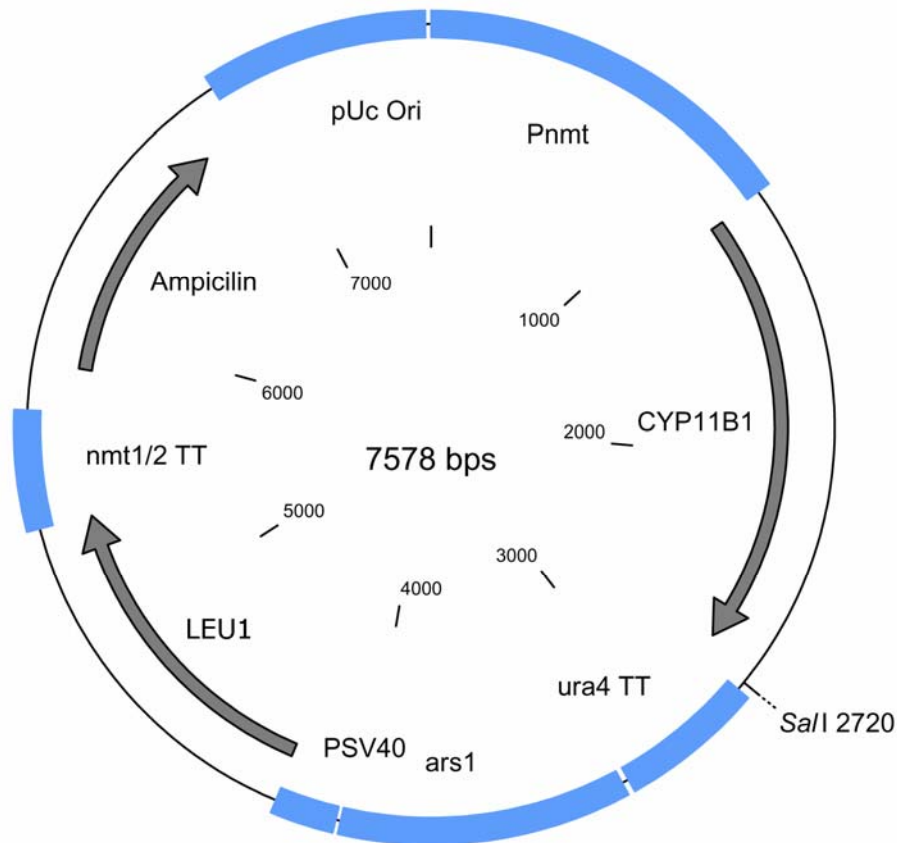
Um die Bildungsrate von Hydrocortison weiter zu steigern, wurde dem CAD1-Stamm mit einer chromosomal integrierten humanen CYP11B1-Monooxygenase (Abbildung 35) ein weiteres Plasmid mit einer zweiten Kopie des CYP11B1 Gens einkloniert. Dieses Plasmid besitzt eine autosomal replizierende Sequenz (*ars1*) und integriert nicht in das Genom von *S. pombe*. Hierfür wurde der *pnmt1*-TOPO Vektor von Invitrogen verwendet. Auch hier steht die humane CYP11B1-Monooxygenase unter der Kontrolle eines *nmt*-Promotors. Der Vektor besitzt außerdem das *LEU1*-Gen, welches dem vorher Leucin-auxotrophen CAD1-Stamm die Synthese von Leucin wieder ermöglicht. Dadurch vereinfacht sich auch die Durchführung der weiteren Fermentationen, da keine ständige Zugabe von Leucin mehr notwendig ist. Die

Insertion des CYP11B1-Gens erfolgte über das Prinzip T/A-Klonierung. Hierbei werden die durch die Taq-Polymerase am PCR Produkt erzeugten Desoxyadenosin Nukleotiden mit den Desoxythymidin Nukleotiden an den 3' Enden des Vektors fusioniert (siehe Abbildung 47).



**Abbildung 47:** Prinzip der TOPO-Klonierung

Der so entstandene Vektor ist in Abbildung 48 dargestellt. Der rekombinante *S. pombe* Stamm CAD13 trägt somit zwei Kopien des humanen CYP11B1-Gens, was zu einer erhöhten Expression und somit zu einer erhöhten Bildungsrate von Hydrocortison führen sollte. In den nachfolgenden Experimenten zur Fermentationsoptimierung wurde ausschließlich der *S. pombe* Stamm CAD13 eingesetzt.



**Abbildung 48:** pnmt1-TOPO Vektor mit CYP11B1-Monooxygenase

Wie oben gezeigt, ist die humane CYP11B1-Monooxygenase nicht für die Bildung der Nebenprodukte NP1 und NP2 verantwortlich. Auch der Stamm *S. pombe* CAD13 zeigt diese Nebenproduktbildung, wie Vorexperimente ergaben. Daher sind mit hoher Wahrscheinlichkeit indigene Enzyme von *S. pombe* für die Produktion dieser Nebenprodukte verantwortlich, so dass eine Unterdrückung ihrer Bildung durch Fermentationsoptimierung prinzipiell nicht möglich ist.

In den folgenden Experimenten wurde deshalb versucht, durch Optimierung der Fermentationsparameter eine erhöhte Bildungsrate von Hydrocortison zu erreichen.

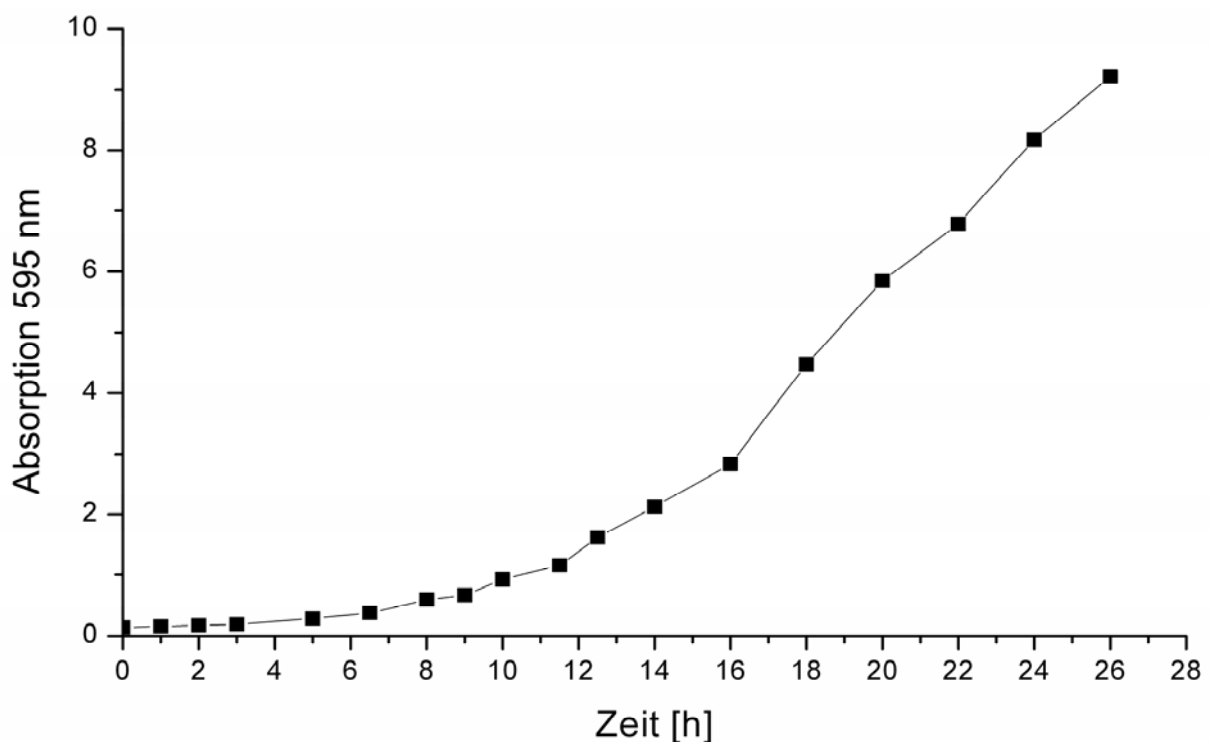
### 5.5.1 Inkubationsdauer der Vorkultur bei Verwendung von *S. pombe* CAD13

Durch die zusätzliche Insertion des in Abbildung 47 dargestellten Vektors pnmt1 werden im *S. pombe* Stamm CAD13 insgesamt zwei Kopien des CYP11B1-Gens exprimiert. Da beide CYP11B1-Gene konstitutiv exprimiert werden, ist mit einer, im



Vergleich zum *S. pombe* Stamm CAD1 niedrigeren Wachstumsgeschwindigkeit zu rechnen. Aus diesem Grund wurde die optimale Inkubationsdauer der Fermenter-Vorkultur ( $V = 200 \text{ mL}$ ) des CAD13-Stammes neu bestimmt.

Hierfür wurden mehrere 1 L Schüttelkolben mit 200 mL EMM-Medium mit 20 mL Über-Nacht-Kultur beimpft. Die Inkubation erfolgte bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  und 120 Upm. Das Probenintervall betrug 1 h. Die in Abbildung 49 dargestellte Wachstumskurve zeigt, dass sich die Spalthefezellen nach einer Inkubationsdauer von 20 h in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Somit wurde die Inkubationsdauer der Vorkultur auf mindestens 18 h und höchstens 22 h festgelegt. Die maximale Wachstumsgeschwindigkeit in der Vorkultur beträgt  $\mu_{\text{max}} = 0,05$ . Der CAD13-Stamm zeigt somit nur noch die halbe Wachstumsgeschwindigkeit des CAD1-Stamms, was wie erwähnt auf die zusätzliche Kopie des CYP11B1-Gens zurückzuführen ist.



**Abbildung 49:** Wachstumskurve des CAD13-Stammes in einer 200 mL Vorkultur

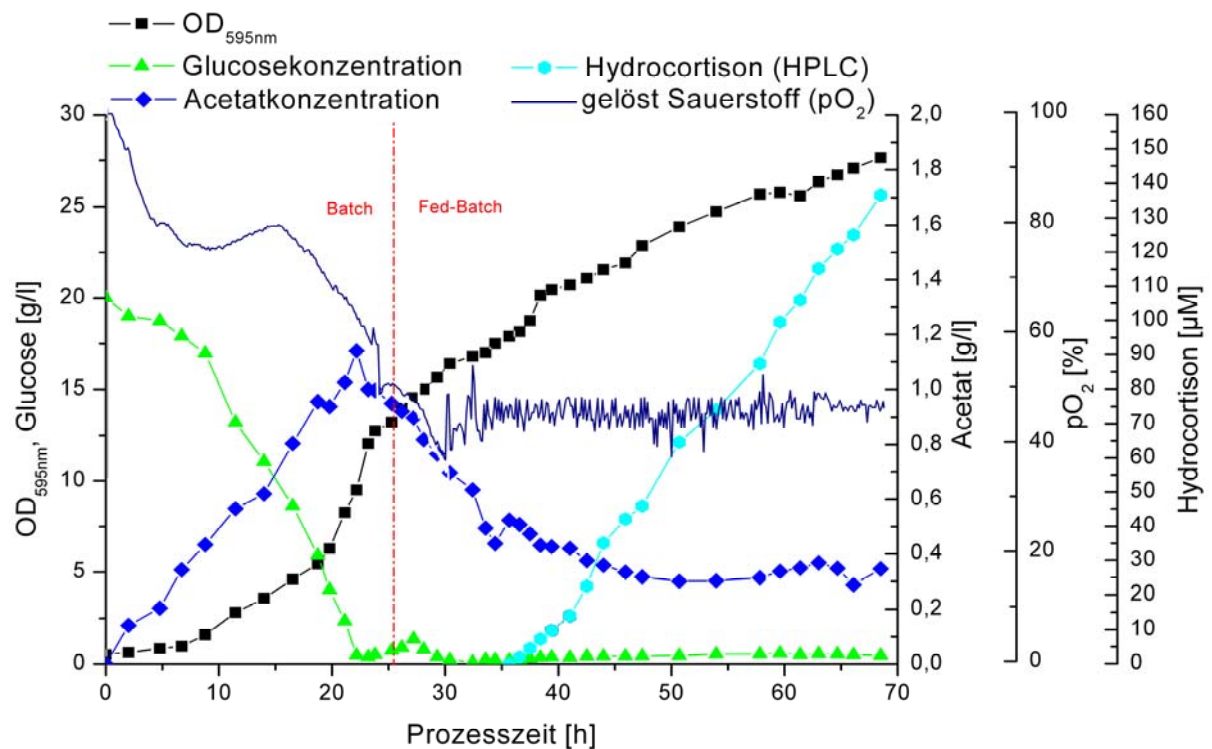
### 5.5.2 30 L-Fed-Batch-Fermentation mit *S. pombe* CAD13

Um die Umsatzraten der beiden rekombinanten *S. pombe* Stämme CAD1 und CAD13 zu vergleichen, wurde eine Fed-Batch-Fermentation im Maßstab 30 L unter Verwendung der Parameter aus der unter 5.4.8. beschriebenen Fed-Batch-Fermentation mit CAD1 durchgeführt. Auch hier wurde nach Verbrauch der vorhandenen Glucose (ca. 24 h) der Fed-Batch-Prozess gestartet. Der Zulauf von fünffach konzentriertem EMM-Medium wurde wie zuvor so eingestellt, dass die Glucosekonzentration während der Fed-Batch-Phase 0,5 g/L nicht übersteigt. Nach Erreichen einer konstanten Wachstumsgeschwindigkeit in der Fed-Batch-Phase der Fermentation ( $t = 35$  h) wurde die Biotransformation durch Zugabe von 11-Desoxycortisol mit einer Endkonzentration von 1,0 mM (gelöst in Ethanol) gestartet. Um ein Absinken der gelösten Sauerstoffmenge unter 50 % zu verhindern wurde auch hier die Rührerdrehzahl dynamisch vom System geregelt.

Folgende Parameter wurden für die Fermentation festgesetzt:

T:	30°C
Drehzahl:	Start: 600 Upm, dynamisch
Belüftung:	12,5 L/min
pH-Wert:	5,5
Dauer:	70 h
Glucose:	Batch 20 g/L, Fed-Batch 0,5 g/L
pO <sub>2</sub> :	< 50 %
Zulauf Fed-Batch:	5 x EMM-Medium

Aus den gemessenen OD-Werten wurde für die Batch-Phase der Fermentation die maximale Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\max} = 0,06$  und der Ausbeutekoeffizient  $Y_{X/S} = 0,262$  berechnet. Für die Fed-Batch-Phase ergab sich eine maximale Wachstumsgeschwindigkeit von  $\mu_{\max} = 0,016$ . Der Ausbeutekoeffizient betrug  $Y_{X/S} = 0,38$ . Durch HPLC-Analyse wurde die maximale Umsatzrate bezüglich Hydrocortison auf  $91,5 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  bestimmt. Die Messung der Hydrocortison-Konzentration während der Fermentation unter Verwendung des beschriebenen Fluoreszenz-Assays ergab eine Umsatzrate von  $99,8 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$ .



**Abbildung 50:** 30 L-Fed-Batch-Fermentation von *S. pombe* CAD13 und Biotransformation von 11-Desoxycortisol

### 5.5.3 30 L-Fed-Batch-Fermentation mit *S. pombe* CAD13 – Variation der Glucosekonzentration

Um den Einfluss der Glucosekonzentration auf die Umsatzrate von Hydrocortison zu untersuchen, wurde eine Fed-Batch-Fermentation ohne vorgeschaltete Batch-Phase durchgeführt, bei welcher die Glucosekonzentration über drei Stufen von 5 g/L über 10 g/L auf 20 g/L erhöht wurde. Die Zugabe an 11-Desoxycortisol erfolgte hierbei direkt zu Beginn der Fermentation ( $t = 0$ ) mit einer Endkonzentration von 1,0 mM (gelöst in Ethanol). Bei einer Glucosekonzentration von 20 g/L wurde zudem bei 65 h die Sauerstoffkonzentration im Medium von ca. 50 % auf 10 % erniedrigt, um den Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Umsatzrate zu untersuchen.

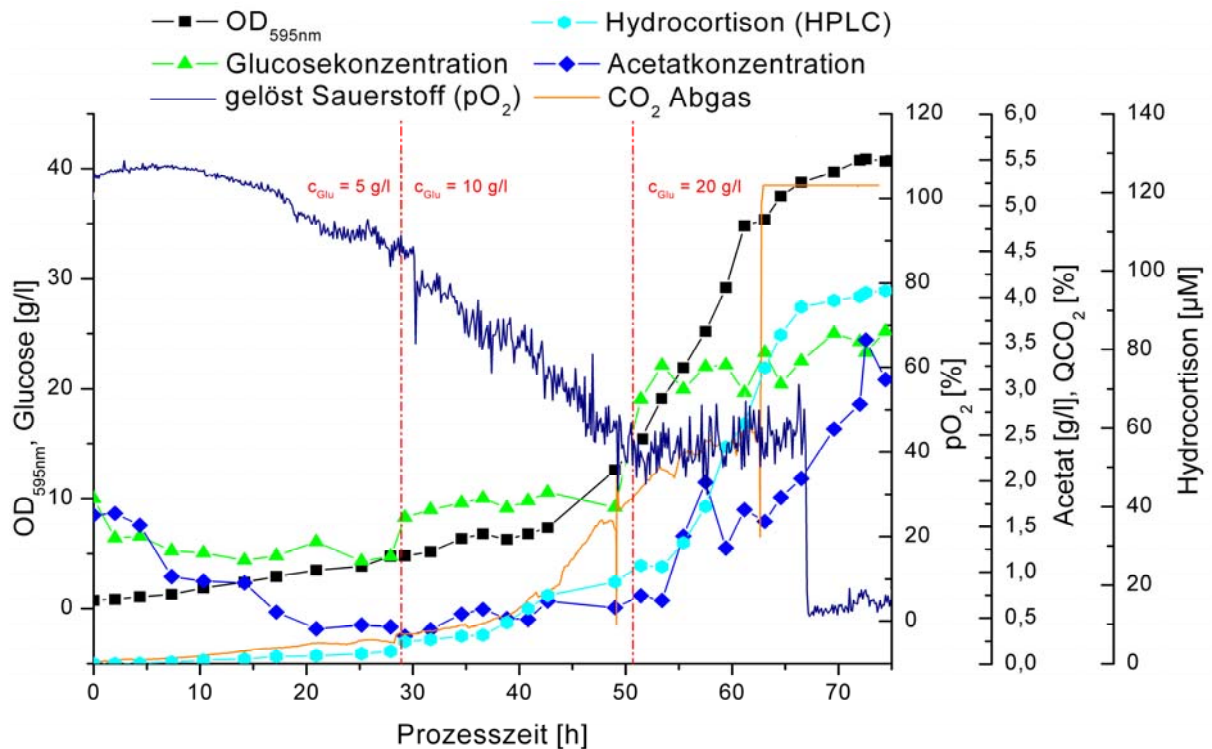
Um die verschiedenen Glucosekonzentrationen einzustellen, wurden bei dieser Fermentation zwei unterschiedliche Zuläufe verwendet: zum einen eine zehnfach konzentrierte Glucose-Lösung (200 g/L) gemeinsam mit den EMM-Hauptsalzen, zum anderen nur eine zehnfach konzentrierte EMM-Salz-Lösung. Hierbei wurde die Zulaufgeschwindigkeit der EMM-Salz-Lösung auf 50 % der Zulaufgeschwindigkeit

der Glucose-Lösung eingestellt, um ein Anreichern der Salze zu verhindern. Nach jeweils 10 OD-Einheiten wurde durch ein Septum im Fermenter die Ausgangsmenge an EMM-Mineral- und EMM-Vitamin-Lösung zugegeben. Um ein Absinken der gelösten Sauerstoffmenge zu Beginn der Fermentation unter 50 % zu verhindern, wurde die Rührerdrehzahl dynamisch vom System geregelt.

Folgende Parameter wurden für die Fermentation festgesetzt:

T:	30°C
Drehzahl:	Start: 600 Upm, dynamisch
Belüftung:	12,5 L/min
pH-Wert:	5,5
Dauer:	75 h
Glucose:	Fed-Batch 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L
pO <sub>2</sub> :	< 50 %
Zulauf Fed-Batch:	10 x Glucose + Hauptsalze, 10 x EMM Salz

Aus den gemessenen OD-Werten wurde eine maximale Wachstumsgeschwindigkeit von  $\mu_{\max} = 0,14$  bei einer Glucosekonzentration von 20 g/L berechnet. Die Wachstumsgeschwindigkeit bei 5 g/L bzw., 10 g/L Glucose betrug  $\mu_{\max} = 0,04$  bzw.  $\mu_{\max} = 0,06$ . Durch HPLC-Analyse wurde die maximale Umsatzrate bezüglich Hydrocortison auf  $144,33 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  bestimmt (bei einer Glucosekonzentration von 20 g/L). Die Messung der Hydrocortison-Konzentration während der Fermentation unter Verwendung des beschriebenen Fluoreszenz-Assays ergab eine Umsatzrate von  $153,25 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$ . Berechnet über alle 3 Glucosestufen betrug der Ausbeutekoeffizient  $Y_{X/S} = 0,26$ .



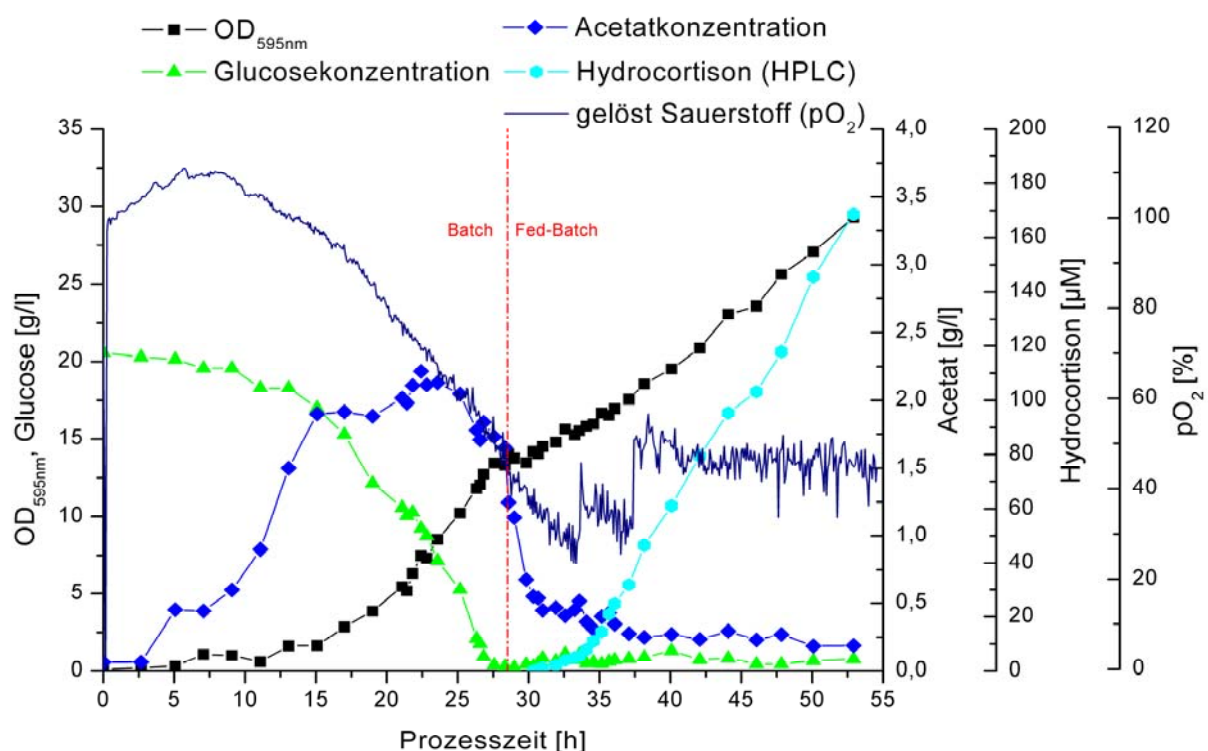
**Abbildung 51:** 30 L-Fed-Batch-Fermentation mit *S. pombe* CAD13 unter Variation der Glucosekonzentration

#### 5.5.4 30 L-Fed-Batch-Fermentation mit *S. pombe* CAD13 und Fiechter-Medium

Die beschriebenen Fermentationsversuche haben gezeigt, dass eine Glucosekonzentration von 0,5 g/L in der Fed-Batch-Phase der Fermentation ein kontinuierliches Wachstum ermöglicht, wobei auch nur geringe Mengen an Acetat gebildet wurden. Um eine erhöhte Wachstumsrate des CAD13-Stamms und somit auch eine erhöhte Bildungsrate an Hydrocortison zu erreichen, wurde für die weiteren Fermentationen das in 7.1.3 beschriebene Fiechter-Medium verwendet. Dieses im Vergleich zum EMM-Medium reichhaltigere und komplexere Medium führte zu einer Erhöhung der Wachstums- und der Hydrocortison-Bildungsrate. Auch hier wurden, um eine Anhäufung der Salze und Spurenelemente zu verhindern, zwei Zuläufe verwendet: zehnfach Glucose und zehnfach Fiechter-Medium ohne Glucose. Die Zugabe von 11-Desoxycortisol (Endkonzentration 1,0 mM) erfolgt zu Beginn der Fed-Batch-Phase ( $t = 30$  min). Um ein Absinken der gelösten Sauerstoffmenge unter 50 % zu verhindern, wurde die Rührerdrehzahl dynamisch vom System geregelt.

Folgende Parameter wurden für die Fermentation festgesetzt:

T: 30°C  
 Drehzahl: Start: 600 Upm, dynamisch  
 Belüftung: 12,5 L/min  
 pH-Wert: 5,5  
 Dauer: 55 h  
 Glucose: Batch 20 g/L, Fed-Batch 0,5 g/L  
 pO<sub>2</sub>: < 50 %  
 Zulauf Fed-Batch: 10 x Glucose, 10 x Fiechter-Medium (ohne Glucose)



**Abbildung 52:** 30 L-Fed-Batch-Fermentation mit *S. pombe* CAD13 mit Fiechter-Medium

Aus den gemessenen OD-Werten wurde eine maximale Wachstumsgeschwindigkeit von  $\mu_{\max} = 0,203$  im Batch- und  $\mu_{\max} = 0,017$  im Fed-Batch berechnet. Durch HPLC-Analyse wurde die maximale Umsatzrate bezüglich Hydrocortison auf  $168,5 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  bestimmt. Die Messung der Hydrocortison Konzentration während der Fermentation unter Verwendung des beschriebenen Fluoreszenz-Assays, ergab eine Umsatzrate von  $186,8 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$ . Der Ausbeutekoeffizient in der Batch Phase betrug  $Y_{X/S} = 0,32$  in der Fed-Batch Phase = 0,68

### 5.5.5 Umsetzung von MAS mit *S. pombe* CAD13

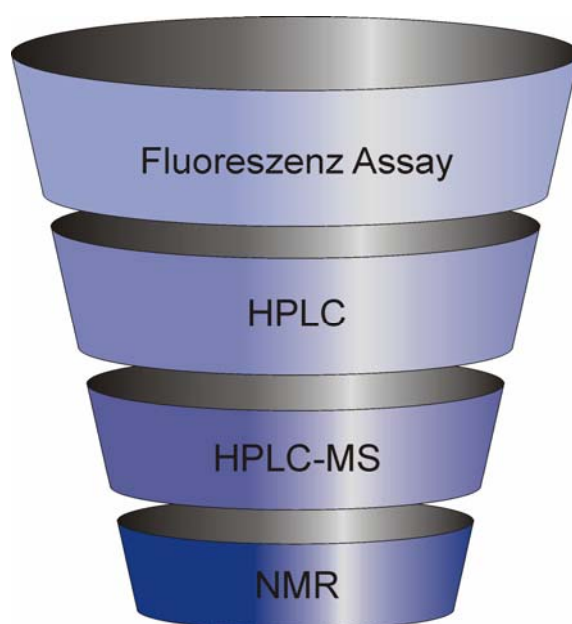
Wie schon in Abschnitt 3.2.6 erwähnt, werden bei Schering für die Umsetzung von 11-Desoxycortisol zu Hydrocortison durch *C. lunata* acetylierte 11-Desoxycortisol-Derivate verwendet, um die Nebenproduktbildung zu unterdrücken. Da eine Prozessumstellung auf nicht acetyliertes 11-Desoxycortisol mit erheblichen Kosten verbunden wäre, wurde untersucht, ob die rekombinanten Spalthefestämme CAD1 und CAD13 auch 11-Desoxycortisol-17-acetat als Substrat akzeptieren. Wie in Abschnitt 5.1.3 gezeigt, ist eine Quantifizierung des gebildeten Hydrocortison-17-acetat sowohl mit dem neu entwickelten Fluoreszenz-Assay als auch mit HPLC Analyse möglich. Ob auch 11-Desoxycortisol-21-acetat als Substrat akzeptiert wird, konnte nicht geprüft werden, da das verfügbare Material stark mit 11-Desoxycortisol und 11-Desoxycortisol-17-acetat verunreinigt war.

Um zu testen, ob die in *S. pombe* einklonierte humane CYP11B1-Monooxygenase MAS als Substrat akzeptiert, wurden zunächst Schüttelkolben-Experimente im Maßstab bis 200 mL durchgeführt. Für alle Versuche wurde EMM-Medium mit einem pH-Wert von 5,5 eingesetzt. MAS wurde wie 11-Desoxycortisol in Ethanol gelöst und nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben. Die Analyse der Proben durch den Fluoreszenz-Assay wie auch durch HPLC zeigte keinerlei Umsatz von MAS zu MAF. Andererseits führte der etwas niedrigere pH-Wert zu einer geringfügigen Hydrolyse von MAS zu 11-Desoxycortisol, das dann mit einer entsprechend minimalen Hydrocortison-Bildungsrate von  $20 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  für CAD1 und  $24 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  für CAD13 umgesetzt wird.

Weitere Versuche zeigten klar, dass MAS von der humanen Monooxygenase CYP11B1 nicht als Substrat akzeptiert wird. Da nur genetische Modifikationen der CYP11B1-Monooxygenase eine Verwendbarkeit von MAS als Substrat ermöglichen könnten, wurden keine weiteren Fermentationen mit MAS als Substrat und den verfügbaren rekombinanten Spalthefestämmen durchgeführt.

## 5.6 Screening verschiedener Mikroorganismen auf 11-Hydroxylase-Aktivität mit Fluoreszenz-Assay

Mit dem in Abschnitt 5.1.3 entwickelten Fluoreszenz-Assay zum Nachweis von Hydrocortison sollte gezeigt werden, dass dieser Assay auch als Screening-System auf 11-Hydroxylase-Aktivität verwendet werden kann. Hierzu wurden die am Institut für Technische Biochemie vorhandenen Stämme verschiedener Mikroorganismen mit Hilfe des Assay durchmustert. Für das Screening wurde 11-Desoxycortisol als Substrat verwendet. Bei Stämmen, bei denen die Proben Fluoreszenz zeigten, wurden die Umsetzungen mit HPLC bzw. HPLC/MS eingehender untersucht. Der Fluoreszenz-Assay stellt somit die erste Stufe eines *Screening Funnel* dar (s. Abbildung 53), der es erlaubt, durch verschiedene aufeinander folgende Screening-Tests eine möglichst hohe Zahl an positiven Stämmen aufzufinden und zugleich möglichst wenige falsch-positive Stämme zum letztendlichen Durchmusterungsschritt durchzuschleppen.



**Abbildung 53:** Schematische Darstellung eines *Screening Funnel* mit den verwendeten Methoden zum Screening auf 11-Hydroxylase-Aktivität.



Folgende Stämme wurden für das Screening verwendet:

Tabelle 7: Liste der für das Screening verwendeten Stämme

Stamm	DMSZ Nummer	Abkürzung
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> CAD13	-	<i>S. pombe</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	3365	<i>A. nidulans</i>
<i>Curvularia lunata</i>	63137	<i>C. lunata</i>
<i>Thermus thermophilus</i>	46338	<i>T. thermophilus</i>
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	50332	<i>P. citronellolis</i>
<i>Pseudomonas fluoreszenz</i>	6308	<i>P. fluoreszenz</i>
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	50298	<i>P. savastanoi</i>
<i>Sphingomonas echinoides</i>	1805	<i>S. echinoides</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	7162	<i>P. putida</i>

Um einheitliche Bedingungen für das Screening nach der Extraktion der Steroide aus dem Medium zu gewährleisten, wurde für die Kultivierung aller Stämme in Tabelle 7 YE Low Glucose Medium pH 6,5 verwendet. Dieses Medium zeigte keine messbare Fluoreszenz unter den Bedingungen des Assay. Die beiden filamentösen Pilze *A. nidulans* und *C. lunata* wurden bei 30°C / 100 Upm inkubiert, die prokaryotischen Stämme *P. citronellolis*, *P. fluoreszenz*, *P. savastanoi*, *S. echinoides* und *P. putida* bei 37°C / 200 Upm, *T. thermophilus* bei 65°C / 200 Upm. Die Substratzugabe erfolgte bei allen Stämmen 12 h nach der Animpfung des Kolbens. Das Substrat (11-Desoxycortisol) wurde in einer Endkonzentration von 0,25 mM in DMF gelöst zugegeben, so dass die DMF-Konzentration 1 % nie überschritt. Die gesamte Versuchsdauer betrug 24 h. Die Durchführung des Assay erfolgte wie oben beschrieben (s. 7.3.2). Die Ergebnisse der einzelnen Messungen sind in Abbildung 54 dargestellt.

Auf Grund der gemessenen Fluoreszenzintensitäten für die Umsetzung mit den verschiedenen Stämmen wurden für eine HPLC-Analyse als zweite Screening-Stufe nur *P. citronellolis* und *A. nidulans* ausgewählt. Die Extraktion erfolgte nach Zentrifugation der Zellen (15 min / 8000 Upm) wie oben beschrieben.

Die Abbildungen 55 und 56 zeigen jeweils die Chromatogramme der Proben 12 h nach Zugabe von 11-Desoxycortisol zur Kulturbrühe. In beiden Chromatogrammen erscheint jeweils ein neues Produkt mit einer Retentionszeit vergleichbar der von Hydrocortison und einem identischen UV/VIS-Spektrum ( $\lambda_{\max}$  244 nm).

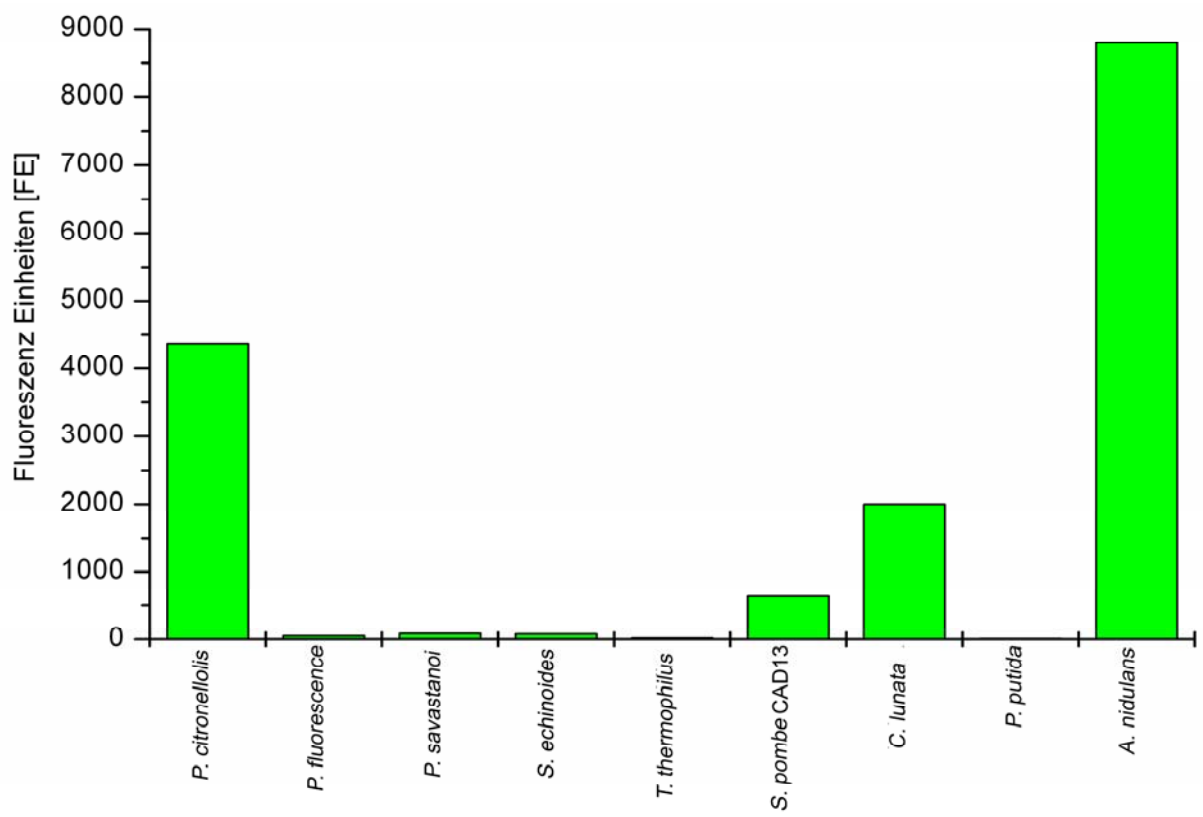


Abbildung 54: Ergebnis des Screenings verschiedener Mikroorganismen mittels Fluoreszenz-Assay

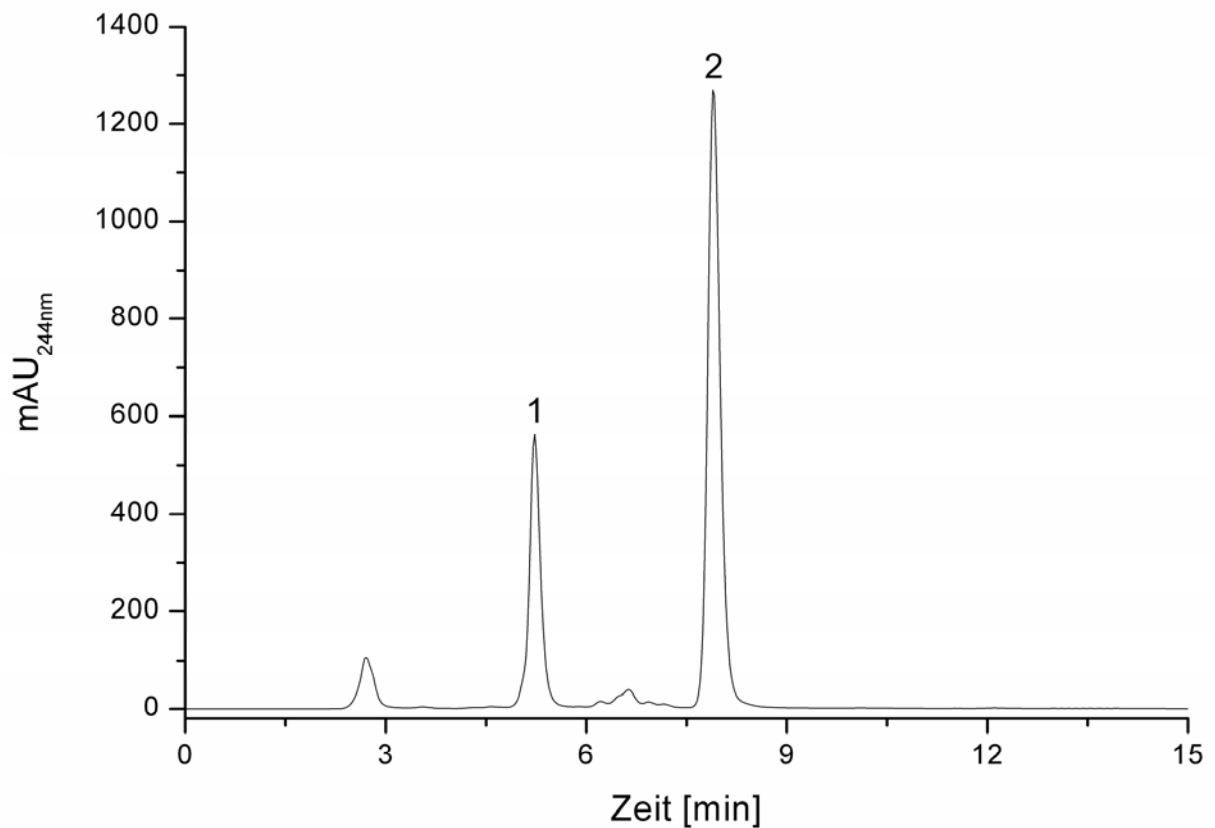
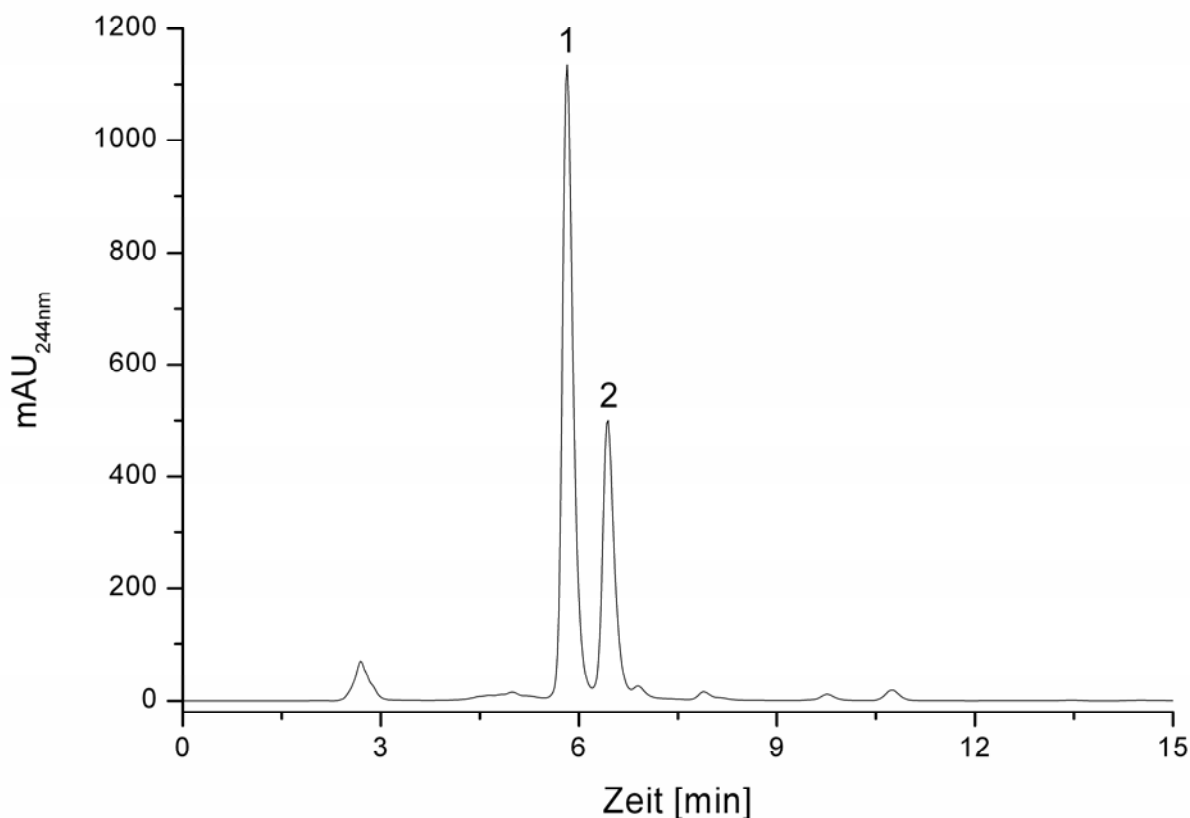


Abbildung 55: Analyse der Umsetzung von 11-Desoxycortisol durch *A. nidulans*. 1. unbekanntes Produkt  $t_R$  5,22 min 2. 11-Desoxycortisol  $t_R$  7,62 min unter Verwendung einer analytischen Säule Nucleosil C18 100 Å 5 µm, Fließgeschwindigkeit 0,5 mL/min

Das Produkt aus der Umsetzung mit *A. nidulans* weist eine um 0,5 min geringere Retentionszeit auf. Beim Aufstocken der Probe mit authentischem Hydrocortison erscheint ein dritter Peak ( $t_R =$  ): bei dem neugebildeten Produkt muss es sich demnach um einen Steroidkörper mit einer etwas höheren Polarität als Hydrocortison handeln.

Beim Aufstocken der Probe aus der Umsetzung mit *P. citronellolis* mit Hydrocortison erhöhte sich die Intensität des ersten Peaks, so dass es sich bei dem neugebildeten Produkt tatsächlich um Hydrocortison handeln könnte.

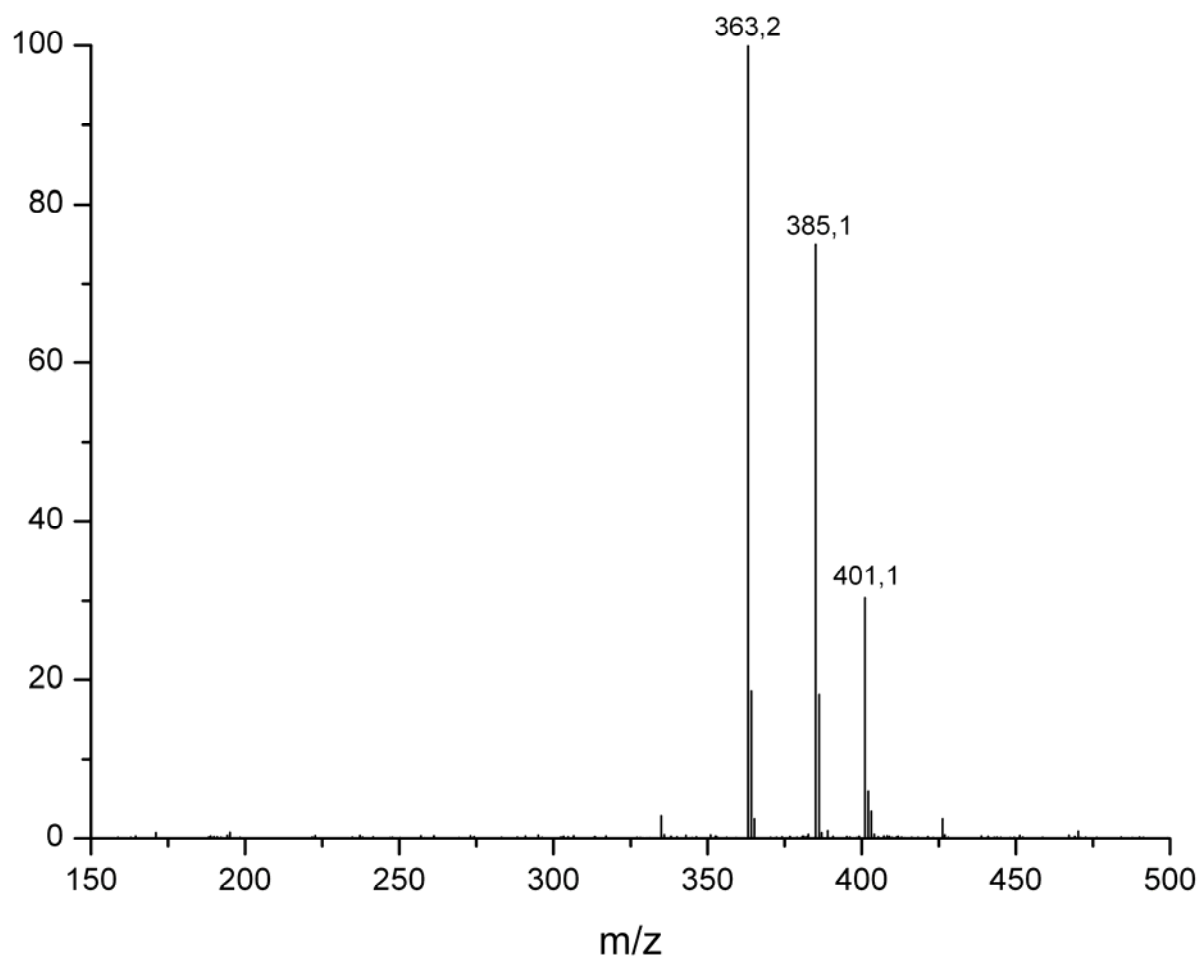
Für die sichere Strukturzuordnung der beiden Produkte wurden HPLC/MS und NMR-Analysen durchgeführt.



**Abbildung 56:** Analyse der Umsetzung von 11-Desoxycortisol durch *P. citronellolis*. 1. unbekanntes Produkt  $t_R$  5,82 min 2. 11-Desoxycortisol  $t_R$  7,61 min unter Verwendung einer analytischen Säule Nucleosil C18 100 Å 5 µm, Fließgeschwindigkeit 0,5 mL/min

### 5.6.1 Analyse der unbekannt Produkte von *A. nidulans* und *P. citronellolis* durch HPLC/MS

Beide Produkte wurden primär mit (+)-ESI-HPLC/MS untersucht, um die Molekülmassen eindeutig abzusichern. Für die HPLC/MS-Analyse wurden eine identische Säule und identische Trennbedingungen wie für die analytische HPLC-Analyse verwendet (s. 7.3.1.2). Die für die beiden unbekannt Produkte erhaltenen ESI-Massenspektren sind in Abbildung 57 und 58 dargestellt, die Massenlisten in Tabelle 8 und 9 zusammengestellt.



**Abbildung 57:** (+)-ESI-MS des unbekannt Produkts aus der Umsetzung von 11-Desoxycortisol durch *A. nidulans*

Tabelle 8: Massentabelle für das unbekannte Produkt nach Umsetzung von 11-Desoxycortisol durch *A. nidulans*

Spezies	m/z	Int. [% base peak]	rel. Int. [%] <sup>13</sup> C-Isotopenpeak
[M + H] <sup>+</sup>	363,2	100	18
[M + Na] <sup>+</sup>	385,1	75	24
[M + K] <sup>+</sup>	401,1	30	19

Die Molekülmasse von 362,2 für das Produkt aus der Umsetzung mit *A. nidulans* deutet auf eine Hydroxylierung ( $\Delta m = 16$ ) des als Substrat eingesetzten 11-Desoxycortisol. Für eine exakte Strukturaufklärung ist eine Analyse durch <sup>1</sup>H- und/oder <sup>13</sup>C-NMR notwendig.

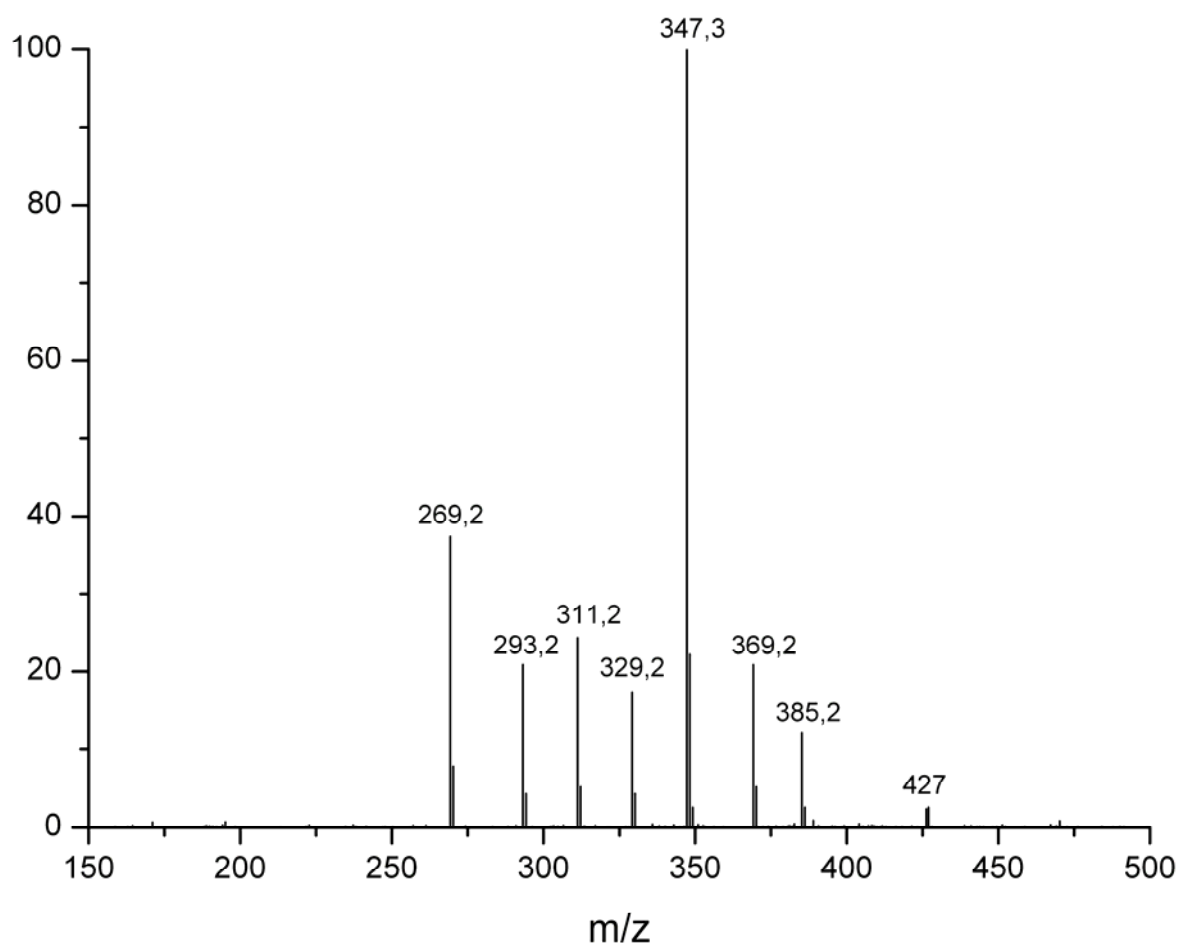
Abbildung 58: (+)-ESI-MS des unbekannten Produkts bei der Umsetzung von 11-Desoxycortisol mit *P. citronellolis*

Tabelle 9: Massentabelle für das unbekannte Produkt bei der Umsetzung mit *P. citronellolis*

Spezies	m/z	Int. [% <i>base peak</i> ]	rel. Int. [%] <sup>13</sup> C-Isotopenpeak
[M + H] <sup>+</sup>	347,3	100	22
[M + Na] <sup>+</sup>	369,2	21	25
[M + K] <sup>+</sup>	385,2	12	21
[M + H – H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	329,2	17	25
[M + H – 2 x H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	311,2	24	21
[M + H – 3 x H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	293,2	21	21
[M + H – 2 x H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> =C=O] <sup>+</sup>	269,2	38	19

Das Massenspektrum des Produkts aus der zweiten Umsetzung mit *P. citronellolis* zeigt als Basispeak ein Ion mit der gleichen Quasimolekülmasse (MH<sup>+</sup>) wie das als Substrat verwendete 11-Desoxycortisol sowie die entsprechenden Na / K-Cluster-Ionen. Die zusätzlichen Peaks für die (mehrfache) Abspaltung von H<sub>2</sub>O bzw. Keten sind für ein ESI-Massenspektrum sehr ungewöhnlich. Eine Aussage über die Struktur des unbekanntes Produkts anhand des Massenspektrums ist nicht möglich.

### 5.6.2 Struktursicherung des unbekanntes Produkts von *A. nidulans* durch $^1\text{H-NMR}$

Im 500 MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erscheint das olefinischen 4-H Signal deutlich abgesetzt bei tiefen Feld ( $\delta$  xxx ppm). Verschiebung und Aufspaltungsmuster sind identisch wie bei 11-Desoxycortisol, ebenso Lage und Geminalkopplung der beiden (diastereotopen) Methylenprotonen an C-21. Diese beiden Signale sind zusätzlich durch Kopplung zum vicinalen OH-Proton dublettiert, das seinerseits als scharfes Triplet bei 3,044 ppm erscheint. Ein neues Multiplett für 1 H bei 4,025 ppm ist aufgrund seiner chemischen Verschiebung einem Proton in  $\alpha$ -Stellung zur neu eingeführten Hydroxylgruppe zuzuordnen. Die Multiplett-Analyse liefert als Kopplungskonstanten 5,25 Hz (Dublett), 6,70 Hz (Dublett) und 10,30 Hz (Triplet). Die dieser Triplettaufspaltung zugrunde liegenden beiden großen  $^3J_{a,a}$ -Kopplungskonstanten beweisen die axiale Orientierung dieses H-Atoms und damit die  $\alpha$ -Stellung der OH-Gruppe. Die 5,25 Hz-Kopplung verknüpft 11- $\text{H}_\beta$  mit 12- $\text{H}_\beta$  ( $^3J_{a,e}$ ), die verbleibende Kopplung (6,70 Hz) mit dem OH-Proton.

Ein Vergleich mit dem Spektrum von authentischem Hydrocortison (11 $\beta$ -Hydroxycorticosteron) bestätigt diese Zuordnung. Hier erscheint das Signal für das zur OH-Gruppe vicinale equatoriale 11- $\text{H}_\alpha$  bei 4,487 ppm als Quartett ( $^3J$  3,85Hz). Die beiden  $^3J_{e,a}$ -Kopplung zu 9-H und 12- $\text{H}_\alpha$  sowie die  $^3J_{e,e}$ -Kopplung zu 12- $\text{H}_\beta$  haben hier zufälligerweise identische Werte. In diesem Spektrum sind die Kopplungen zu den Hydroxylprotonen ausgewaschen. Der Unterschied in der chemischen Verschiebung zwischen den beiden 11-H Protonen von epi- und Hydrocortison ( $\alpha$  bzw.  $\beta$ ) von 0,46 ppm entspricht exakt der Erwartung für den Wechsel axial / equatorial innerhalb derselben Cyclohexanstruktur.

## 5.7 Steroid-Biotransformation mit *Aspergillus nidulans*

Bei *epi*-Hydrocortison handelt es sich um ein pharmakologisch unwirksames Stereoisomer von Hydrocortison. Um die Umsatzrate für das gebildete *epi*-Hydrocortison genauer zu bestimmen, wurden verschiedene Konzentrationen an 11-Desoxycortisol für Umsetzungen mit *A. nidulans* eingesetzt. Das dabei gebildete *epi*-Hydrocortison wurde jeweils mit dem Fluoreszenz-Assay und HPLC-Analyse bestimmt. Da es sich bei *A. nidulans* um einen filamentösen Pilz handelt (siehe Abbildung 59), war eine Biomasse-Bestimmung durch Messung der optischen Dichte der Kultur nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die Biotrockenmasse nach Ende der Biotransformation bestimmt.



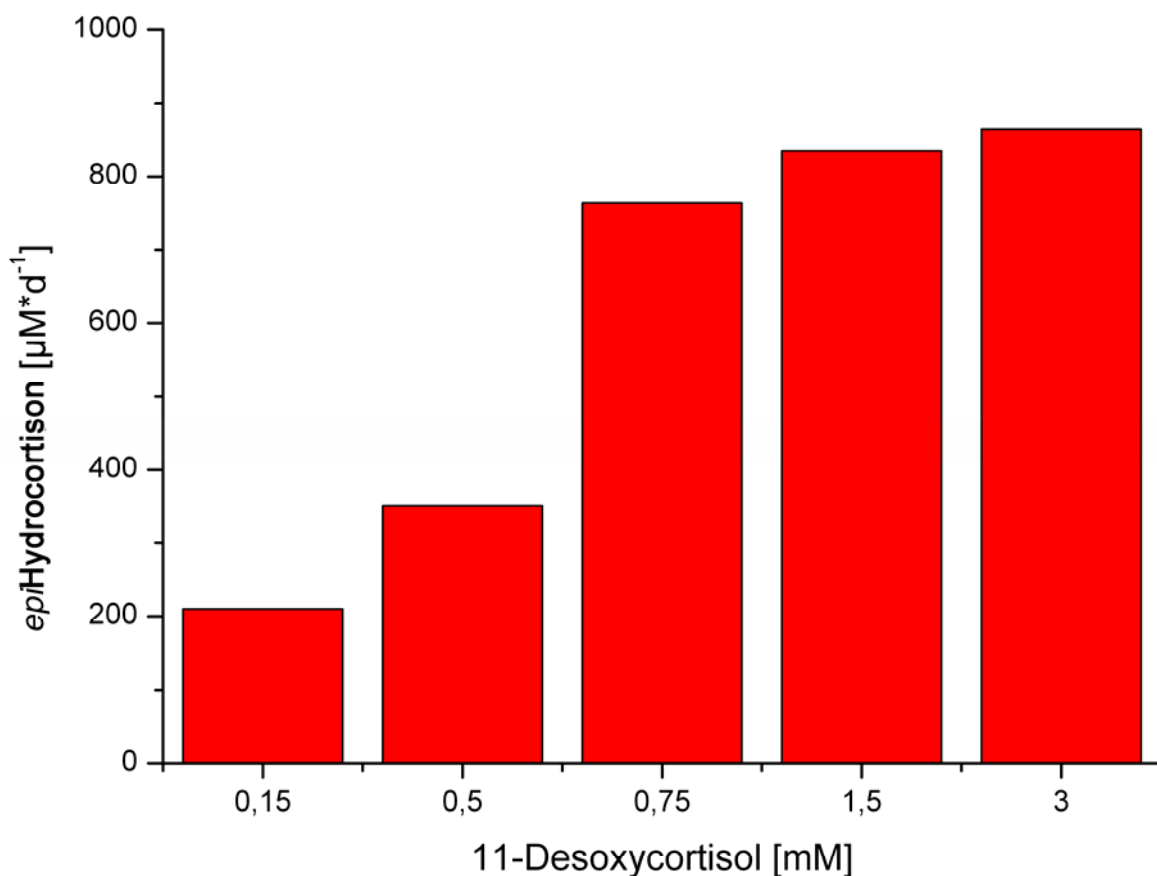
**Abbildung 59:** Nahaufnahme einer Kultur von *A. nidulans* bei Wachstum in YE-Medium bei 30°C / 100 Upm

In weiteren Experimenten mit 11-Desoxycortisol-17-acetat (MAS) wurde untersucht, ob beim Einsatz eines acetylierten 11-Desoxycortisol Hydrocortison bzw. Hydrocortison-17-acetat gebildet werden. Zusätzlich wurde, um die Regioselektivität von *A. nidulans* bei der Hydroxylierung von Steroiden zu testen, auch Progesteron als Substrat eingesetzt. Hier würde eine  $\alpha$ -Hydroxylierung in Position 11 das pharmakologisch interessante Produkt 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron liefern.



### 5.7.1 Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol

Für die Bestimmung der maximalen Umsatzrate wurden bei einer konstanten DMF-Konzentration von 1 % im Medium 11-Desoxycortisol-Konzentrationen von 0,15 mM bis 3 mM eingesetzt. Die Umsetzungen wurden in 1 L Schüttelkolben mit einem Volumen von 400 mL AN-Medium durchgeführt. 11-Desoxycortisol wurde 24 h nach Inokulation der Kolben aus Sporen-Glycerol-Stock zugegeben und die Umsetzung über 48 h mit HPLC und Fluoreszenz-Assay verfolgt (zu den Methoden s. 7.3.2.1 und 7.3.1.2). Der Fluoreszenz-Assay ergab bei allen Versuchen einen im Vergleich zur HPLC-Analyse leicht erhöhten Wert. In Abbildung 60 sind die mit HPLC bestimmten Bildungsraten für Hydrocortison dargestellt: die maximale Umsatzrate von  $865 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  wurde bei einer 11-Desoxycortisol Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  erreicht.

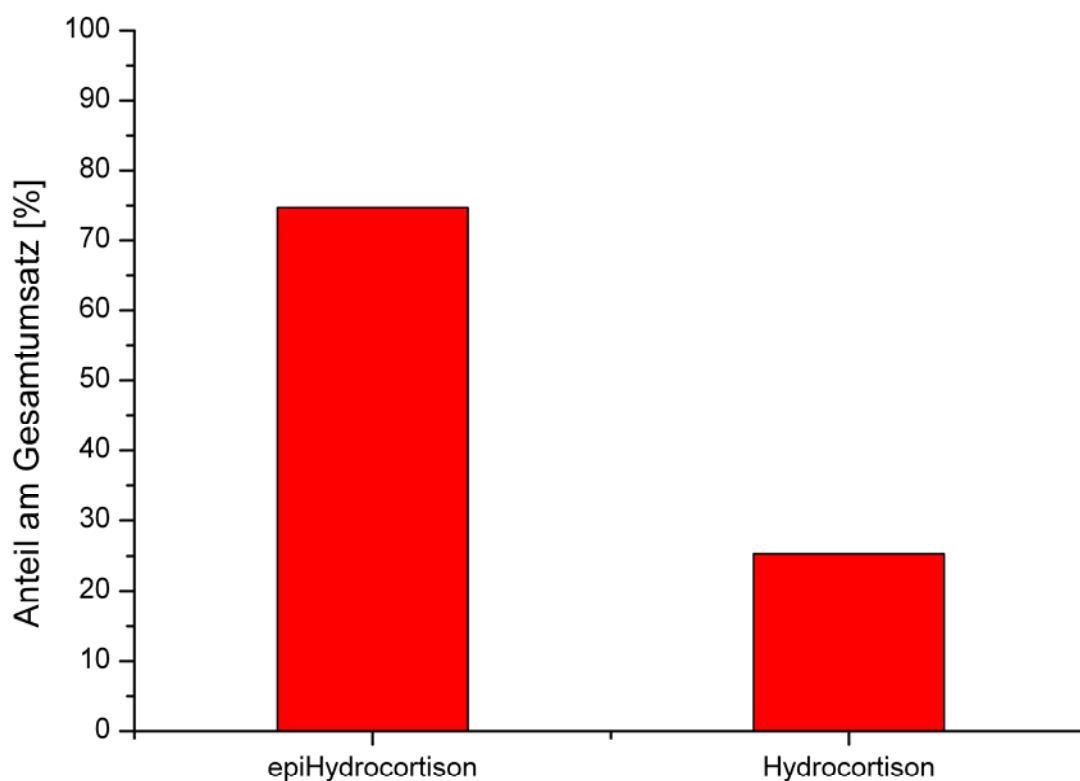


**Abbildung 60:** Bildungsraten von epHydrocortison bei verschiedenen 11-Desoxycortisol-Konzentrationen

### 5.7.2 Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol-17-acetat (MAS)

Im Weiteren wurde untersucht, ob es beim Einsatz von 11-Desoxycortisol-17-acetat (MAS) zur Bildung von Hydrocortison kommt. Die zusätzliche Acetyl-Gruppe könnte wie bei dem bei Schering benutzten filamentösen Pilz *Curvularia lunata* dazu führen, dass vermehrt Hydrocortison gebildet wird. Hierfür wurde in 1 L Schüttelkoben (Mediumvolumen 400 mL) *A. nidulans* wie beschrieben kultiviert (s. 7.2.4.). MAS wurde 24 h nach Inokulation der Kolben als Lösung in DMF zugegeben (Endkonzentration 1,5 mM in der Kulturbrühe). Die Umsetzung wurde aufgearbeitet und mit HPLC analysiert (s. 7.3.1).

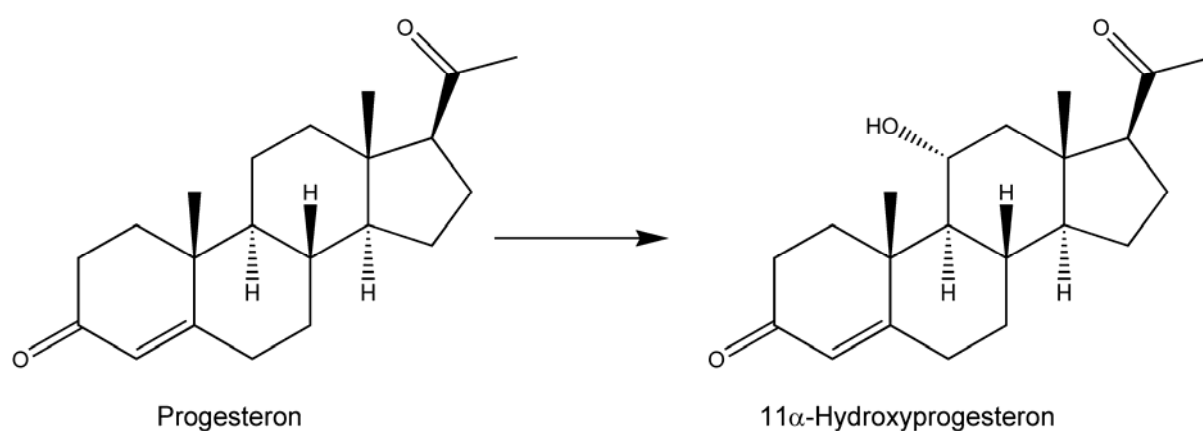
Das Ergebnis der HPLC-Analyse in Abbildung 61 zeigt, dass bei Verwendung von 11-Desoxycortisol-17-acetat in der Tat Hydrocortison in signifikanter Menge gebildet wird. Die Umsatzrate für MAS als Substrat wurde aus den Daten der HPLC-Analyse zu  $532,5 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  für *epi*-Hydrocortison und  $177,5 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  für Hydrocortison bestimmt. Eine Änderung der MAS-Konzentration zeigte keinen Einfluss auf das Verhältnis der Bildung von *epi*-Hydrocortison und Hydrocortison



**Abbildung 61:** Umsatz von 11-Desoxycortisol-17-acetat (MAS) mit *A. nidulans*. Verhältnis von *epi*-Hydrocortison und Hydrocortison am Gesamtumsatz.

### 5.7.3 Hydroxylierung von Progesteron

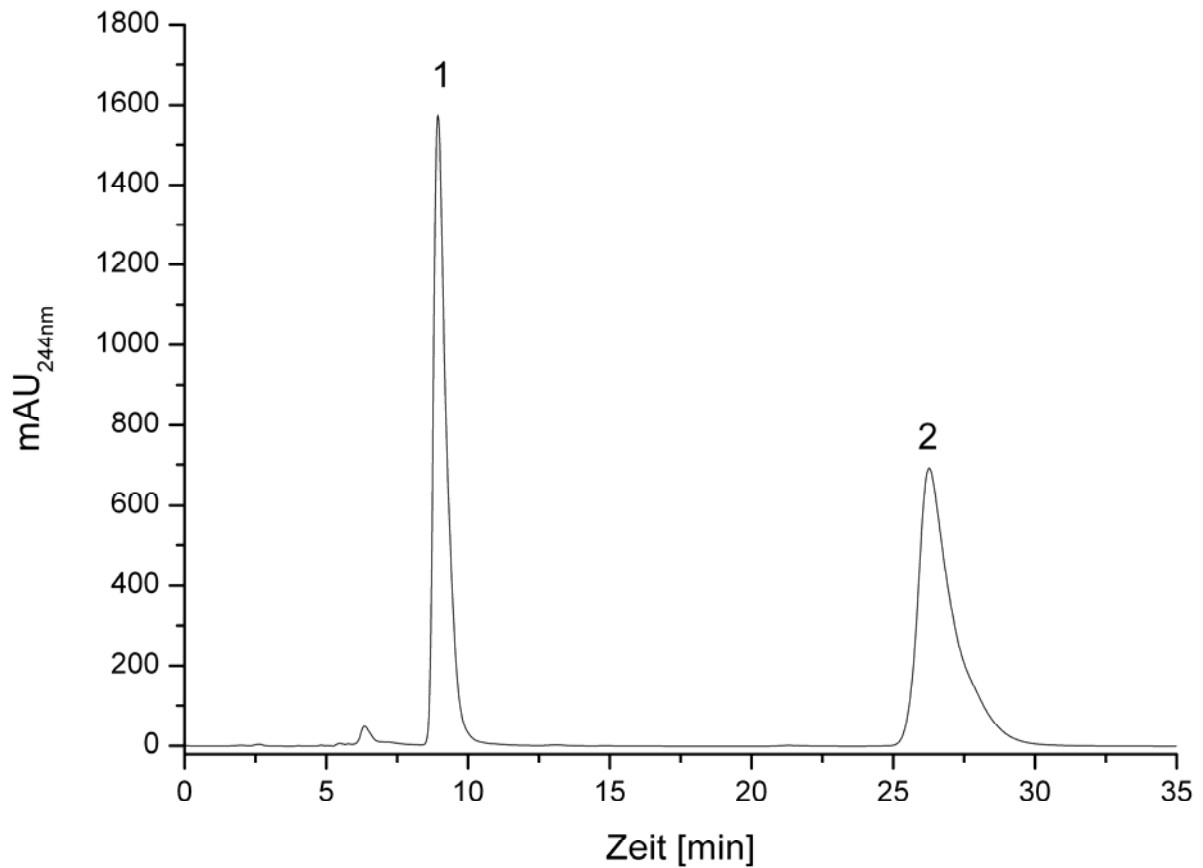
Wegen der unterschiedlichen Seitenkette (C-20,21) von Progesteron und 11-Desoxycortisol wurde zunächst überprüft, ob sich Progesteron und das erwünschte Hydroxylierungsprodukt 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron mit der für 11-Desoxycortisol optimierten Extraktionsmethode (s. 7.3.2.1) gleichfalls aus dem Kulturmedium extrahieren lassen. Hierzu wurden authentisches Progesteron und 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron aus YE-Medium (Endkonzentration jeweils 3 mM) mit DMF als Lösevermittler extrahiert.



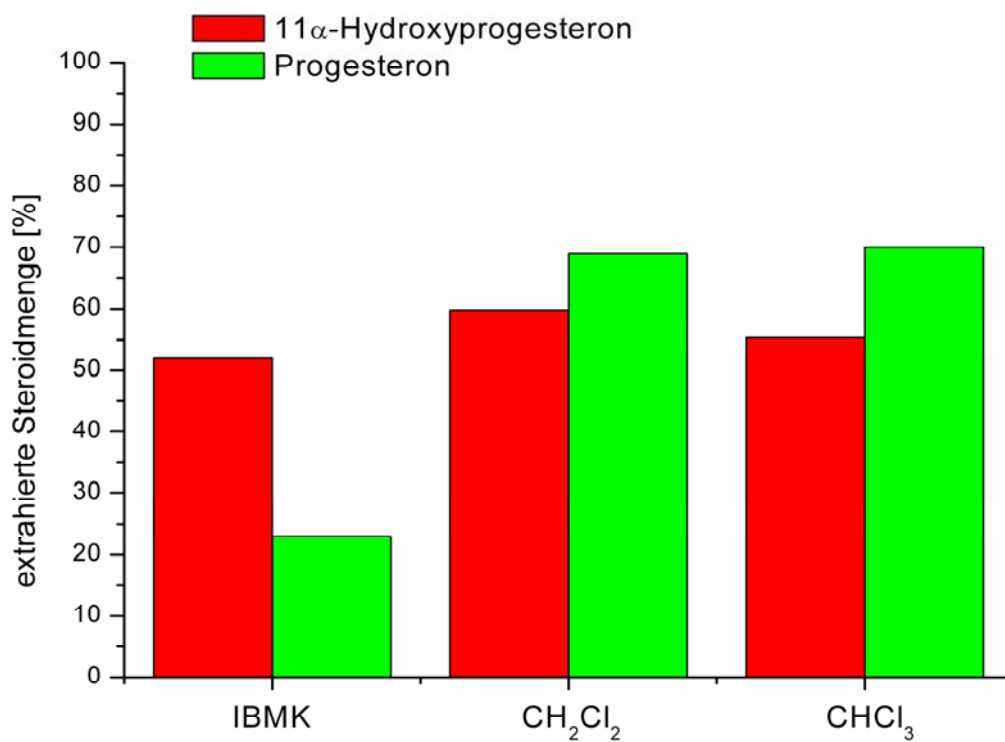
**Abbildung 62:** Reaktionsschema von Progesteron zu 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron

Extrahiert wurde wieder mit den Lösemitteln Chloroform, Dichlormethan und Isobutylmethylketon. Die organischen Phasen wurden getrocknet und in Acetonitril aufgenommen. Die extrahierte Menge an Progesteron und 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron wurde mit HPLC bestimmt (zur Methode s. 7.3.1). Abbildung 63 zeigt ein Referenz-Chromatogramm für die Trennung von Progesteron und 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron.

In Abbildung 64 sind die Wiederfindungsraten bei der Extraktion von Progesteron und 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron mit verschiedenen Lösemitteln graphisch dargestellt. Im Gegensatz zur Extraktion von 11-Desoxycortisol und Hydrocortison erhält man hier mit Dichlormethan die beste Extraktionseffizienz.



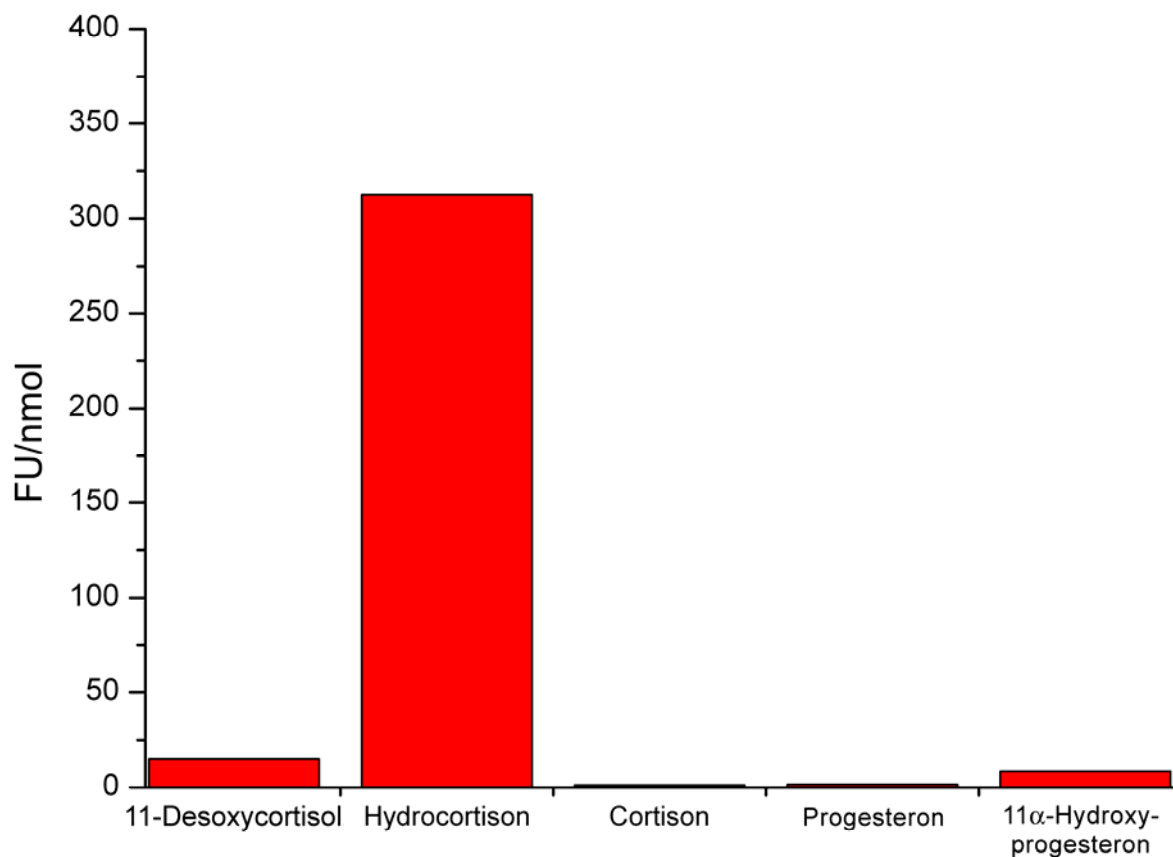
**Abbildung 63:** Referenz-Chromatogramm zur Trennung von 1. 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron  $t_R$  8,84 min und 2. Progesteron  $t_R$  24,41 min unter Verwendung einer analytischen Säule Nucleosil C18 100 Å 5  $\mu$ m, Fließgeschwindigkeit 0,5 mL/min.



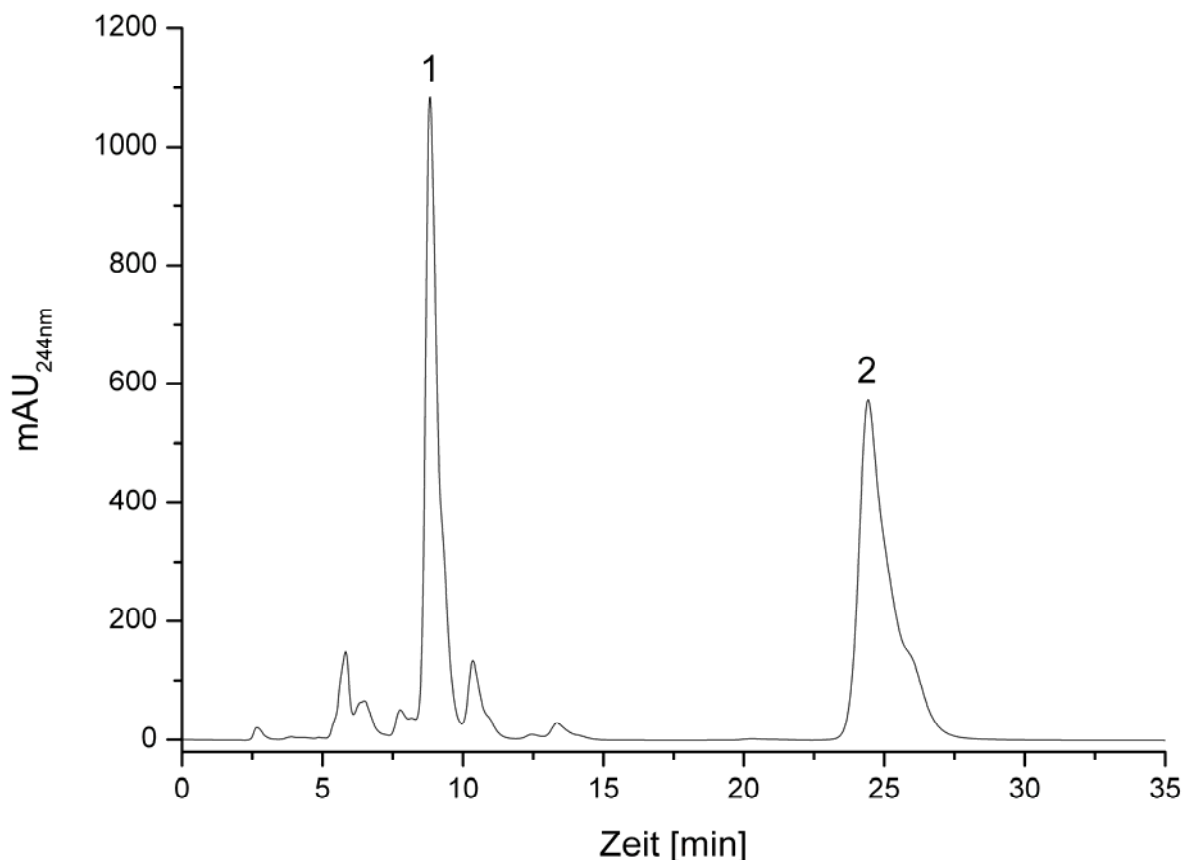
**Abbildung 64:** Widerfindungsrate in % bezogen auf die eingesetzte Menge Progesteron bzw. 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron, bei der Extraktion mit verschiedenen Lösemitteln

Für den Nachweis der gebildeten Menge an  $11\alpha$ -Hydroxyprogesteron unter Verwendung des Fluoreszenz-Assay wurde sowohl Progesteron als auch  $11\alpha$ -Hydroxyprogesteron als Standardsubstanz im Fluoreszenz-Assay eingesetzt, um die Nachweisgrenze für  $11\alpha$ -Hydroxyprogesteron zu bestimmen (s. Abschnitt 7.3.2.1).

Um die Fluoreszenzintensität von Progesteron und  $11\alpha$ -Hydroxyprogesteron im Fluoreszenz-Assay zu bestimmen, wurden 10 Einzelmessungen mit einer Konzentration von 30 nmol pro Ansatz durchgeführt. Abbildung 65 zeigt, dass weder Progesteron noch  $11\alpha$ -Hydroxyprogesteron eine messbare Fluoreszenz bei 525 nm aufweisen (Anregungswellenlänge 475 nm) und sich daher mit dem Fluoreszenz-Assay nicht nachweisen lassen. Daher wurde die Umsetzungen mit Progesteron nur durch HPLC verfolgt.



**Abbildung 65:** Vergleich der spezifischen Fluoreszenz von Progesteron und  $11\alpha$ -Hydroxyprogesteron mit 11-Desoxycortisol und Hydrocortison



**Abbildung 66:** Analyse der Umsetzung von *A. nidulans* mit Progesteron. **1.**  $11\alpha$ -Hydroxyprogesteron  $t_R$  8,82 min **2.** Progesteron  $t_R$  24,61 min unter Verwendung einer analytischen Säule Nucleosil C18 100 Å 5  $\mu$ m, Fließgeschwindigkeit 0,5 mL/min

Abbildung 66 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm für die Umsetzung von Progesteron bei einer Substratkonzentration von 1,5  $\mu$ M. Beim Aufstocken dieser Probe mit authentischem  $11\alpha$ -Hydroxyprogesteron erhöht sich die Intensität des Peaks bei 8,82 min. Um zweifelsfrei zu sichern, dass es sich hierbei nicht um eine zufällige Coelution handelt, wurde das Produkt mit präparativer HPLC, (s. 7.3.1.3) aufgereinigt und durch  $^1\text{H-NMR}$  analysiert.

Das 500 MHz-NMR-Spektrum zeigt neben dem Signal für das olefinische 4-H (5,74 ppm, Dublett von Triplets, Allylkopplung zu 6- $\text{H}_\alpha$  und  $^4J$  zu 2- $\text{H}_{\alpha,\beta}$ ) deutlich abgesetzt von den übrigen Signalen des Steroidkörpers ein weiteres Multiplett bei 4,0 ppm. Die chemische Verschiebung zeigt eindeutig die  $\alpha$ -Position zu einer OH-Gruppe an; die Aufspaltung durch zwei große Kopplungen ( $> 10$  Hz) und eine deutlich kleinere Kopplung ( $\sim 5$  Hz) beweist die axiale Orientierung dieses Protons, wie sie für das  $11\alpha$ -Hydroxyprogesteron zu erwarten ist. Die chemische Verschiebung ist identisch mit einem Literaturwert für  $11\alpha$ -Hydroxyprogesteron [92]. Da einige Zuordnungen in

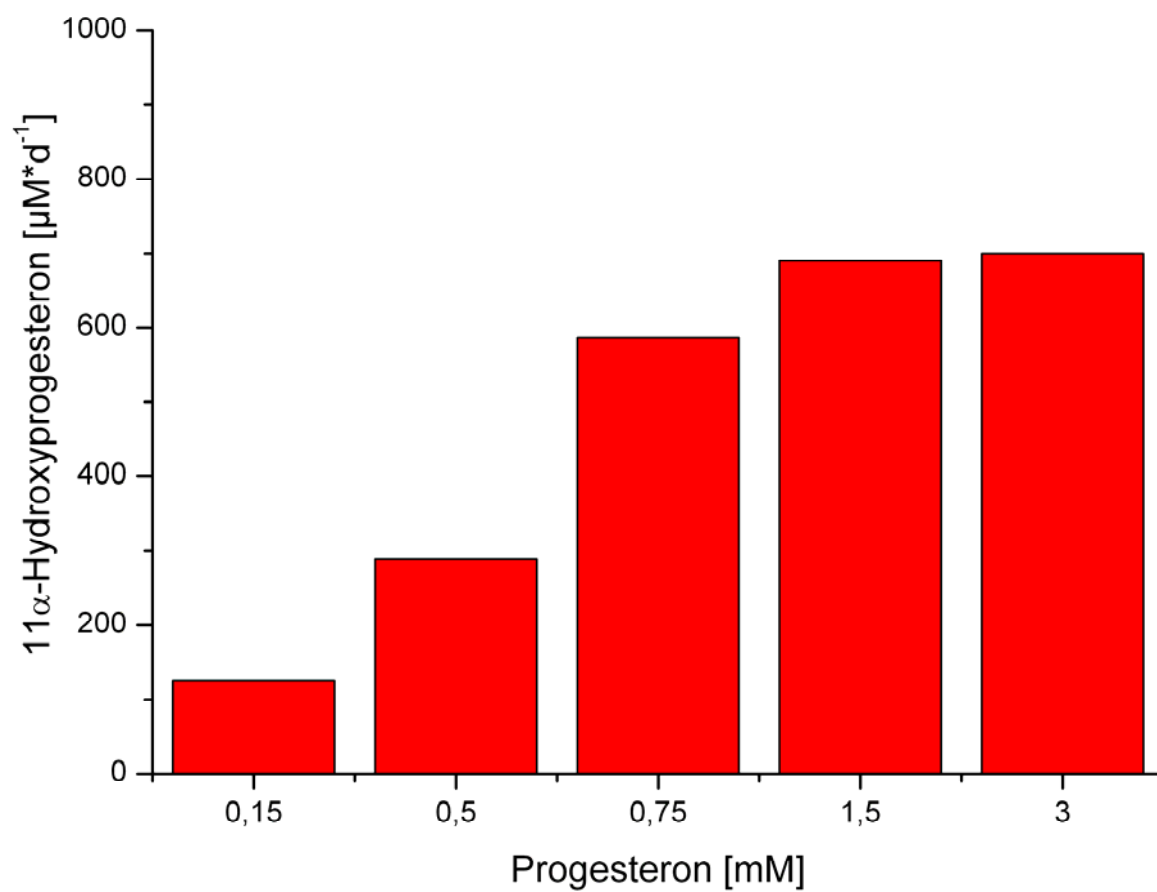
dieser Literaturstelle aber offensichtlich falsch sind (z.B. für 7-H<sub>α</sub>), wurde zur endgültigen Bestätigung der strukturellen Identität ein Vergleichsspektrum mit authentischem Material aufgenommen. Wie Tabelle 10 zeigt, sind die <sup>1</sup>H-NMR-Daten für das β-ständige 11-H in den beiden Spektren absolut identisch.

**Tabelle 10:** <sup>1</sup>H-NMR-Daten für 11-H<sub>β</sub> im unbekanntem Produkt und in authentischem 11α-Hydroxyprogesteron

	11α-Hydroxyprogesteron	Produkt aus Umsetzung mit <i>A. nidulans</i>
δ [ppm]	4,039	4,040
<sup>3</sup> J(11-H <sub>β</sub> , 9-H <sub>α</sub> ) [Hz]	10,05	10,05
<sup>3</sup> J(11-H <sub>β</sub> , 12-H <sub>α</sub> ) [Hz]	10,80	10,80
<sup>3</sup> J(11-H <sub>β</sub> , 12-H <sub>β</sub> ) [Hz]	4,82	4,76

Für die Bestimmung der Umsatzrate von 11-Hydroxyprogesteron (s. 7.3.2.2) wurden verschiedene Progesteron-Konzentrationen eingesetzt und die Bildung von 11α-Hydroxyprogesteron durch HPLC-Analyse verfolgt. Die Umsetzungen wurden in 1 L Schüttelkolben mit 400 mL AN-Medium durchgeführt und das in DMF gelöste Progesteron 24 h nach Inokulation der Kolben zugegeben (DMF-Konzentration im Medium ≤ 1 %). Die Umsetzung wurde über einen Zeitraum von 48 h verfolgt.

Abbildung 67 zeigt die für die einzelnen Progesteron-Konzentrationen bestimmten 11α-Hydroxyprogesteron-Bildungsraten. Die höchste Umsatzrate von 705 μM\*d<sup>-1</sup> wurde bei einer Progesteron-Konzentration von 3 μM erreicht.



**Abbildung 67:** Bildungsraten von 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron bei verschiedenen Progesteron Konzentrationen



## 6 Diskussion

### 6.1 Entwicklung eines Assay zum Nachweis von Hydrocortison und Hydrocortisonderivaten

Die Identifizierung (strukturelle Charakterisierung) und Quantifizierung von Steroiden in Blut- und Urin-Proben wird heute in der Regel mit verschiedenen HPLC-Analysentechniken durchgeführt. Diese Methoden sind jedoch ungeeignet für schnelle semi-quantitative Analysen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein alternatives Nachweisverfahren zur Detektion der Steroide durch HPLC entwickelt, um bei der Fermentations-Optimierung die Änderung der Hydrocortison-Bildungsrate zeitnah zu verfolgen. Mit dem in Abschnitt 7.3.2 beschriebenen Assay lässt sich die jeweils gebildete Hydrocortisonmenge rasch quantitativ erfassen und der Einfluss verschiedener Fermentationsparameter auf die Hydrocortison-Bildung sauber ermitteln.

Porter und Silber haben 1950 eine Methode veröffentlicht [74], mit der sich Cortison und andere 17,21-Dihydroxy-20-ketosteroide nachweisen lassen. Dieses Verfahren basiert auf der Bildung eines farbigen Komplexes (Absorption bei 410 nm) bei der Reaktion der entsprechenden Steroidkörper mit Phenylhydrazin und Schwefelsäure bei 60 °C. In dieser Arbeit wurde erstmals die Reaktion von Steroiden bei Inkubation mit starken Säuren unter Bildung von Farbkomplexen beschrieben. Die Reaktion mit 11-Desoxycortisol und Hydrocortison wurde allerdings nicht untersucht. Sweat [82] hat gezeigt, dass verschiedene Corticosteroide bei der Inkubation mit einer Schwefelsäure / Ethanol-Mischung bei Anregung im Bereich von 470 - 480 nm eine Fluoreszenz bei 530 - 550 nm aufweisen.

Diese und andere in der Literatur beschriebenen Methoden [75-77,81,83,84] dienen ausschließlich der strukturellen Charakterisierung einzelner Corticosteroide anhand ihrer Fluoreszenzspektren. Hierbei wurden verschiedene Lösemittel zur Extraktion getestet und der Einfluss verschiedener Säuren, (Phosphorsäure, Perchlorsäure, Schwefelsäure) auf die gebildeten Fluorophore untersucht. Zusätzlich wurde geprüft, ob sich durch Zusatz von z.B. Diphenylamin, *m*-Dinitrobenzen oder 2,6-Di-*tert*-butyl-*p*-cresol die einzelnen Steroide besser anhand ihrer Fluoreszenz differenzieren lassen. In Tabelle 11 sind die wichtigsten Reaktionen zusammengefasst.

**Tabelle 11:** Zusammenstellung wichtiger Nachweisreaktion für Corticosteroide

Methode nach	Lit.	Reagenz	Steroide	Detektion
Schulz	[77]	2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-p-cresol in alkalischer Lösung	Hydrocortison, Cortison, u.a.	471 nm
Clark	[75]	Diphenylamine; Schwefelsäure / Essigsäure	Hydrocortison, RSS u.a.	530 nm – 650 nm
Szalkowski	[76]	Schwefelsäure / Essigsäure	Cortison, Hydrocortison u.a.	470 nm
Sweat	[82]	Ethanol / Schwefelsäure	Cortisone, Progesteron u.a.	Ex: 475 nm Em: 550 nm
Porter et al.	[74]	Phenylhydrazin; Schwefelsäure bei 60°C	Cortison, Estradiol, u.a.	410 nm

Auf der Grundlage dieser qualitativen Nachweismethoden entwickelte Mattingly [79] einen semiquantitativen Assay zum Nachweis von 11-Hydroxycorticosteroiden aus Blutplasma. Der Extraktion mit Dichlormethan folgt eine mehrstufige Aufarbeitung bis zur endgültigen Farbreaktion in schwefelsaurem Milieu. Diese Nachweismethode erlaubt z.B. aber keine Unterscheidung zwischen Hydrocortison und 11-Desoxycortisol. Der von Thiessen et al. [88] publizierte Assay zum Nachweis von Hydrocortison aus Blutplasma oder Urin-Proben basiert auf der von Mattingly beschriebenen Methode, vereinfacht jedoch die Reaktionsprozedur erheblich. Auch Pré und Perret [89] beschreiben einen Assay zum Nachweis von Hydrocortison aus Blutplasma, der auf der Bildung von fluoreszierenden Farbstoffen bei Inkubation mit einer Mischung aus Essigsäure und Schwefelsäure basiert. Die Autoren haben auch gezeigt, dass z.B. Progesteron und Cortison unter diesen Bedingungen keine Fluoreszenz ergeben. In Tabelle 12 sind die drei hier beschriebenen Methoden zusammengefasst und mit dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Assay hinsichtlich Detektionsgrenze und Reproduzierbarkeit verglichen.

**Tabelle 12:** Zusammenstellung der Nachweismethoden für Hydrocortison

Methode nach	Nachweisgrenze [ $\mu\text{M}$ ]	Fluoreszenzreagenz	Detektion	S.E.	Lit.
Mattingly	0,8	Schwefelsäure / Ethanol	Ex: 430 nm Em: 540 nm	13 %	[79]
Thiessen	0,46	Schwefelsäure / Ethanol	Ex: 436 nm Em: 570 nm	16 %	[88]
Pré	0,66	Schwefelsäure / Essigsäure	Ex: 470 nm Em: 525 nm	12%	[89]
Appel	2,7 (0,013)	Schwefelsäure / Essigsäure; IBMK	Ex: 475 nm Em: 525nm	>10 %	-

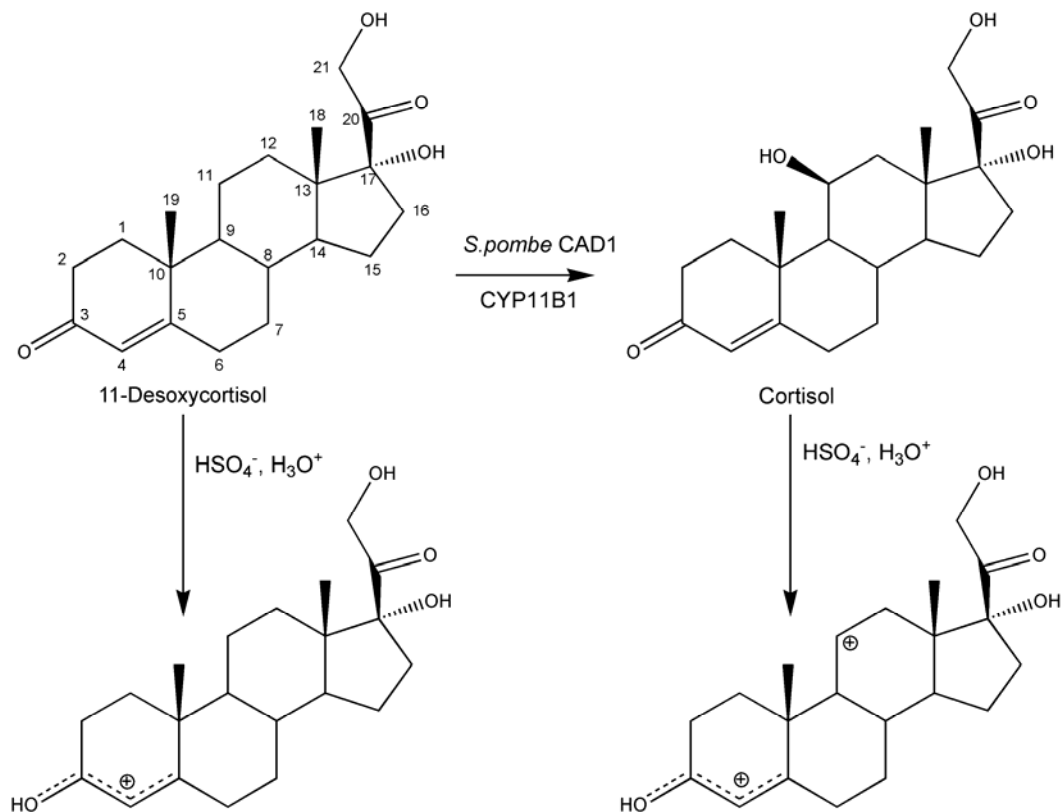
Die teilweise bis zu vierfach niedrigere Nachweisgrenze bei den Methoden von Pré, Thiessen und Mattingly im Vergleich zum hier entwickelten Assay ist zum einen dadurch begründet, dass diese Assays zum Nachweis von Hydrocortison aus Blutplasma und Urin-Proben entwickelt wurden, in denen sich keine weiteren Steroide befinden, die gleichfalls ein Fluoreszenz-Signal geben. Die Nachweisgrenze des neu entwickelten Assay beträgt demgegenüber für Hydrocortison 2,7  $\mu\text{M}$ , da die Proben aus der Biotransformation mit den rekombinanten Spalthestämmen CAD1 und CAD13 zusätzlich noch 11-Desoxycortisol in hohen Konzentrationen enthalten, das mit diesem Assay wie in Abbildung 29 dargestellt ebenfalls ein Fluoreszenz-Signal aufweist. In reiner wässriger Lösung liegt die Nachweisgrenze für Hydrocortison bei 0,013  $\mu\text{M}$ , d.h. um den Faktor 35 niedriger als bei der Methode von Thiessen [88].

Die intra-Assay-Reproduzierbarkeit liegt im Mittel bei 3,2 %. In Gegenwart von 11-Desoxycortisol (bei Proben aus Biotransformationen) erhöht sich dieser Wert abhängig von der 11-Desoxycortisol-Konzentration auf maximal 8 - 9 %. Wie in Abschnitt 5.1.3 gezeigt lassen sich auch unterschiedliche acetylierte Hydrocortison-Derivate durch diesen Assay, mit gleicher Sensitivität nachweisen. Wie bereits von Pré und Perret beschrieben zeigen Progesteron und 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron keine Fluoreszenz. Wie Abbildung 65 zeigt, entwickeln Progesteron und 11- $\alpha$  Hydroxyprogesteron auch mit dem neuen Assay keine Fluoreszenz. Der gebildete Fluorophor muss demnach mit der Hydroxy-Gruppe in Position 11 verknüpft sein und zudem stark von der Natur der Seitenkette an Position 17 abhängen.

Mehrer Gruppen haben versucht, eine Korrelation zwischen der Steroidstruktur und dem bei der Inkubation mit starken Säuren gebildeten Fluorophor zu finden. Goldzieher et al. [81] zeigten bereits 1954, dass die bei der Inkubation von verschiedenen Steroiden in Schwefelsäure auftretende Fluoreszenz von der Anzahl der Hydroxyl-Gruppen abhängt. Die Konjugation einer Carbonylgruppe in Position 3 mit einer C-4/C-5-Doppelbindung wirkt sich negativ auf die Fluoreszenzintensität aus. Goldzieher konnte zeigen, dass Steroide mit Hydroxylgruppen in  $\alpha$ -Konfiguration deutlich stärker fluoreszieren als die isomeren Strukturen mit  $\beta$ -Hydroxylgruppen in der gleichen Position. Eine einheitliche Korrelation für alle untersuchten Steroide ergab sich jedoch nicht. Vor Allem das Auftreten einer Fluoreszenz mit Hydrocortison ist mit den oben genannten Beobachtungen nicht zu erklären.

Nach Studien von Linford [83] beruht die Bildung von fluoreszierenden Strukturen auf der Protonierung von Hydroxyl-, und Keto-Gruppen im Steroidkörper und den daraus resultierenden *Charge-Transfer*-Komplexen. Er konnte zeigen, dass Keto-Gruppen in Position 3, 17 und 20 einen starken Einfluß auf die Bildung des Fluorophors haben. Die Ausbildung einer Fluoreszenz hängt zudem maßgeblich von Vorhandensein einer Seitenkette an C-17 ab. Nach diesen Befunden korreliert die Ausbildung der Fluoreszenz aber nicht mit dem Vorliegen einer OH-Gruppe in Position 11.

Auf der Grundlage der Arbeiten von Linford und Goldzieher lässt sich für den hier entwickelten Assay das in Abbildung 68 dargestellte Reaktionsschema formulieren. Der Einfluss des Lösemittels IBMK auf die Fluoreszenz basiert, wie Linford [83] am Beispiel von Ethern und Ketonen gezeigt hat auf der Stabilisierung des *Charge-Transfer*-Komplexes. Die in Abschnitt 5.1.3 beschriebene Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei Einsatz einer Mischung aus Schwefelsäure und Essigsäure im Vergleich zur Inkubation mit reiner Schwefelsäure konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise wird durch die niedrigere Viskosität der Schwefelsäure/Essigsäure-Mischung eine bessere Durchmischung mit der IBMK-Steroid-Fraktion erreicht.



**Abbildung 68:** Mögliches Reaktionsschema für die Bildung des Fluorophors bei der Inkubation von Hydrocortison und 11-Desoxycortisol mit einer Mischung aus Schwefelsäure / Essigsäure.

In den verschiedenen Ergebnissteilen wurde gezeigt, dass der neu entwickelte Assay eine sinnvolle Ergänzung zur Bestimmung der Hydrocortison-Konzentration durch HPLC darstellt. Auch eine Verwendung als Screening-System ist möglich, wie in Abschnitt 5.6 gezeigt. Durch die unspezifische Reaktion (Ausbildung eines *Charge-Transfer*-Komplexes durch Protonierung des Steroids) ist nicht auszuschließen, dass auch Hydroxylierungen an anderen Positionen fluoreszierende Farbstoffe ergeben. Dass, wie in Abschnitt 5.6 gezeigt, *epi*-Hydrocortison (11 $\alpha$ -Hydroxylierung) ein ebenso starkes Fluoreszenz-Signal zeigt wie Hydrocortison (11 $\beta$ -Hydroxylierung) erscheint nach dem in Abbildung 68 vorgeschlagenen Reaktionsschema schlüssig, da aus beiden Isomeren dieselbe Carbokationen-Struktur resultiert.

## 6.2 Fermentations-Optimierung für *S. pombe* CAD1 und CAD13

Mehrere unabhängige Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass sich Enzyme aus Säugetieren wie z.B. P450-Monooxygenasen erfolgreich in Hefesystemen wie *S. cerevisiae* und *S. pombe* exprimieren lassen. Beim direkten Vergleich zeigte sich, dass die Expression von humaner CYP2C9 P450-Monooxygenase und ihre *in vitro* Hydroxylase-Aktivität bei *S. pombe* zehnfach höher ist als bei *S. cerevisiae* [90]. Die Arbeitsgruppe um Bureik hat nachgewiesen, dass eine Expression und *in vitro* Biotransformation von CYP11B2 in *S. pombe* möglich ist [68]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit *S. pombe* als Expressionssystem für die hier untersuchte Monooxygenase CYP11B1 gewählt.

In der Literatur finden sich nur drei Publikationen zur Fermentation mit *S. pombe*. Keine dieser Arbeiten beschäftigte sich jedoch mit der rekombinanten Expression und *in vitro*-Biotransformation in fermentativem Maßstab. Barford [91] konnte nachweisen, dass *S. pombe* bei Wachstum auf Glucose im Batch-Prozess eine geringere Wachstumsrate ( $\mu_{\max} = 0,29$ ) zeigt als *S. cerevisiae* ( $\mu_{\max} = 0,45$ ). Der Ausbeutekoeffizient  $Y_{X/S} = 0,174$  von *S. pombe* beweist, dass dieser Stamm nur eine geringe respirative Kapazität besitzt.

Die Arbeitsgruppe um Williams [72, 73] beschreibt einen Fed-Batch-Prozess für die Herstellung von kristallinem Cadmiumsulfid, der auf die Produktion großer Mengen an Cadmiumsulfid optimiert wurde. Die Arbeit enthält aber nur wenig Informationen zur *in vitro*-Biotransformation in einem fermentativem Maßstab. Die Autoren haben mit *S. pombe* im Fed-Batch unter den gewählten Bedingungen eine Wachstumsrate von  $\mu_{\max} = 0,1$  und eine Biomasseausbeute von 18,2 g/L erreicht. Tabelle 13 vergleicht die Wachstumsraten und Ausbeutekoeffizienten der beiden rekombinanten Spalthefestämmen CAD1 (genomisch integriertem CYP11B1 Gen) und CAD13 (wie CAD1, mit einer zusätzlichen Kopie des CYP11B1 Gens auf einem TOPO-Plasmid) mit den von Barford und Williams angegebenen Werten.

Dieser Vergleich zeigt, dass die Wachstumsraten der beiden rekombinanten Spalthefestämme deutlich niedriger sind als beim Wild-Typ. Dies ist zum einen auf die konstitutive Expression der CYP11B1-Monooxygenase zurückzuführen, anderer-

**Tabelle 13:** Vergleich der Wachstumsrate, Biomasse und Ausbeutekoeffizient von *S. pombe* CAD1, CAD13 und Literaturwerten

Stamm	Literatur	$\mu_{\max}$	$Y_{X/S}$	Biomasse [g/L]
<i>S. pombe</i> CAD1	Appel	0,02	0,25	13,24
<i>S. pombe</i> CAD13	Appel	0,017	0,68	11,54
<i>S. pombe</i> WT	[72]	0,07	0,6	18,2
<i>S. pombe</i> WT	[91]	0,29	0,174	1,5

seits auf das Wachstum auf thiaminfreiem Minimal Medium, das generell zu niedrigeren Wachstumsraten führt. Es ist anzunehmen dass mit einem induzierbaren Promotor eine deutlich höhere Wachstumsrate und die Bildung von deutlich mehr Biomasse erreichbar ist. Eine Steigerung des Ausbeutekoeffizienten ist mit Glucose als C-Quelle bei *S. pombe* wegen seiner geringen respirativen Kapazität [91] nicht möglich.

Bei der HPLC-Analyse der Biotransformationen von 11-Desoxycortisol wurden zwei weitere Produkte (Nebenprodukte NP1, NP2) gefunden, die beide durch  $^1\text{H-NMR}$ -Analyse identifiziert und strukturell eindeutig werden konnten. Das Nebenprodukt NP1,  $\Delta 6,7$ -Didehydro-11-desoxycortisol, wird auch vom Wild-Typ gebildet. Da *S. pombe* wie alle Hefesysteme eine Vielzahl von Dehydrogenasen besitzt, könnte diese Dehydrogenierung durch eine indigene Dehydrogenase von *S. pombe* katalysiert werden. Bei allen Fermentationen mit dem CAD1- wie mit dem CAD13-Stamm ließ sich  $\Delta 6,7$ -Didehydro-11-desoxycortisol nachweisen; seine Bildungsrate war unabhängig von den jeweiligen Fermentationsparametern. Eine Quantifizierung des gebildeten  $\Delta 6,7$ -Didehydro 11-Desoxycortisol durch HPLC war nicht möglich, da kein authentisches Material zur Verfügung stand.

Durch Optimierung der Fermentation lässt sich die Bildung von  $\Delta 6,7$ -Didehydro-11-desoxycortisol prinzipiell nicht unterdrücken, sofern Dehydrogenasen aus dem Genom von *S. pombe* dafür verantwortlich sind. Bei Verwendung von spezifischen Inhibitoren oder mit *Knock-Out*-Mutanten dagegen könnte sich die Bildung dieses Nebenprodukts verhindern lassen.

Das als 11-Desoxycortisol-21-acetat identifizierte Nebenprodukt NP2 kann unter den Bedingungen der Fermentation weder auf chemischem noch enzymatischem Weg gebildet werden. Eine genaue  $^1\text{H-NMR}$ -Analyse des für die Umsetzung eingesetzten

Substrats 11-Desoxycortisol ergab, dass dieses bereits mit 11-Desoxycortisol-21-acetat verunreinigt war, das bei der Biotransformation angereichert wurde.

Des Weiteren konnten gezeigt werden, dass mit einem Fed-Batch-Prozess eine höhere Biomasseproduktion möglich ist als mit einem reinen Batch Prozess, wenn auch mit geringerer Wachstumsrate auf Grund der C-Quellen-Limitierung im Fed-Batch. Für eine weitere Optimierung sowohl der Umsatzrate als auch der Biomasseproduktion wäre die Verwendung eines induzierbaren Systems notwendig, da die ohnehin schon geringe Wachstumsrate im Fed-Batch-Prozess durch die konstitutive Expression der *CYP11B1* Gene weiter sinkt.

Mit dem CAD1-Stamm konnte die Bildungsrate von Hydrocortison durch Optimierung der Fermentation von  $51,3 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  auf  $75,5 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  gesteigert werden. Durch die zusätzliche Kopie des *CYP11B1* Gens im CAD13-Stamm ließ sich die Aktivität weiter auf  $91,5 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  erhöhen. Eine Abhängigkeit der Umsatzrate vom gelösten Sauerstoff konnte nicht nachgewiesen werden, obwohl Sauerstoff als Co-Faktor bei dieser Umsetzung (Hydroxylierung) eine entscheidende Größe darstellt. Schließlich konnte durch Optimierung der verschiedenen Fermentationsparameter (Zulaufverfahren, Medium, pH-Wert Biomasseproduktion) die Hydrocortison-Bildungsrate für den CAD13-Stamm auf  $168 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$  gesteigert werden, d.h. um mehr als 100 % im Vergleich zum CAD1-Stamm.

Problematisch beim Fed-Batch-Prozess ist es allerdings, dass die höchsten Bildungsraten für Hydrocortison erst bei Glucose-Konzentrationen  $> 10 \text{ g/L}$  erreicht werden, was gleichzeitigen Bildung von hohen Mengen an Acetat und Ethanol führt. Eine Anreicherung dieser Metaboliten in toxischen Konzentrationen im Medium über die Prozessdauer ist daher prinzipiell nicht zu vermeiden für eine hohe Biomasseproduktion jedoch kontraproduktiv.

Die Produktivität des Schering Prozesses mit *C. lunata* ist ca. um den Faktor 100 höher, so dass eine Ablösung des bestehenden Prozesses durch eine Fermentation mit *S. pombe* derzeit nicht sinnvoll erscheint. Zudem ist es mit der hier verwendeten *CYP11B1*-Monooxygenase keine Umsetzung von 11-Desoxycortisol-17-acetat möglich (s. 5.5.5). Hierfür müsste zuerst das Substratspektrum von *CYP11B1* auf 11-Desoxycortisol-17-acetat erweitert werden.



### 6.3 Steroid-Biotransformation mit *Aspergillus nidulans*

Der neu entwickelte Fluoreszenz-Assay wurde im letzten Teil der vorliegenden Arbeit zudem als Screening-System validiert. Dazu wurden neun verschiedene Stämme auf Hydroxylase-Aktivität bezüglich 11-Desoxycortisol getestet. Als Referenz dienten hierbei der rekombinante *S. pombe* Stamm CAD13 und *C. lunata*. Dieser bei Schering zur Produktion von Hydrocortison verwendete Stamm bildet Hydrocortison und mehrere Nebenprodukte bei Einsatz von 11-Desoxycortisol als Substrat [4-6].

Nach der Inkubation von 11-Desoxycortisol sowohl mit *A. nidulans* wie mit *P. citronellolis* ergab der Fluoreszenz-Assay hohe Fluoreszenzintensitäten für das Produktgemisch. In einem zweiten Screening-Schritt wurden die Produkte dieser beiden Umsetzungen mit *A. nidulans* und *P. citronellolis* durch HPLC analysiert. In beiden Fällen zeigte sich in den Chromatogramme einen Peak mit einer Retentionszeit ähnlich der von Hydrocortison. Die HPLC/MS-Analyse im nächsten Schritt ergab aber, dass nur bei der Umsetzung mit *A. nidulans* ein hydroxyliertes Desoxycortisol gebildet wurde ( $m/z$  362). Mit  $^1\text{H-NMR}$  wurde für dieses Produkt die  $11\alpha$ -Hydroxycortisol-Struktur gesichert. Die Bildungsrate für dieses pharmakologisch unwirksame *epi*-Hydrocortison durch *A. nidulans* ( $865 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$ ) liegt um den Faktor fünf höher als die für Hydrocortison ( $168 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$ ) bei dem rekombinanten *S. pombe* CAD13-Stamm. Mit 11-Desoxycortisol-17-acetat als Substrat konnte durch HPLC-Analytik gezeigt werden, dass hierbei Hydrocortison mit einer ähnlichen Umsatzrate ( $177 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$ ) wie bei *S. pombe* CAD13 gebildet wird. Es ist zu vermuten, dass mit 11-Desoxycortisol-21-acetat (EAS) oder -17,21-diacetat als Substrat die Menge an gebildetem Hydrocortison sich weiter erhöhen ließe, doch standen diese beiden Substanzen nicht in hinreichender Menge für einen Test zur Verfügung.

Da mit 11-Desoxycortisol als Substrat ausschließlich *epi*-Hydrocortison gebildet wurde, ist eine hohe Regio- und Stereoselektivität der hierbei aktiven Monooxygenase anzunehmen. Daher wurde als weiteres Substrat Progesteron eingesetzt:  $11\alpha$ -Hydroxyprogesteron ist ein starker Inhibitor der humanen  $11\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (HSD) und somit ein pharmakologisch interessantes Produkt. Tatsächlich ergab die Analyse der Inkubation von Progesteron mit *A. nidulans* durch HPLC und  $^1\text{H-NMR}$  die ausschließliche Bildung von  $11\alpha$ -Hydroxyprogesteron mit einer nicht optimierten Bildungsrate von  $705 \mu\text{M}\cdot\text{d}^{-1}$ .

Eine solche regio- und stereoselektive Hydroxylierung von 11-Desoxocortisol und Progesteron durch *A. nidulans* ist bislang nicht beschrieben.

Durch die vollständige Sequenzierung des Genoms von *A. nidulans* und die darauf aufbauende Sequenz-Datenbank konnten bis jetzt 40 P450-Sequenzen identifiziert werden (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>). Ein Vergleich mit der Protein-Protein-BLAST-Analyse ergab für viele der *A. nidulans*-Sequenzen eine hohe Identität (> 80 %) mit Sequenzen aus *A. niger*, bei dem viele P450-Monooxygenasen bereits charakterisiert sind. Beim Vergleich aller 40 P450 Sequenzen über Protein-Protein-BLAST konnte jedoch keine Monooxygenase identifiziert werden, die verantwortlich für die gefundenen Reaktion sein könnte. Für 22 P450-Sequenzen wurden keine homologen Sequenzen aus *A. niger* gefunden, während die übrigen 18 Sequenzen hohe Homologie zu bekannten *A. niger* P450-Monooxygenasen zeigen. Diese kommen jedoch auf Grund ihres Substratspektrums nicht für die Hydroxylierung von Steroiden in Frage.

## 7 Material und Methoden

### 7.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Soweit nicht anders vermerkt, sind die jeweiligen Hersteller bzw. Vertriebsniederlassungen in Deutschland ansässig. Neben den hier aufgeführten Arbeitsmitteln und Geräten wurden gängige Laborgegenstände (Glasgeräte, Pipetten, Magnetrührer usw.) verwendet.

#### 7.1.1 Geräteliste

Abgasanalyse	Maihak UNOR 611 (Maihak , Hamburg)
Autoklav	PACS 2000 (Getinge AB, Schweden)
Brutschränke	WTE (Binder, Tuttlingen), UM500 (Memmert, Schwabach)
Fermenter	Labfors 5 L Fermenter mit IRIS 4.11 Software 4.11 (Infors, Bottmingen, Schweiz)
Fluorophotometer	Fluostar Optima (BMG, Offenburg)
Glucosemonitor	YSI 2700 Select (Yellow Springs Instruments, Ohio, USA)
HPLC	10AVP mit SPD M10AVP DAD Detektor (Shimadzu, Duisburg)

HPLC/MS	HPLC/MSD Serie 1100 Binäre Pumpe G1312A Degasser G1322A Autosampler G1313A UV-Detektor G1314A Massenselektiver Detektor G1946A (Agilent, Böblingen)
HPLC Säulen	C18 Analytisch: Nucleosil C18 100 Å 5µm (Macery-Nagel, Düren) C18 Präparativ: Reprosil C18 100 Å 5µm (Trentec, Gerlingen)
Inkubatoren	Mutitron HT Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz)
Küvetten	1 mL-Plastikküvetten (Greiner, Frickenhausen), 1 mL-Glasküvetten (Hellma Optik, Jena)
Mikrotiterplatten	PP Flachbodenmikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, schwarz (Nunc, Frickenhausen)
NMR-Spektroskopie ( <sup>1</sup> H)	ARX 500 (Bruker, Karlsruhe) mit 500 MHz ( <sup>1</sup> H) Nominal-frequenz.  Durchgeführt als Auftragsanalysen bei der maßanalytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie und Isotopen- Forschung der Universität Stuttgart
pH-Meter	Digital pH-Meter 525 (WTW, Weilheim), pH-Meter 620 (Metrohm, Herisau, Schweiz)

Photometer	UV/VIS-Spektrometer Ultrospec3000 und BioChrom4060 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-134, Wasserbad B-480 und Vakuum System B-172 (Büchi, Flawil, Schweiz)
SDS-PAGE	Minigel-Twin G42 (Biometra, Göttingen), Model 583 Gel Dryer (Biorad Laboratories, München), Wipptisch ROCKY (Labor-technik Fröbel, Lindau)
Spektrofluorophotometer	Luminescence Spectrometer LS30B (Perkin & Elmer, Rodgau – Jügesheim)
Ultraschallgerät	Sonifier 250 (Branson, Danbury, USA)
Waagen	MC1 Research RC210D, BP4100, BP2100S (Sartorius, Göttingen), HF2000G (A&D Engineering, Milpitas, USA)
Wärmeschrank	Modell 500 (Memmert, Schwabach)
Wasserbadschüttler	Modell HT (Infors, Bottmingen, Schweiz)
Vortexer	VF2 (IKA Labortechnik, Staufen), IKA Minishaker MS1 (IKA Labortechnik, Staufen)
Zentrifugen	Zentrifuge 5416, 5417C, 5417R und 5810R mit Einsätzen für Kunststoffgefäße (0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL; 15 mL; 50 mL) und Mikrotiterplatten (Eppendorf, Hamburg),

Sorvall RC-5B und RC-5C Refrigerated Superspeed Centrifuge (DuPont Instruments, Leipzig) mit Rotoren SLA3000, SA600 und SS34

### 7.1.2 Chemikalien und Enzyme

DIFCO-Laboratories (Detroit, USA)

Trypton, Hefeextrakt

Fluka Chemie (Buchs, Schweiz)

Aceton, Acetonitril, Agar, D-Biotin, Borsäure,  $\text{CaCl}_2$  Dihydrat, Chloroform,  $\text{CoCl}_2$  Hexahydrat, Coomassie Brilliant Blue R-250,  $\text{CuSO}_4$  Pentahydrat, Dextran Blau, Dichlormethan, DMF DMSO, Essigsäure 99,8 %, Ethanol,  $\text{FeCl}_3$  Hexahydrat,  $\text{FeSO}_4$ , Heptahydrat,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Glucose, Glutaminsäure, Glycerol, Harnstoff,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  konz., HCl konz., Hefe-Extrakt, IBMK, Inositol, Kaliumhydrogenphthalat, KCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KI, Leucin, Lysozym (aus Hühnereiweiss), Meso-Inositol,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  Heptahydrat,  $\text{MgSO}_4$  wasserfrei,  $\text{MnSO}_4$  Monohydrat, Molybdänsäure, NaCl, Na-EDTA,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaMoO}_4$  Dihydrat, NaOH, NaOAc,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Nicotinsäure, Panthothensäure, Pyridoxin, SDS, Silica Gel Blue, Tetrahydrofuran, Thiamin, Triethylamin, Uracil, Zitronensäure,  $\text{ZnSO}_4$  Heptahydrat

Roth GmbH (Karlsruhe)	Rotiphorese NF-Acrylamid / Bisacryl-amid-Lösung 40%, Acrylamid-Lösung für SDS-PAGE, Trypton, Hefeextrakt
Riedel-de-Haen (Seelze)	Tris-(hydroxymethyl) Aminomethan
Sigma Aldrich (Deisenhofen)	11-Desoxycortisol, Hydrocortison, Cortison
Schering AG (Bergkamen)	MAS, MAF, EAF, EAS
Merck (Darmstadt)	LiChrosolv <sup>®</sup> Wasser
Böhringer Mannheim (Mannheim)	Enzymatische Testkits für Glucose-, Ethanol- und Acetatbestimmung

### 7.1.3 Kulturmedien

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Lösungen 30 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung fester Nährböden wurden die Medien vor dem Autoklavieren mit 15 g/L Agar versetzt. Die Glucose in allen Medien wurde separat autoklaviert und anschließend zum Medium gegeben. Die Vitaminlösungen wurden nicht autoklaviert sondern steril filtriert (Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,22 µM).

LB-Medium (low salt):	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L
	pH-Wert	7,0
YE High Glucose Medium	Glucose	30 g
	Hefeextrakt	5 g
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L
	pH-Wert	6,0

YE Low Glucose Medium	Glucose	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L
	pH-Wert	6,0
AN-Medium	Glucose	30 g
	Hefeextrakt	5 g
	Methionin-Lösung	1,25 mL
	Arginin-Lösung	5 mL
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L
EMM-Medium	Kaliumhydrogenphthallat	3 g/L
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,2 g/L
	NH <sub>4</sub> Cl	5 g/L
	Glucose	20 g/L
	50 x Salzlösung	20 mL/L
	1000 x Vitaminlösung	1 mL/L
	10.000 x Minerallösung	0,1 mL/
	Leucin	225 mg /L
	Thiamin	15 µM
50 x Salzlösung für EMM-Medium	MgCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	52,5 g/L
	CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0,735 g/L
	KCl	50 g/L
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g/L
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L
1000 x Vitaminlösung für EMM-Medium	Panθοthensäure	1 g/L
	Nicotinsäure	10 g/L
	Inositol	10 g/L
	Biotin	10 mg/L
10.000 x Minerallösung für EMM-Medium	Borsäure	5 g/L
	MnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	4 g/L



ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	4 g/L
FeCl <sub>3</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	2 g/L
Molybdänsäure	0,59 g/L
KI	1 g/L
CuSO <sub>4</sub> • 5 H <sub>2</sub> O	0,4 g/L
Zitronensäure	10 g/L

Die 50 x Salzlösung wurde getrennt autoklaviert und anschließend zum Medium zugegeben. Die 1000 x Vitaminlösung wurde stets frisch angesetzt, steril filtriert und zum abgekühlten, autoklavierten EMM-Medium gegeben. Die Salze der Minerallösung wurden einzeln im Volumen von je 50 mL angesetzt, steril filtriert und einzeln (je 0,1 mL) zum autoklavierten EMM-Medium gegeben. Leucin wurde nur bei Leucin auxotrophen Stämmen zugegeben. Thiamin wurde nur bei Über-Nacht-Kulturen zugegeben, zur Unterdrückung der Expression.

Fiechter-Medium	MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	1,2 g/L
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17,8 g/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,6 g/L
	NaCl	0,1 g/L
	Na-EDTA	0,27 g/L
	Glucose	20 g/L
	1000 x Salzlösung	1 mL/L
	100 x Vitaminlösung	10 mL/L
	Leucin	225 mg /L
Thiamin	15 µM	

1000 x Salzlösung für Fichter Medium	FeSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	100 mg/L
	ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	30 mg/L
	MnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	29 mg/L
	Borsäure	15 mg/L
	CoCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	5,6 mg/L
	NaMoO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	5 mg/L
	KI	2 mg/L
	CuSO <sub>4</sub> • 5 H <sub>2</sub> O	0,8 mg/L

100 x Vitaminlösung für Fichter Medium	Biotin	0,1 mg/L
	Inositol	160 mg/L
	Pantothenat	20 mg/L
	Pyridoxin	10 mg/L
	Nicotinsäure	15 mg/L

Die 1000 x Salzlösung wurde getrennt autoklaviert und anschließend zum Medium gegeben. Die 100 x Vitaminlösung wurde stets frisch angesetzt, steril filtriert und anschließend zum Medium gegeben. Leucin wurde nur bei Leucin auxotrophen Stämmen zugegeben. Thiamin wurde nur bei Über-Nacht-Kulturen zugegeben, zur Unterdrückung der Expression.

#### 7.1.4 Lösungen für Kultivierung und Expression

10 x Glucose Feeding Lösung	Glucose	200 g/L
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1l
Thiamin-Lösung	Thiamin	5 mM
Leucin Lösung	Leucin	22,5 mg/L
Methionin-Lösung	Methionin	0,5 mM
20 % Arginin-Lösung	Arginin	20 % (w/v)

#### 7.1.5 Puffer, HPLC-Laufmittel und andere Lösungen

Kaliumphosphat-Puffer	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25-100 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25-100 mM
	pH-Wert	6,0 – 8,0

Der pH-Wert des jeweiligen Phosphatpuffers wurde durch Titration von K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mit KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit äquivalenter Konzentration eingestellt.

HPLC Laufmittel	Acetonitril	60 %
	Wasser	40 %

Die Mischung der Laufmittel wurde durch den in der HPLC eingebauten Mischer automatisch durchgeführt. Es wurden nur Lösemittel der Chromasolv-Qualität eingesetzt.

Säuremischung für Fluoreszenz-Assay	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> konz.	80 %
	Essigsäure konz.	20 %

Die Säuremischung wurde lichtgeschützt gelagert.

EMM-Medium-Glycerol Mischung	EMM-Medium	50 %
	Glycerol (87 %)	50 %

Glycerol und EMM-Medium wurden getrennt autoklaviert und die Mischung vor jedem Gebrauch frisch angesetzt.

1 % Tween 80-Lösung	Tween 80	1 % (v/v)
---------------------	----------	-----------

Tween 80-Lösung wurde bei 121°C für 30 min autoklaviert.

10 % AN-Medium-Glycerol Mischung	AN Medium	7,83 mL
	Glycerol (87 %)	0,87 mL

0,9 % NaCl Lösung	NaCl	0,9 % (v/v)
-------------------	------	-------------

### 7.1.6 Standardlösungen für die HPLC-Analytik

Hydrocortison Lösung	Hydrocortison	0,1 mg
	Acetonitril	6 mL
	Wasser	4 mL

---

RSS Lösung	11-Desoxycortisol	0,1 mg
	Acetonitril	6 mL
	Wasser	4 mL
MAS Lösung	11-Desoxycortisol-17-acetat	0,1 mg
	Acetonitril	6 mL
	Wasser	4 mL
MAF Lösung	Hydrocortison-17-acetat	0,1 mg
	Acetonitril	6 mL
	Wasser	4 mL
EAF Lösung	Hydrocortison-21-acetat	0,1 mg
	Acetonitril	6 mL
	Wasser	4 mL

## 7.2 Mikrobiologische Methoden

### 7.2.1 Photometrische Bestimmung der Zelldichte

Für die Bestimmung der Zelldichte wurde bei allen verwendeten Stämmen die optische Dichte mittels Photometer bei 600 nm bestimmt. Hierfür wurden 1 mL Plastikkuvetten verwendet. Um Fehler bei der Bestimmung der Zelldichte zu vermeiden wurden 3-fach Messungen durchgeführt und die Zellsuspension bei einer Absorption  $>0,4$  mit dem verwendeten Medium oder einer 0,9 % NaCl-Lösung entsprechend verdünnt. Als Referenz wurde stets das verwendete Medium eingesetzt.

## 7.2.2 Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse wurden 15 mL Falcon-Tubes im Wärmeschrank bei 100°C für 4 Tage getrocknet und anschließend auf der Feinwaage ausgewogen. Die getrockneten Tubes wurden bis zur Verwendung im Exsikator unter Vakuum und Trockenmittel bei RT gelagert. Für die Messung der Biomasse wurde 10 mL Zellsuspension in ein getrocknetes Tube überführt, die Zellen bei 14.000 Upm für 15 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden im Wärmeschrank 7 Tage bei 100°C getrocknet und das Gewicht auf der Feinwaage bestimmt.

## 7.2.3 Stammhaltung und Kultivierung von *S. pombe*

### 7.2.3.1 Glycerol-Stock

Alle *S. pombe* Stämme wurden vom Institut für Biochemie Universität des Saarlandes auf EMM-Medium Platten, mit einer Thiaminkonzentration von 15 µM, ausplattiert. Von diesen Masterplatten wurden mittels Impföse einzelne Kolonien gepickt und in Über-Nacht-Kulturen angezogen. Für die Lagerung als Glycerol-Stock bei -80°C wurde 1 mL ÜN-Kultur mit 1 mL EMM/G-Mischung in einem 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß vermischt und anschließend bei -80°C gelagert.

### 7.2.3.2 Über-Nacht-Kultur

Für die Inokulation der ÜN-Kultur wurden EMM-Agar oder Fiechter-Agar Platten (Thiamin 15 µM), auf welchen 10 µL des Glycerol-Stocks mittels Drigalski-Spatel ausplattiert wurden, verwendet. Die beimpften Platten wurden 3 Tage bei 30°C im Wärmeschrank inkubiert. Zur Inokulation einer ÜN-Kultur wurde eine einzelne Kolonie mittels Platinimpföse gepickt. ÜN-Kulturen wurden mit EMM- oder Fiechter-Medium mit einem Volumen von 5 mL in Reagenzgläsern angesetzt. Alle ÜN-Kulturen enthielten 15 µM Thiamin zur Unterdrückung der Expression der einklonierten P450-Monooxygenasen. Die Inkubation der ÜN-Kultur erfolgte 16 h bei 30°C / 150 Upm.

### **7.2.3.3 *S. pombe* Vorkulturen bis 200 mL**

Für die Inokulation von Vorkulturen wurden 5 mL ÜN-Kultur pro 50 mL Medium verwendet. Für die Vorkulturen wurde thiaminfreies EMM- oder Fiechter-Medium verwendet. Je nach Ansatzgröße wurden Erlenmeyerkolben (ohne Schikanen) mit einem 5-mal größeren Volumen als das Mediumvolumen verwendet. Die Inkubationszeit betrug 8-16 h je nach verwendetem Stamm, bei 30°C / 150 Upm.

## **7.2.4 Stammhaltung und Kultivierung von *A. nidulans***

### **7.2.4.1 Sporen Glycerol-Stock**

Für die Herstellung von Sporen Glycerol-Stocks wurde eine Agar Platte mit AN-Medium mit 10 µL *A. nidulans* Sporen beimpft. Die Platten wurden für 7 Tage bei 30°C inkubiert. Um die Sporen zu ernten wurde 5 mL 1 % Tween 80 Lösung auf die Platte gegeben und die Sporen vorsichtig mit einem Drigalski-Spatel vom Pilzmycel geschabt. Mit einer Pipette wurde die Sporensuspension von der Platte entfernt und in ein 15 mL Falcon-Tube überführt. Die Sporen wurden für 5 min bei 8000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und die Sporen zweimal mit autoklaviertem Wasser gewaschen (Zentrifugation; 8000 Upm für 5 min zwischen den Waschschrritten). Nach dem letzten Waschschrritt wurden die Sporen in einer AN-Medium-Glycerol Mischung resuspendiert und bei -80°C gelagert.

### **7.2.4.2 Kultivierung von *A. nidulans* bis 400 mL**

Die Kultivierung von *A. nidulans* erfolgte ausschließlich in AN-Medium in 1 L Erlenmeyerkolben (ohne Schikanen). Die Kolben wurden mit 10 µL des Sporen-Glycerol Stocks inokuliert und bei 30°C/ 120 Upm im Wasserbadschüttler inkubiert. Die Inkubationsdauer variierte je nach Versuch zwischen 3 und 7 Tagen.

## 7.3 Analytische Methoden

### 7.3.1 HPLC-Analytik

Die HPLC (high performance liquid chromatography) ist ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie. Sie stellt ein Trennverfahren dar, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird. Je nach Art der Wechselwirkung zwischen stationärer Phase, mobiler Phase und Probe unterscheidet man in der Flüssigkeitschromatographie folgende Trennmechanismen: Adsorptions-, Verteilungs-, Ionenaustausch-, Ausschluss- und Affinitätschromatographie. Bei der HPLC finden hauptsächlich die Verfahren der Adsorptions- und Verteilungschromatographie Anwendung. Bei der Adsorptionschromatographie werden die Probenmoleküle durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen reversibel an die stationäre Phase gebunden. Die Verweildauer der Substanzen an der stationären Phase ist aufgrund der unterschiedlich starken Wechselwirkung mit der Oberfläche der stationären Phase unterschiedlich lang. So werden die Probesubstanzen voneinander getrennt. Bei der Verteilungschromatographie nutzt man die unterschiedliche Löslichkeit der zu trennenden Substanzen in den beiden Phasen aus. In der Normalphasen-Verteilungs-Chromatographie ist die stationäre Phase polarer als die mobile Phase, in der Reversed-Phase (RP-Umkehrphase)-Chromatographie ist die mobile Phase polarer als die stationäre Phase. Die stationäre Phase kann an ein Trägermaterial chemisch gebunden werden oder das Trägermaterial wird einfach mit der stationären Phase belegt. Die Reversed-Phase-Chromatographie wird vorwiegend bei unpolaren oder wenig polaren Substanzen angewendet.

In der HPLC unterscheidet man zwei Arbeitsweisen:

#### 1. Isogradisch:

Dabei bleibt die Zusammensetzung des Eluenten und die Fließmittelstärke während des Trennvorganges konstant.

## 2. Gradientenelution:

Der Eluent wird während des Trennvorgangs variabel zusammengesetzt und die Fließmittelstärke erhöht.

Ein HPLC-Gerät besteht aus 4 Hauptteilen: Pumpe, Einspritzsystem, Trennsäule und Detektor mit Auswertsystem. Die HPLC verwendet Trennpartikel mit Korngrößen von 3 bis 10  $\mu\text{m}$ ; sie erreicht damit hohe Trennstufenzahlen, erfordert aber gleichzeitig die Überwindung eines relativ hohen Gegendrucks beim Transport der mobilen Phase durch die dünne Trennsäule (2-6 mm Durchmesser). Alle Teile müssen möglichst totvolumenfrei miteinander verbunden werden und druckstabil sein (bis ca. 300 bar). Bei der Probenaufgabe wird die Probe zunächst drucklos in eine Probenschleife (Loop) injiziert, die sich in einem 4-Wege-Ventil befindet. Durch Umschalten wird der Elutionsmittelstrom dann durch die Probenschleife geführt, wodurch die Probe in die Säule gelangt. Die analytische Trennsäule, meist aus Edelstahl, sollte thermostatisierbar sein. Zur Detektion werden UV/VIS-, Fluoreszenzspektrometer, RI-amprometrische und Leitfähigkeits-Detektoren mit Durchflusszellen verwendet.

### Ergebnisdarstellung im Chromatogramm:

Die Darstellung des Ergebnisses der Stofftrennung erfolgt in Form eines Chromatogramms. Dies stellt die Abhängigkeit für die Menge (Konzentration) der eluierten Substanzen von der Zeit dar. Die einzelnen Stoffe haben unterschiedliche Retentionszeiten. Die Gesamtretentionszeit  $t_R$  setzt sich aus der Nettoretentionszeit  $t_S$  (Aufenthalt in der stationären Phase) und der Durchflusszeit der mobilen Phase (ohne Retention)  $t_m$  zusammen.

#### 7.3.1.1 Probeaufbereitung für HPLC-Analyse

Für die Analyse von Steroid-Gemischen aus Biotransformationen mit *A. nidulans* und *S. pombe* wurden die Proben nach folgendem Schema für die Analyse mittels HPLC aufbereitet. Für die Messung von Raum-Zeit-Ausbeuten bei der Umsetzung von RSS oder MAS wurde im Allgemeinen ein Probenvolumen von 1 mL verwendet. Im Gegensatz zu Biotransformationen mit *A. nidulans* wurden bei Umsetzungen mit *S. pombe* die Zellen vor dem Extraktionsschritt nicht abzentrifugiert. Die Extraktion



erfolgte mit 200  $\mu\text{L}$  IBMK. Das Extraktionsmischung wurde 2 min in einem 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß gevortext und anschließend 5 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert. 100  $\mu\text{L}$  der organischen Phase wurde bei 60 °C im Wärmeschrank für 12 h getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet in 100  $\mu\text{L}$  Acetonitril : Wasser (60 : 40) resuspendiert.

### 7.3.1.2 Analytische HPLC-Methode

Für die Analyse der aus Medium extrahierten Steroide wurde eine analytische HPLC-Säule (4,5 mm x 250 mm), Nucleosil C18 100 Å 5 $\mu\text{m}$  von Macery-Nagel verwendet. Das Fließmittel bestand aus einer Mischung von Acetonitril : Wasser (60 : 40) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min. Das Probenvolumen betrug 30  $\mu\text{L}$ , welches manuell über einen 20  $\mu\text{L}$  Loop auf die Säule aufgetragen wurde. Die Standard-Lösungen wurden wie unter Abschnitt 7.1.6 beschrieben in Acetonitril : Wasser (60 : 40) gelöst. Je nach Experiment wurden die betreffenden Hormon-Standards vor jeder Messreihe aufgetragen und die Retentionszeiten bestimmt. Die Detektion erfolgte mittels eingebauten Dioden-Array-Detektor (DAD) bei einer Wellenlänge von 244 nm.

### 7.3.1.3 Präparative HPLC-Methode

Für die Aufreinigung und Auftrennung von Steroid-Gemischen wie unter Abschnitt 7.3.1.4 beschrieben, wurde eine präparative HPLC-Säule (4,5 mm x 250 mm) der Firma Trentec eingesetzt. Als Säulenmaterial wurde Reprosil C18 100 Å 5  $\mu\text{m}$  verwendet. Wie auch bei der analytischen HPLC-Methode wurde als Fließmittel ein Acetonitril : Wasser (60 : 40) Gemisch bei einer Fließgeschwindigkeit von 4 mL/min verwendet. Das Probenvolumen betrug 2,2 mL und wurde manuell über einen Loop mit einem Volumen von 2 mL auf die Säule aufgetragen. Vor jeder Aufreinigung wurden die entsprechenden Retentionszeiten mittel Standard-Lösungen bestimmt.

#### 7.3.1.4 Aufreinigung von Steroid-Gemischen für die NMR-Analyse

Für die Identifizierung der Steroide mittels NMR wurde eine Biotransformation mit einem Gesamtvolumen von 400 mL vollständig extrahiert. Bei Verwendung von *S. pombe* wurden die Zellen vor der Extraktion nicht abzentrifugiert. Die Extraktion erfolgte in einem 1 L Scheidetrichter. Die Zellsuspension wurde dreimal mit je 200 mL IBMK extrahiert. Die organischen Phasen wurden gesammelt und mit MgSO<sub>4</sub> (wasserfrei) getrocknet. Das Lösemittel wurde im Rotationsverdampfer bei einer Wassertemperatur von 60 °C und einem Druck von 50 mbar abgezogen. Das getrocknete Substanzgemisch wurde in 30 mL Acetonitril : Wasser Gemisch (60 : 40) resuspendiert.

Nach Auftragung auf die präparative Säule wurden die einzelnen Hormone über die vorher bestimmte Retentionszeit manuell fraktioniert. Hierzu wurden die im DAD angezeigten Peaks direkt nach dem Detektor abgenommen. Die gesammelten Fraktionen wurden zur Entfernung des Acetonitrils mit Stickstoff begast. Die Trocknung der Proben erfolgte im Exsikator unter Vakuum mittels Silica Blue bei RT.

#### 7.3.1.5 Steroid-Analyse mittel HPLC/MS

Die HPLC/MS Analyse wurde am Institut für Klinische Pharmakologie das Robert-Bosch-Krankenhaus durchgeführt. Auch hier wurde für die HPLC eine analytische Nucleosil C18 100 Å 5 µm Säule (250 mm x 4 mm) der Firma Macher-Nagel verwendet. Als Fließmittel wurde ein Acetonitril : Wasser : Essigsäure Gemisch (59 : 40 : 1) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min eingesetzt. Die Probenauftragung erfolgte mittels Autosampler mit einem Probenvolumen von 10 µL. Die Steroid-Gemische sowie die Steroid-Standards waren in einem Acetonitril : Wasser Gemisch (60 : 40) gelöst.

Die Einstellungen für das Massenspektrometers waren wie folgt:

Ionisierungsart:	positiv-ESI
Scanweite:	150 bis 450 Da
Fragmentor:	70
Gas Fluss:	10.0 L/min

Gas Temperatur: 350°C  
Nebulizer Druck: 25 psi  
Spannung: 3500 V

Durch die Ionisierung mittels Elektronenspray konnte keine Fragmentierung der Substanzen erreicht werden.

#### 7.3.1.6 Quantifizierung von Steroiden durch HPLC-Analyse

Für die Quantifizierung der Steroide mittel HPLC wurden Kalibriergeraden für 11-Desoxycortisol, Hydrocortison, MAS und MAF erstellt. Die Kalibriergerade wurde mit folgenden Steroid-Konzentrationen erstellt: 0,2 µM, 1 µM, 5 µM, 55 µM, 275 µM, 550 µM, 2800 µM. Es wurde eine dreifache Bestimmung für jede Steroid-Konzentration durchgeführt und der Mittelwert der Peakflächen bestimmt. Für diese Messreihen wurde ebenfalls eine analytische Nucleosil C18 100 Å 5 µm Säule verwendet. Die Flussrate betrug 0,5 mL/min.

#### 7.3.2 Fluoreszenz-Analytik

Um die Hydrocortison-Bildung während der Fermentation von *S. pombe* und *A. nidulans* zu überwachen, wurde ein alternatives Nachweissystem entwickelt, welches auf der Bildung eines Fluoreszenz Farbstoffes durch Protonierung der Hydroxy-Gruppen der Steroid-Moleküle beruht. Details für die im Assay ablaufenden Reaktionen werden in Abschnitt 6.1 eingehend diskutiert. Die Entwicklung und Optimierung dieses Assays ist im Abschnitt 5.1.3 dargestellt. Die unter 5.3.2.1 beschriebene Durchführung stellt die optimierte und bei allen Experimenten verwendete Methode für diesen Assay dar.

### 7.3.2.1 Fluoreszenz-Assay

Die für den Assay verwendete Säuremischung erfordert eine Verwendung von säurestabilen Reaktionsgefäßen aus Glas oder Polypropylen (PP). Die Säuremischung muss lichtgeschützt gelagert werden und hat eine Haltbarkeit von ca. 6 Monaten.

Für die Extraktion der Steroide aus wässrigem Medium wurde wie bei der Analytik mittels HPLC mit IBMK extrahiert. Sofern nicht anders angegeben betrug das Probenvolumen für den Fluoreszenz-Nachweis 1 mL. Bei Verwendung von *S. pombe* wurden die Zellen vor der Extraktion nicht abzentrifugiert. Die Proben wurden mit 200 µL IBMK in einem 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß gemischt und für die Extraktion 1 min gevortext. Zur Phasentrennung wurden die Proben bei 14.000 Upm für 5 min zentrifugiert. 100 µL der organischen Phase wurde in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 150 µL Säuremischung versetzt. Direkt nach der Zugabe wurde die Reaktionsmischung 1 min gevortext. Nach 18 Minuten Reaktionszeit bei RT wurden je 200 µL in eine schwarze NUNC 96 Well (PP) Microtiterplatte überführt. Die Messung erfolgte im Fluorometer bei Ex: 470 nm, Em: 525 nm.

### 7.3.2.2 Steroid Quantifizierung mittels Fluoreszenz-Assay

Zur Quantifizierung wurden für jedes Steroid Kalibriergeraden erstellt. Sofern nicht anders angegeben, wurde die Kalibrierung mit folgenden Konzentrationen durchgeführt: 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2,7 µM, 5,5 µM, 11 µM, 16,5 µM, 22 µM, 25 µM, 28 µM.

Die Steroide wurden in den oben angegebenen Konzentrationen in IBMK gelöst bzw. unter Verwendung einer StammLösung verdünnt. Für jede angegebene Konzentration wurden 12 Einzelmessungen wie unter 5.3.2.2 durchgeführt. Der Mittelwert (2) aus den gemessenen Einzelmessungen wurde in den Diagrammen aufgetragen und der Standardfehler nach (1) berechnet.

$$(1) \quad S.E = \sqrt{\frac{\sum_{s=1}^m \sum_{i=1}^n Y_{is}^2}{(n_y - 1)(n_y)}}$$

s = Nummer der Datenreihe, i = Datenpunktnummer in Datenreihe s, m = Anzahl der Datenreihen des Punktes x im Diagramm, n = Anzahl der Punkte je Datenreihe,  $Y_{is}$  = Datenwert der Datenreihe s und des i-ten Punktes,  $n_y$  = Gesamtzahl der Datenwerte aller Datenreihen.

$$(2) \quad M = \frac{\sum_{s=1}^m \sum_{i=1}^n Y_{is}}{n_y}$$

s = Nummer der Datenreihe, i = Datenpunktnummer in Datenreihe s, m = Anzahl der Datenreihen des Punktes x im Diagramm, n = Anzahl der Punkte je Datenreihe,  $Y_{is}$  = Datenwert der Datenreihe s und des i-ten Punktes,  $n_y$  = Gesamtzahl der Datenwerte aller Datenreihen.

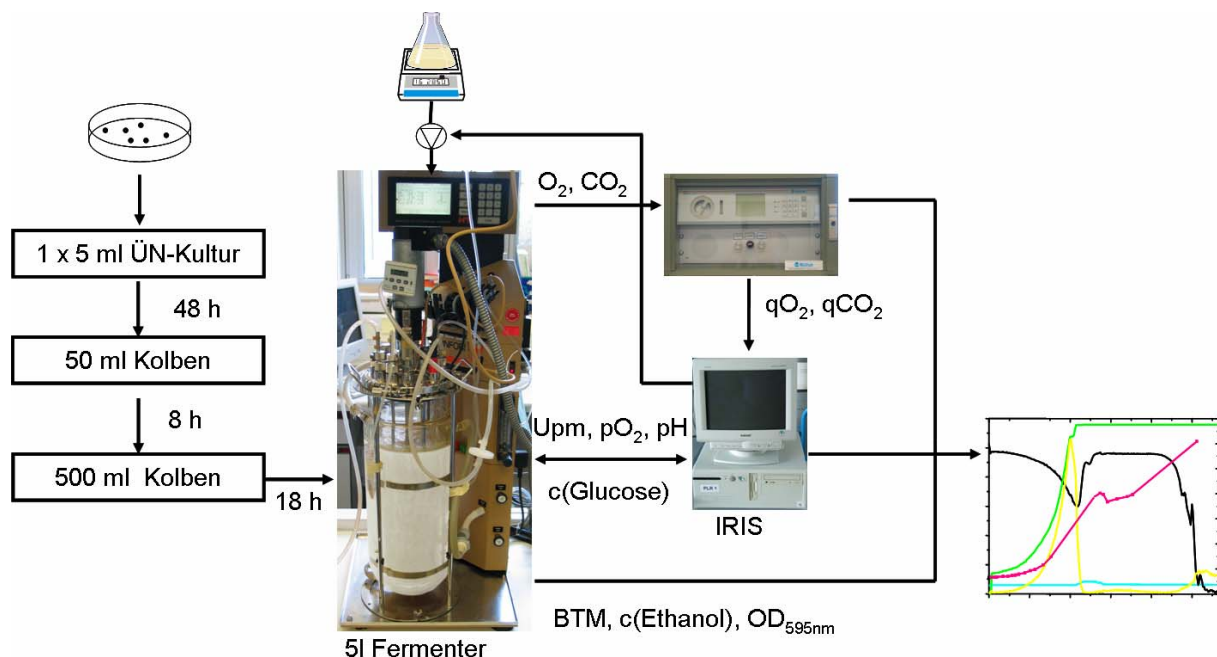
## 7.4 Fermentation

Für die Fermentationsoptimierung wurden Fermentationen im Maßstab 5 L und 30 L durchgeführt. Hierbei wurden einige Fermentationsparameter bzgl. des Wachstums der Zellen und der Bildungsrate von Hydrocortison optimiert. Die in Abbildung 69 und 70 dargestellten Schemata zeigen den Grundsätzlichen Aufbau der Fermentationsexperimente sowie die verschiedenen Messstationen und die daraus resultierenden Datenflüsse. Die in beiden Abbildungen gezeigte Animpfprozedur stellt den bereits optimierten Verlauf dar.

### 7.4.1 Versuchsaufbau der 5 L- und 30 L-Fermentationsexperimente

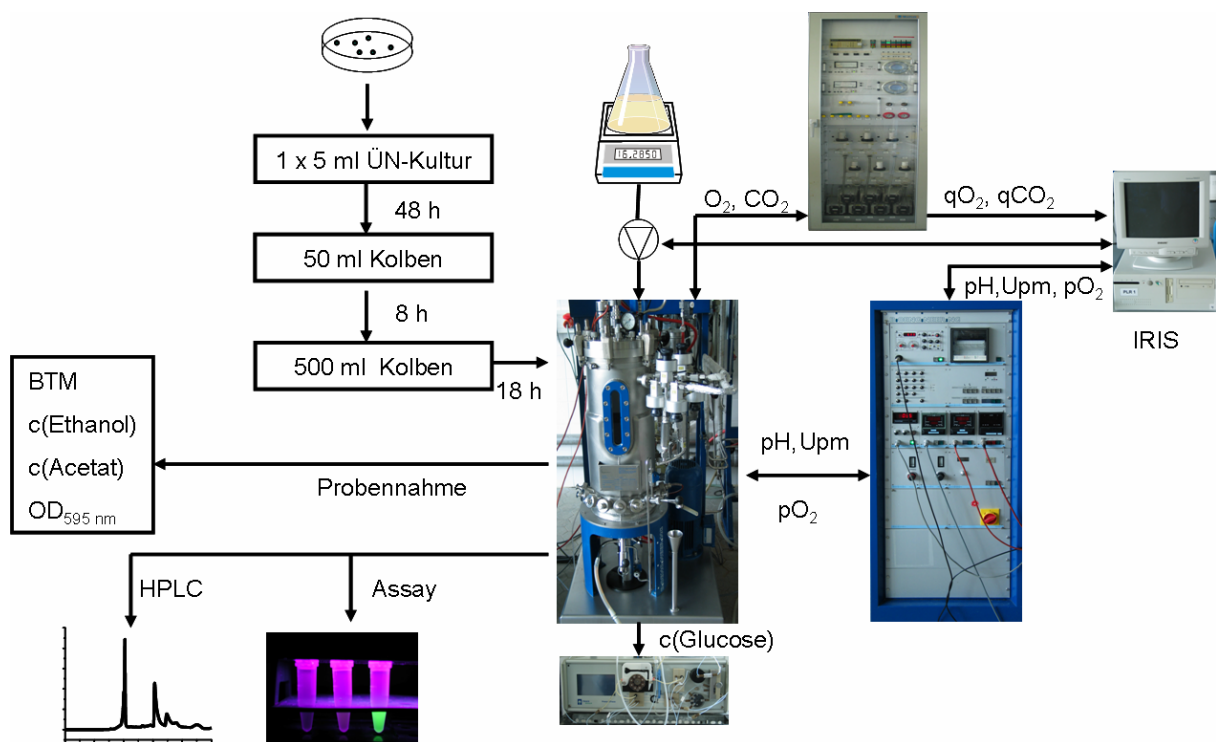
Die Beimpfung des Fermenters erfolgte, wie in Abbildung 69 und 70 dargestellt, mittels einer 500 mL Kultur. Je nach verwendetem Medium wurden die Hauptsalze im Fermenter, die Glucose-Lösung jedoch getrennt autoklaviert und nach dem

Abkühlen zugegeben. Die Spurenelemente und die Vitamine wurden anschließend steril in den Fermenter filtriert. Das Animpfvolumen wurde so gewählt, dass die resultierende Start-OD im Fermenter einen Wert im Bereich von 0,1 – 0,3  $OD_{600}$  aufwies. Je nach Experiment wurde im Fed-Batch Prozess als Zulauf 5-fach (100 g/L) bzw. 10-fach (200 g/L) konzentrierte Glucose-Lösung und 5-fach konzentriertes EMM- bzw. Fiechter-Medium (ohne C-Quelle) verwendet. Die Steuerung des pH-Wertes, der Umdrehung, des Zuluftstroms sowie der Temperatur erfolgte mittels PC und der Steuerungssoftware IRIS 4.1. Die Glucosekonzentration wurde in 5 min Intervallen über einen Glucosemonitor gemessen und der Zulauf entsprechend über das Steuerungsprogramm geregelt. Die Bestimmung der Biotrockenmasse und der Optischen Dichte erfolgte wie unter Abschnitt 7.2.1 und 7.2.2 beschrieben. Die Bestimmung des Ethanol- und Acetat-Gehalts wurde mit Hilfe von Testkits (Böhringer Mannheim) nach Abschluss der Fermentation durchgeführt. Um mögliche Fehler bei der Bestimmung zu minimieren wurden die Zellen direkt nach der Probennahme für 10 min bei 8.000 Upm abzentrifugiert und der Überstand bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Die Messung der gelösten Sauerstoffs sowie des Abgas  $\text{CO}_2$ -Wertes erfolgte kontinuierlich über eine im Fermenter installierte Sauerstoffelektrode bzw. eine angeschlossene Abgasanalyse. Die Regulation des pH-Wertes wurde bei jeder Fermentation mittels 28 %-iger Ammoniumhydroxid-Lösung und 10 %-iger Phosphorsäure durchgeführt. Die Belüftung des Fermenters erfolgte über eine dynamische Regelung der Umdrehungszahl durch die Steuerungssoftware im Bereich von 300 – 800 Upm.



**Abbildung 69:** Schema der Fermentationsexperimente im 5 L Maßstab

Bei der Probennahme wurde ein Totvolumen von 10 mL (5 L Fermenter) bzw. 20 mL (30 L Fermenter) vor der eigentlichen Probe abgenommen. Das Probenvolumen für die Messung der Optischen Dichte, der Acetat-Konzentration der Ethanol-Konzentration sowie für die HPLC-Analytik und den Fluoreszenz-Assay betrug 10 mL. Bei zusätzlicher Bestimmung der Biofeucht- bzw. Biotrockenmasse wurde ein zusätzliches Volumen von 10 mL abgenommen. Die Proben für die HPLC-Analytik und den Fluoreszenz-Assay wurden direkt nach der Probennahme, wie im Abschnitt 7.3.1.1 und 7.3.2.1. beschrieben, mit IBMK extrahiert.



**Abbildung 70:** Schema der Fermentationsexperimente im 30 L Maßstab

Für die Bestimmung der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\max}$  wurde folgende Formel verwendet:

$$(3) \quad \mu_{\max} = \frac{\log m_2 - \log m_1}{t_2 - t_1}$$

$m_1$  = Biotrockenmasse zum Zeitpunkt  $t_1$ ,  $m_2$  = Biotrockenmasse zum Zeitpunkt  $t_2$

Hierbei wurden für  $m_1$  und  $m_2$  Biotrockenmasse-Werte aus der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen verwendet. Die Biotrockenmasse wurde bei allen

Messungen durch den ermittelten  $BTM/OD_{595nm}$  Koeffizienten aus den gemessenen  $OD_{595nm}$ -Werten errechnet.



## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Michal G (1999) Biochemical Pathways - Biochemie Atlas. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- [2] Koolman J, Röhm KH (1998) Taschenatlas der Biochemie. Thieme, Stuttgart
- [3] Schmid RD (2002) Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- [4] Zuidweg MHJ, Vanderwaard WF, Deflines J (1962) Biochimica Et Biophysica Acta 58:131-133.
- [5] Zuidweg MHJ (1968) Biochimica Et Biophysica Acta 152:144-158.
- [6] Wilmanska D, Milczarek K, Rumijowska A, Bartnicka K, Sedlaczek L (1992) Appl Microbiol Biotechnol 37:626-630.
- [7] Suzuki K, Sanga K, Chikaoka Y, Itagaki E (1993) Biochimica Et Biophysica Acta 1203:215-223.
- [8] Horhold C, Rose G, Kaufmann G (1981) Z Allg Mikrobiol 21:289-293.
- [9] Nakahara K, Shoun H, Adachi S, Iizuka T, Shiro Y (1994) J Mol Biol 239:158-159.
- [10] Garfinkel D (1958) Arch Biochem Biophys 77:493-509.
- [11] Klingenberg M (1958) Arch Biochem Biophys 75:376-386.
- [12] Omura T, Sato R (1964) J Biol Chem 239:2370-2378.
- [13] Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O (1993) DNA Cell Biol 12:1-51.
- [14] McLean MA, Maves SA, Weiss KE, Krepich S, Sligar SG (1998) Biochem Biophys Res Commun 252:166-172.
- [15] Nebert DW, Nelson DR, Feyereisen R (1989) Xenobiotica 19:1149-1160.

- 
- [16] Gonzalez FJ, Nebert DW (1990) Trends Genet 6:182-186.
- [17] Nebert DW, Gonzalez FJ (1987) Annu Rev Biochem 56:945-993.
- [18] Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ (1987) J Mol Biol 195:687-700.
- [19] Ravichandran KG, Boddupalli SS, Hasemann CA, Peterson JA, Deisenhofer J (1993) Science 261:731-736.
- [20] Sevrioukova IF, Li H, Zhang H, Peterson JA, Poulos TL (1999) Proc Natl Acad Sci U S A 96:1863-1868.
- [21] Li H, Poulos TL (1997) Nat Struct Biol 4:140-146.
- [22] Haines DC, Tomchick DR, Machius M, Peterson JA (2001) Biochemistry 40:13456-13465.
- [23] Park SY, Yamane K, Adachi S, Shiro Y, Weiss KE, Sligar SG (2000) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56 ( Pt 9):1173-1175.
- [24] Yano JK, Koo LS, Schuller DJ, Li H, Ortiz de Montellano PR, Poulos TL (2000) J Biol Chem 275:31086-31092.
- [25] Lee DS, Yamada A, Matsunaga I, Ichihara K, Adachi S, Park SY, Shiro Y (2002) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 58:687-689.
- [26] Podust LM, Poulos TL, Waterman MR (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:3068-3073.
- [27] Hasemann CA, Ravichandran KG, Peterson JA, Deisenhofer J (1994) J Mol Biol 236:1169-1185.
- [28] Cupp-Vickery JR, Poulos TL (1995) Nat Struct Biol 2:144-153.
- [29] Park SY, Shimizu H, Adachi S, Shiro Y, Iizuka T, Nakagawa A, Tanaka I, Shoun H, Hori H (1997) FEBS Lett 412:346-350.
- [30] Podust LM, Kim Y, Arase M, Neely BA, Beck BJ, Bach H, Sherman DH, Lamb DC, Kelly SL, Waterman MR (2003) J Biol Chem 278:12214-12221.

- [31] Yano JK, Blasco F, Li H, Schmid RD, Henne A, Poulos TL (2003) *J Biol Chem* 278:608-616.
- [32] Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE (2000) *J Inorg Biochem* 81:183-190.
- [33] Peterson JA, Graham, S. E. (1998) *Structure* 6:1079-1085.
- [34] Zheng YM, Henne KR, Charmley P, Kim RB, McCarver DG, Cabacungan ET, Hines RN, Rettie AE (2003) *Toxicol Appl Pharmacol* 186:119-126.
- [35] Werck-Reichhart D, Feyereisen R (2000) *Genome Biol* 1:REVIEWS3003.
- [36] Lippard SJ, Berg JM (1995) *Bioanorganische Chemie*. Spektrum Verlag, Heidelberg
- [37] Kaim W, Schwederski B (1995) *Bioanorganische Chemie*. Teubner, Stuttgart
- [38] Schlichting I, Berendzen J, Chu K, Stock AM, Maves SA, Benson DE, Sweet RM, Ringe D, Petsko GA, Sligar SG (2000) *Science* 287:1615-1622.
- [39] Newcomb M, Toy PH (2000) *Acc Chem Res* 33:449-455.
- [40] Hata M, Hirano Y, Hoshino T, Tsuda M (2001) *J Am Chem Soc* 123:6410-6416.
- [41] Berg D, Plempel M, Buchel KH, Holmwood G, Stroech K (1988) *Ann N Y Acad Sci* 544:338-347.
- [42] Durst F, O'Keefe DP (1995) *Drug Metabol Drug Interact* 12:171-187.
- [43] Feyereisen R (1999) *Annu Rev Entomol* 44:507-533.
- [44] Holton TA (1995) *Drug Metabol Drug Interact* 12:359-368.
- [45] Simpson AE (1997) *Gen Pharmacol* 28:351-359.
- [46] Zhao Y, Agarwal VR, Mendelson CR, Simpson ER (1997) *J Steroid Biochem Mol Biol* 61:203-210.
- [47] Kupfer D, Holm KA (1989) *Drug Metab Rev* 20:753-764.

- [48] Goldstein JA, Faletto MB (1993) *Environ Health Perspect* 100:169-176.
- [49] Gonzalez FJ (1992) *Trends Pharmacol Sci* 13:346-352.
- [50] Juchau MR (1990) *Life Sci* 47:2385-2394.
- [51] Ziegler GA, Vonrhein C, Hanukoglu I, Schulz GE (1999) *J Mol Biol* 289:981-990.
- [52] Grinberg AV, Hannemann F, Schiffler B, Muller J, Heinemann U, Bernhardt R (2000) *Proteins* 40:590-612.
- [53] Bureik M, Lisurek M, Bernhardt R (2002) *Biol Chem* 383:1537-1551.
- [54] Nelson DR (1998) *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 121:15-22.
- [55] Mornet E, Dupont J, Vitek A, White PC (1989) *J Biol Chem* 264:20961-20967.
- [56] Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Toda K, Miyahara K, Yokoyama Y, Nakao K, Hosoda K, Yamamoto Y, Imura H, Shizuta Y (1990) *FEBS Lett* 269:345-349.
- [57] Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Onishi T, Ichikawa Y, Yokoyama Y, Sumimoto H, Toda K, Miyahara K, Kuribayashi I, Nakao K (1990) *Biochem Biophys Res Commun* 173:309-316.
- [58] Wada A, Ohnishi T, Nonaka Y, Okamoto M, Yamano T (1985) *J Biochem (Tokyo)* 98:245-256.
- [59] Yanagibashi K, Hall PF (1986) *J Biol Chem* 261:8429-8433.
- [60] Nonaka Y, Takemori H, Halder SK, Sun T, Ohta M, Hatano O, Takakusu A, Okamoto M (1995) *Eur J Biochem* 229:249-256.
- [61] Matsukawa N, Nonaka Y, Ying Z, Higaki J, Ogihara T, Okamoto M (1990) *Biochem Biophys Res Commun* 169:245-252.
- [62] Domalik LJ, Chaplin DD, Kirkman MS, Wu RC, Liu WW, Howard TA, Seldin MF, Parker KL (1991) *Mol Endocrinol* 5:1853-1861.

- [63] Megges R, Müller-Frohne M, Pfeil D, Ruckpaul K (1990) Microbial Steroid Hydroxylation Enzymes in Glucocorticoid Production. Akademie Verlag, Berlin
- [64] Fischer A, Friel EC, Bernhardt R, Gomez-Sanchez C, Conell JM, Fraser R, Davies E (2001) J Clin Endocrinol Metab 86:4326-4329.
- [65] Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, Natarajan R, Gu JL, Nadler JL, White PC (1991) Mol Endocrinol 5:1513-1522.
- [66] Belkina NV, Lisurek M, Ivanov AS, Bernhardt R (2001) J Inorg Biochem 87:197-207.
- [67] Wood V, et al. (2002) Nature 415:871-880.
- [68] Bureik M, Schiffler B, Hiraoka Y, Vogel F, Bernhardt R (2002) Biochemistry 41:2311-2321.
- [69] Zakeljmaovic M, Plemenitas A, Komel R, Belic I (1990) J Steroid Biochem Mol Biol 35:627-629.
- [70] Bureik M, Hübel K, Dragan C-A, Scher J, Becker H, Lenz N, Bernhardt R (2004) Mol Cell Endocrinol 217:249-254.
- [71] Schiffler B, Bureik M, Reinle W, Müller EC, Hannemann F, Bernhardt R (2004) J Inorg Biochem 98:1229-1237.
- [72] Williams P, Keshavarz-Moore P, Dunnill P (2002) Enzyme Microb Technol 30:354-362.
- [73] Williams P, Keshavarz-Moore E, Dunnill P (1996) J Biotechnol 48:259-267.
- [74] Porter CC, Silber RH (1950) J Biol Chem 185:201-207.
- [75] Clark I (1955) Nature 175:123-124.
- [76] Szalkowski CR, O'Brien, M. G., Mader, W. J., (1955) Anal Chem 27:944-946.
- [77] Schulz EP, Neuss, J. D. (1957) Anal Chem 29:1662-1665.
- [78] Camerino B, Patelli B, Sciaky R (1961) Tetrahedron Lett 16:554-559.

- [79] Mattingly D (1962) J Clin Pathol 15:374-&.
- [80] Zaffaroni A (1950) J Am Chem Soc 72:3828.
- [81] Goldzieher JW, Bodenchuk JM, Nolan P (1954) Anal Chem 26:853-856.
- [82] Sweat ML (1954) Anal Chem 26:773-776.
- [83] Linford JH (1957) Can J Med Sci 35:299-325.
- [84] Goldberg HF, Linford JH (1958) Can J Med Sci 36:1221-1236.
- [85] Kalant H (1958) Biochem J 69:93-98.
- [86] Kalant H (1958) Biochem J 69:79-93.
- [87] Carstensen H (1966) Eur J Steroids 1:233-286.
- [88] Thiessen MM, Batsakis JG, Stiles DE, Shilling JM (1968) Am J Med Technol 34:81-88.
- [89] Pre J, Perret G (1974) Pathol Biol (Paris) 22:827-834.
- [90] Yasumori T (1997) Foreign Gene Expression in Fission Yeast Schizosaccharomyces pombe. Springer-Verlag, Berlin
- [91] Barford JP (1985) J Ferment Technol 63:495-500.
- [92] Kirk DN, Toms HC, Douglas C, White KA (1990) J Chem Soc Perkin Trans 2:1567-1594.

# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten

Name	Daniel Appel
Anschrift	Weißdornweg 11, 74348 Lauffen
Geburtsdaten	20.11.1973, Heilbronn
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

## Schulbildung

<b>09/1980 – 07/1985</b>	Grundschule, Lauffen
<b>09/1985 – 06/1994</b>	Hölderlin Gymnasium, Lauffen
	Abschluss: Abitur (Note: 2,9)

## Wehrdienst

<b>07/1994 – 06/1995</b>	Truppführer Luftwaffensicherungstruppe, Jagdbombergeschwader 34, Memmingen
--------------------------	---

## Hochschulausbildung

<b>10/1995 – 10/2001</b>	Studium der Technischen Biologie, Universität Stuttgart
	Diplom-Biologe, (Gesamtnote: sehr gut)

Thema Diplomarbeit: (Note: sehr gut)

„Entwicklung eines Assay-Systems für die Charakterisierung des Substratspektrums von verschiedenen P450 BM-3 Mutanten aus *Bacillus megaterium*“ am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart in Kooperation mit der BASF AG

<b>07/2002</b>	Auszeichnung der Diplomarbeit mit dem Preis der Technischen Biologie 2002 der Universität Stuttgart
----------------	---

**10/2001 – 02/2005**

Promotion am Institut für Technische Biochemie,  
Professor Dr. Rolf D. Schmid, Universität  
Stuttgart

Thema Dissertation:

„Entwicklung eines Hoch-Zell-Dichte Verfahrens zur Herstellung von Hydrocortison mit rekombinanter Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*“ in Kooperation mit der Schering AG Bergkamen.

**seit 02/2005**

Entwicklung von Methoden zur Immobilisierung von *Candida antarctica* Lipase B Mutanten in Kooperation mit DOW Chemical

**seit 02/2005**

Entwicklung von HPLC und GC Methoden zur Trennung von Tri-, Di-, und Monoacylglyceriden in Kooperation mit Nestlé

**Publikationen**

**09/2000**

Schwaneberg U, Appel D, Schmitt J, Schmid RD. 2000 *Journal of Biotechnology* 84

**06/2001**

Appel D., Lutz-Wahl S., Fischer P., Schwaneberg U., Schmid RD. 2001 *Journal of Biotechnology* 88

**02/2005**

Appel D., Dragan C., Urlacher V., Bureik M., Schmid RD. 2005 *Analytical and Bioanalytical Chemistry*