

Hydroxylierung bioaktiver Naturstoffe mit CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* - Screening, Biokatalyse und Produktcharakterisierung

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES
DES DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
DER NATURWISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHEN FAKULTÄT III
CHEMIE, PHARMAZIE, BIO- UND WERKSTOFFWISSENSCHAFTEN
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

von

Frau Dipl.-Biol. Daniela Schmitz

Februar 2013

Tag des Kolloquiums: 30.04.2013
Dekan: Prof. Dr. Volkhard Helms
Berichterstatter: Prof. Dr. Rita Bernhardt
Prof. Dr. Gert-Wieland Kohring
Vorsitzender: Prof. Dr Uli Müller
Akad. Mitarbeiter: Dr. Fozia Noor

Von einem gewissen Punkt an gibt es keine Rückkehr mehr.

Dieser Punkt ist zu erreichen.

Franz Kafka, Aphorismen

In Gedenken an meine Mutter Renate Rauf!

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes unter der Leitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. Rita Bernhardt durchgeführt.

Bei Frau Prof. Dr. Bernhardt bedanke ich mich an dieser Stelle für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit an ihrem Lehrstuhl anfertigen zu dürfen. Auch danke ich ihr für die interessante Fragestellung, ihr reges Interesse am Fortgang der meiner Arbeit sowie für die zahlreichen Diskussionen und Hilfestellungen, die dieses Forschungsvorhaben voran getrieben haben. Zudem danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit, an internationalen Kongressen teilnehmen zu dürfen.

Herrn Dr. Frank Hannemann danke ich besonders für sein Interesse an der Arbeit, die zahlreichen Diskussionen und seine konstruktiven Vorschläge. Besonders danke ich ihm für seine Hilfe und beruhigenden Worte, die über die ein oder andere Panikattacke geholfen haben. Besonderes danke ich ihm für die zahlreichen Tipps in Laufe der letzten Jahre und natürlich für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Joseph Zapp für das Messen und Auswerten der NMR Daten, seine Diskussionsbereitschaft sowie sein Engagement, mir die Feinheiten der NMR Analyse nahe zu bringen.

Ich danke auch Prof. Dr. Denis Pompon und Dr. Phillipe Urban, für die Möglichkeit LC-MS Messungen in ihrem Labor im CNRS in Gif-Sur-Yvette Paris durchführen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Manfred J. Schmitt danke ich für die Bereitstellung der HeLa Zellen und die Möglichkeit ein Teil der Zellkulturarbeiten in seinen Räumlichkeiten durchführen zu dürfen. Ich danke Frau Dipl.-Biol. Nina C. Müller, Herrn Dr. Björn Becker und besonders Herrn MSc. Guillaume Wendt für die zahlreichen Tipps und Hilfestellungen bei der Durchführung der Zellkultur.

Mein aufrichtiger Dank gilt unserem Technikerteam Herrn Wolfgang Reinle und Frau Katharina Bompais für die exzellente Proteinreinigungen, ihrer Hilfe in allen technischen Belangen sowie der Bewältigung des Laboralltags mit all seinen Hindernissen.

Antje, Herz und Seele des Labors 347 danke ich besonders für die Einführung in die Zellkultur, ihre Ratschläge und moralische Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit. Frau MSc. Anna Hobler danke ich für die schöne Zeit an der Bench, ihren nachsichtigen Umgang trotz des regelmäßigen Verschwindens von Laborutensilien. Allen 347 („Ravenclaw“) Labormitgliedern, Anna, Antje, Yogan, Elisa und Kerstin sei für die tolle Zeit, gute Zusammenarbeit und ganz besonders das harmonische Laborklima gedankt!

Ich danke auch meinem Büro-Nachbarn und Freund Simon Janocha für die gemeinsamen Jahre, für das Aushalten meiner Stimmungen und vor allem dafür, dass er niemals Widerworte scheute und den vielen Diskussionen wissenschaftlicher aber auch nicht-wissenschaftlicher Natur, die wir führten und hoffentlich noch lange führen werden. Danke.

Danke auch unseren Chemikern Dipl.-Chem. Alexander Schifrin, Dr. Sabrina Bleif und ganz besonders Dipl.-Chem. Michael Ringle für das Eröffnen neuer Horizonte und ihre Hilfe bei allen nur denkbaren chemischen Fragestellungen und deren praktischer Durchführung. Und natürlich für das *Bier um Vier*, auch wenn es meist erst später eingenommen wurde.

Der „neuen“ Generation, insbesondere dem Triumvirat Lina, Benni und Simone, die mir in kürzester Zeit besonders lieb geworden sind, möchte ich für die wunderbare Zeit und den Spaß auch nach Feierabend bedanken! Allen, auch den namentlich hier nicht genannten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, möchte ich für die tolle Zeit, die gute Stimmung und vor allem die liebenswerte Unterstützung, besonders im letzten Jahr danken, die mir geholfen hat durchzuhalten. Ohne euch alle hätte ich es nicht geschafft!

Von ganzen Herzen danke ich meinen lieben Freunden. Allergrößten Dank meinen beiden Lieblings-Italienern Vincenza und Fabio, die einfach immer da sind, mich zurecht rücken oder aufbauen wenn es nötig ist und mir über alle Krisen hinweg großartige Freunde waren und sind. Danke auch meinen treuen Freunden Michaela und insbesondere Nina für die unvergessliche Zeit an der Uni. Danke Sandra (ganz besonders für das Korrekturlesen meiner Arbeit) Nadja, Bernd, Elly, meinen EX-WG Mitstreiterinnen Katja und Jessica und dem Rest der Gang! Danke euch für alles!

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Danke Simone dafür, dass du die tollste Schwester der Welt bist, du warst und bist mir ein großes Vorbild! Ich danke Dir, Cornelius und Maximilian

dafür dass wir eine großartige Familie sind! Große Dankbarkeit empfinde ich gegenüber meinen Schwiegereltern Petra und Ernst-Friedrich Schmitz und Oma Marlene dafür, dass sie mich so liebevoll in ihrer Mitte willkommen geheißen haben und ich Teil ihrer Familie werden durfte. Ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann und besten Freund Björn Schmitz. Ich danke ihm für seine bedingungslose Liebe und Unterstützung. Vor allem danke ich ihm dafür, dass er mich über die gesamte Doktorarbeit über alle Krisen hinweg ge- und ertragen hat. Und dafür, dass er so ist wie er ist!

Von ganzem Herzen danke ich den besten Eltern der Welt Edmund und Renate Rauf, die mich von klein auf unterstützt und ermutigt haben. Ihr habt die Weichen für mein Leben in die richtige Richtung gelegt und alles gegeben, damit ich diesen Weg beschreiten kann. Ich danke euch für eure Liebe und dafür, dass ihr nie an mir gezweifelt habt. Danke Mama! Danke Papa!

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Abkürzungen | x |
| 2 | Zusammenfassung | 1 |
| 2.1 | Zusammenfassung | 1 |
| 2.2 | Summary | 1 |
| 3 | Einleitung | 3 |
| 3.1 | Naturstoffe | 3 |
| 3.1.1 | Allgemeines | 3 |
| 3.1.2 | Naturstoffe in der Medizin | 8 |
| 3.1.3 | Naturstoffe und Biotechnologie | 10 |
| 3.2 | Cytochrome P450 | 13 |
| 3.2.1 | Allgemeines | 13 |
| 3.2.2 | P450 Reaktionsmechanismus | 14 |
| 3.2.3 | Elektronentransferpartner | 17 |
| 3.2.4 | Spektroskopische Eigenschaften der P450 Enzyme | 18 |
| 3.3 | CYP106A2 aus <i>Bacillus megaterium</i> | 24 |
| 3.4 | Zielstellung | 29 |
| 4 | Material und Methoden | 30 |
| 4.1 | Materialien | 30 |
| 4.1.1 | Chemikalien und Lösemittel | 30 |
| 4.1.2 | Bakterienstämme und Plasmide | 30 |
| 4.2 | Methoden | 32 |
| 4.2.1 | Molekularbiologische Methoden | 32 |
| 4.2.1.1 | Anfertigung von Kryokulturen | 32 |
| 4.2.1.2 | Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von Plasmid-DNA | 32 |
| 4.2.1.3 | Plasmidisolierung | 34 |
| 4.2.2 | Kultivierung der Bakterien | 34 |
| 4.2.2.1 | <i>E. coli</i> | 34 |
| 4.2.2.2 | <i>B. megaterium</i> | 34 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2.2.3 | Wachstumskurve <i>B. megaterium</i> | 34 |
| 4.2.3 | Heterologe Proteinexpression | 35 |
| 4.2.3.1 | Expression von CYP106A2 in <i>E.coli</i> | 35 |
| 4.2.3.2 | Expression von CYP106A2, AdR und Adx in <i>B. megaterium</i> MS941 | 35 |
| 4.2.4 | Reinigung von CYP106A2 aus <i>E. coli</i> | 36 |
| 4.2.5 | UV/Vis-Spektroskopie | 38 |
| 4.2.5.1 | CO-Differenzspektroskopie | 38 |
| 4.2.5.2 | Differenzspektroskopie zur Bestimmung der Bindungsaffinität | 39 |
| 4.2.6 | Untersuchung von Substratumsetzungen mittels <i>in vitro</i> Rekonstitution . . | 40 |
| 4.2.6.1 | Michealis-Menten Kinetik der <i>in vitro</i> -Reaktionen | 40 |
| 4.2.7 | Screening der Biomol-Naturstoffbibliothek | 41 |
| 4.2.7.1 | Naturstoffbibliothek: Herstellung der Screeningplatten | 41 |
| 4.2.7.2 | NADPH-Verbrauch als Screeningmethode | 41 |
| 4.2.7.3 | Differenzspektroskopie als Screeningmethode | 43 |
| 4.2.8 | Ganzzellkatalyse | 43 |
| 4.2.8.1 | Bestimmung der Aktivität der <i>Bacillus megaterium</i> -Kulturen . | 44 |
| 4.2.8.2 | Bestimmung des P450-Gehalts in <i>B. megaterium</i> | 44 |
| 4.2.8.3 | Präparativer Substratumsatz | 45 |
| 4.2.8.4 | Umsetzungen mit ruhenden Zellen | 45 |
| 4.2.8.5 | Umsetzungen mit <i>B. megaterium</i> MS941_CAA | 46 |
| 4.2.8.6 | Berechnung von Umsatzrate, Ausbeute und Selektivität der <i>in</i> <i>vivo</i> Biokatalysen | 46 |
| 4.2.9 | Chromatographische Methoden | 47 |
| 4.2.9.1 | Dünnschichtchromatographie | 47 |
| 4.2.9.2 | Säulenchromatographie | 47 |
| 4.2.9.3 | rpHPLC | 48 |
| 4.2.10 | Kernspin-Resonanz-Spektroskopie | 49 |
| 4.2.11 | Zellkultur | 49 |
| 4.2.11.1 | XTT-basierter Zytotoxizitätstest | 50 |
| 5 | Ergebnisse | 51 |
| 5.1 | Substratscreening | 51 |
| 5.1.1 | NADPH-Verbrauch als Screeningmethode | 51 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.1.2 | Differenzspektroskopie als Screeningmethode | 56 |
| 5.1.3 | <i>In vitro</i> Umsetzungen der Screening Hits | 63 |
| 5.1.4 | <i>In vitro</i> Umsetzungen mit strukturverwandten Substraten | 67 |
| 5.2 | Identifikation der Reaktionsprodukte mittels Ganzzellbiokatalyse | 76 |
| 5.2.1 | Steroidderivate: Prednison, Dexamethason, Digitoxigenin | 77 |
| 5.2.2 | Dipterocarpol | 81 |
| 5.2.3 | Steroide: Pregnenolon und DHEA | 87 |
| 5.3 | Charakterisierung der Umsätze von Dipterocarpol und DHEA | 91 |
| 5.3.1 | Dipterocarpol | 91 |
| 5.3.1.1 | Michaelis-Menten-Kinetik der <i>in vitro</i> Reaktion | 91 |
| 5.3.1.2 | Ganzzellumsatz von Dipterocarpol | 94 |
| 5.3.2 | DHEA | 98 |
| 5.3.2.1 | Michaelis-Menten Kinetik der <i>in vitro</i> Reaktion | 98 |
| 5.3.2.2 | Ganzzellumsatz von DHEA | 99 |
| 5.4 | Optimierung der Ganzzellbiokatalyse von DHEA und Dipterocarpol | 103 |
| 5.4.0.3 | Substratfütterungs-Umsätze | 103 |
| 5.4.0.4 | Umsätze mit ruhenden Zellen | 105 |
| 5.4.0.5 | Vergleich mit dem Expressionsstamm MS941-CAA | 107 |
| 5.5 | Zytotoxizitätstest | 109 |
| 6 | Diskussion | 112 |
| 6.1 | Identifizierung neuer Substrate für CYP106A2 | 113 |
| 6.1.1 | NADPH-Verbrauch als Screeningmethode | 114 |
| 6.1.2 | Differenzspektroskopie als Screeningmethode | 116 |
| 6.1.3 | Rationale Substratsuche | 120 |
| 6.1.4 | Zusammenfassung Substratsuche | 121 |
| 6.2 | Produktcharakterisierung und Biokatalyse | 124 |
| 6.2.1 | Identifizierung der Reaktionsprodukte | 125 |
| 6.3 | Optimierung der Ganzzellbiokatalyse | 132 |
| 7 | Anhang | 156 |
| 7.1 | NMR-Daten | 156 |
| 7.2 | LC-MS Ergebnisse (CNRS, Paris) | 160 |
| 7.3 | Substrate des CYP106A2 | 162 |

8 Publikationen und Tagungsbeiträge

165

1 Abkürzungen

| | |
|------------------------------|--|
| 7 β -OH-D | 7 β -Hydroxydipterocarpol |
| 7 β ,11 α -OH-D | 7 β ,11 α -Dihydroxydipterocarpol |
| 7 β -OH-DHEA | 7 β -OH-Dehydroepiandrosteron |
| 7 α -OH-DHEA | 7 α -OH-Dehydroepiandrosteron |
| A | Absorption |
| Adx | Adrenodoxin |
| AdR | Adrenodoxinreduktase |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| bp | Basenpaare |
| °C | Grad Celsius |
| CPR | Cytochrom-P450-Reduktase |
| CYP | Cytochrom P450 |
| <i>d</i> | Chemische Verschiebung |
| d | Tag |
| D | Dipterocarpol |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DOC | 11-Desoxycorticosteron |
| DHEA | Dehydroepiandrosteron |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| HEPES | [4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-]-ethansulfonsäure |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| HS | High-Spin |
| HTS | high throughput screening |
| Hz | Hertz |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid |
| J | Kopplungskonstante |
| KM | Michaelis-Menten-Konstante |
| KPP | Kaliumphosphatpuffer |
| LS | Low-Spin |
| max | maximal |
| M | Molar |
| MCS | Multiple Cloning Site |
| mg | Milligramm |
| MHz | Megahertz |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| μ l | Mikroliter |
| mM | Millimolar |

| | |
|---------------|--|
| μM | Mikromolar |
| MW | Molecular weight |
| NADH | Nikotinamidadenindinukleotid |
| NADPH | Nikotinamidadenindinukleotidphosphat |
| n. b. | nicht bestimmt |
| nm | Nanometer |
| nmol | Nanomol |
| NMR | Nuclear magnetic resonance |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PREG | Pregnenolon |
| ppm | parts per million |
| RT | Raumtemperatur |
| R_t | Retentionszeit |
| RSS | Reichstein Substanz S |
| s | Sekunde |
| T | Temperatur |
| TIC | total ion curve |
| Tris | Tris-hydroxymethylaminomethan |
| upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV/Vis | Ultravioletter und visueller Wellenlängenbereich |
| WT | Wildtyp |

2 Zusammenfassung

2.1 Zusammenfassung

Die Funktionalisierung von Naturstoffen zur Steigerung ihrer Bioaktivität ist oftmals ein bedeutender Schritt der Arzneimittelentwicklung. Die Cytochrom P450 Monooxygenasen haben sich für diese Aufgabe als vielseitige Werkzeuge mit großem biotechnologischen Potential erwiesen. Das bakterielle CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* ATCC13368 ist in der Lage pharmazeutisch interessante Substrate, Steroide, Di- und Triterpenoide, stereoselektiv zu hydroxylieren. In dieser Arbeit wurde ein, auf der Methode der Differenzspektroskopie basierendes, Screeningsystem für die Identifizierung neuer Substrate entwickelt und auf eine 502 Substanzen umfassende Naturstoffbibliothek angewendet. Das Screening ergab zwölf Treffer. Einhergehend mit einer rationalen Suche wurde das Substratspektrum von CYP106A2 um sieben bioaktive Naturstoffe erweitert. Darunter; das mit den Ginsenosiden verwandte Dipterocarpol und der Steroidhormonvorläufer Dehydroepiandrosteron. Die respektiven Reaktionsprodukte konnten mittels Ganzzellumsatz durch *Bacillus megaterium* ATCC13368 hergestellt und mittels NMR identifiziert werden. Durch Optimierung der Ganzzellkatalysen resultierte die Produktivität deutlich gesteigert werden. Erste Untersuchungen zur Wirksamkeit der Reaktionsprodukte wurden durch *in vitro* Zytotoxizitätstest mit zwei Säugerzelllinien gemacht, wobei eine moderate Toxizität von 7 β -OH-Dipterocarpol auf beide Zelllinien wurde beobachtet wurde.

2.2 Summary

The functionalization of natural products in order to increase their bioactivity is often a critical step in drug development. For this cytochrome P450 monooxygenases emerged as a versatile tool with biotechnological potential. The bacterial CYP106A2 from *Bacillus megaterium* ATCC13368 is able to catalyze the stereoselective hydroxylation of pharmaceutical relevant substrates. In the present work, a screening system based on the method of difference spectroscopy was

developed to identify new CYP106A2 substrates. The method was applied for the screening of a 502 compounds containing natural product library, resulting in twelve hits. Along with a rational substrate search the substrate spectrum of CYP106A2 was broadened by seven new compounds. Among them are the ginsenoside related dipterocarpol and the steroid hormone precursor dehydroepiandrosterone. Their respective reaction products could be produced using *Bacillus megaterium* whole cell catalysis and the hydroxylation positions were determined with NMR-analysis. Optimization of the whole cell catalysis led to an explicit increase in productivity. First investigations on possible bioactivities were performed using *in vitro* cytotoxicity assays with two mammalian cell lines. A moderate cytotoxicity of 7 β -OH-dipterocarpol on both cell lines was observed.

3 Einleitung

3.1 Naturstoffe

3.1.1 Allgemeines

Naturstoffe stellen eine unerschöpfliche Quelle chemischer Diversität dar, die sich der Mensch im Laufe der Jahrtausende auf vielfache Weise nutzbar gemacht hat. Der Begriff Naturstoff umschreibt ganz allgemein in der Natur vorkommende Verbindungen, die aus Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen gewonnen werden. Nach geltendem Chemikalienrecht fallen darunter alle „*natürlich vorkommenden Stoffe, die unverarbeitet sind oder lediglich durch mechanische oder auf Wasser basierende Extraktionsmethoden (Flotation, Extraktion mit Wasser, Dampfdestillation usw.) gewonnen werden*“ [1]. Diese Definition bezieht sich auf Reinsubstanzen oder definierte Gemische und ist abzugrenzen von der gemeinsprachlichen Verwendung des Begriffs Naturstoff für undefinierte pflanzliche Extrakte. Die Bezeichnung Naturstoff bezieht sich dabei auf die Struktur der ursprünglich aus einem Lebewesen isolierten Substanz. Auch auf chemischem Wege synthetisierte Substanzen dürfen daher immer noch als Naturstoffe bezeichnet werden. Die Einteilung von Naturstoffen in Klassen ist aufgrund ihrer großen strukturellen Diversität schwierig. Zunächst kann zwischen Naturstoffen aus dem Primärstoffwechsel und dem Sekundärstoffwechsel unterschieden werden. Der sogenannte Primärstoffwechsel bezeichnet den anabolen und katabolen Metabolismus der Kohlenhydrate, Aminosäuren (Peptide, Proteine), Fettsäuren und andere lebenswichtiger Stoffe, wogegen der Sekundärmetabolismus, nicht lebenswichtige Metabolite, die in spezialisierten Zellen oder Geweben gebildet werden und dem Wirt besondere Eigenschaften wie Giftigkeit, Resistenzen u. ä. verleihen, einschließt. Feinere Einteilungen sind anhand der biogenen Herkunft der Naturstoffe (Einteilung nach Biosynthesewegen) oder ihrer physikochemischen Eigenschaften möglich (s. Abb. 3.1). Insbesondere die dem Sekundärmetabolismus entspringenden Naturstoffe stellen eine sehr heterogene Gruppe von Substanzen dar. Stark ver-

tretenen Naturstoffklassen sind die Polyketide, Terpene und Flavonoide. Die Polyketide sind eine strukturell uneinheitliche Gruppe von Stoffen, die einem gemeinsamen Stoffwechselweg (Polyketidweg) entspringen. Zu ihnen zählen viele Antibiotika aber auch das Antimalariamittel Artemisinin. Die Flavonoide, die aus dem Shikimisäureweg über Phenylalanin gebildet werden, gehören zu den wichtigsten Blütenfarbstoffen.

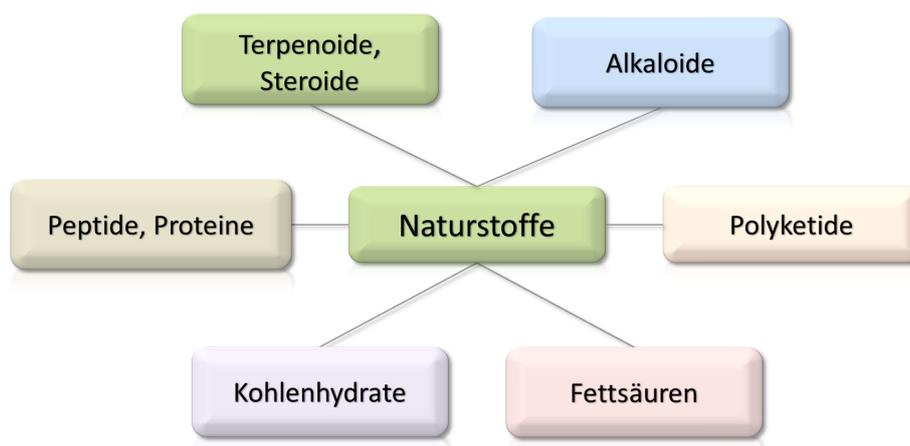


Abbildung 3.1: Beispiele von Naturstoffklassen

Die **Terpenoide**, stellen mit über 55.000 bekannten Vertretern die strukturell und stereochemisch zahlreichste Gruppe unter den Naturstoffen dar [2]. Der Begriff Terpene wird für die nur aus Kohlen- und Wasserstoffatomen aufgebauten Grundkörper verwendet. Durch Heteroatome funktionalisierte Terpene werden als Terpenoide bezeichnet, wobei unter der Bezeichnung Heteroatome alle Nicht-Kohlenstoff- oder Wasserstoffatome verstanden werden. In den meisten Fällen sind dies Sauerstoffatome in Form von Hydroxyl-, Carboxyl- oder Ketogruppen. Alle Terpene – und damit alle Terpenoide – leiten sich formal vom Isopren ab (Isoprenoide) und sind demnach aus C5-Einheiten aufgebaut (Terpenregel) (s. Abb. 3.2). Die Farnesylpyrophosphatsynthese katalysiert die Kopf-Schwanz-Kondensation (wobei das Schwanzende das Pyrophosphat trägt) der beiden C5-Körper Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP) zu Geranylpyrophosphat (GPP) (C-10) aus dem die Monoterpene hervorgehen. Eine

erneute Kondensation von GPP mit IPP führt zu Farnesylpyrophosphat (FPP) aus dem die Sesquiterpene gebildet werden. Die Kondensation von FPP mit IPP bildet Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) den Grundbaustein der Diterpene (C₂₀). Das Squalen (C₃₀), das Vorläufermolekül der Triterpene, entstammt einer Schwanz-Schwanz-Kondensation von zwei FPP Molekülen. Squalen trägt demnach keine Pyrophosphatgruppe mehr. Die Terpene werden durch ein- oder mehrfache Zyklisierungs- und Umlagerungsreaktionen aus diesen Vorläufermolekülen gebildet. Die Steroide werden ebenfalls aus dem Squalen gebildet, ihnen werden aber im Laufe ihrer Synthese durch verschiedene Enzyme Kohlenstoffatome entfernt, so dass sie lediglich 27 C-Atome (Lanosterol) oder weniger (Steroidhormone C₁₉-C₂₁) besitzen.

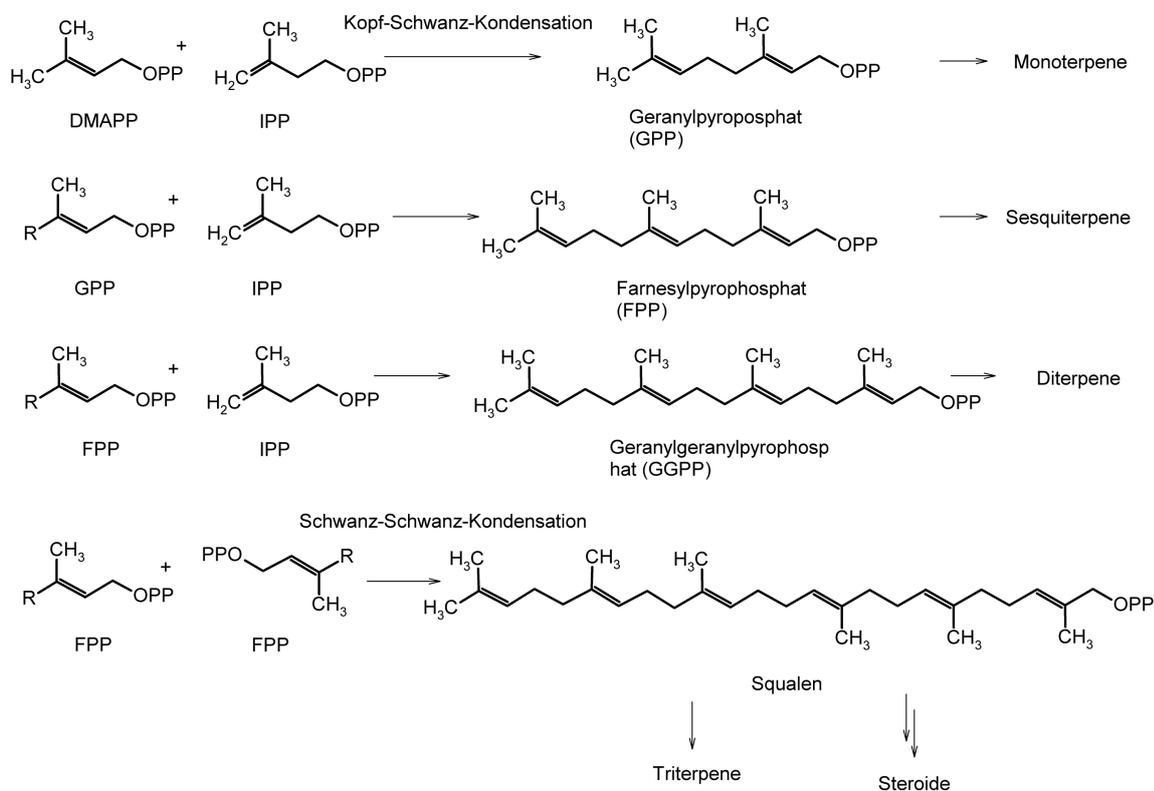


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau der Terpene aus Isopreneinheiten: Kopf-Schwanz-Kondensation (Schwanz = Pyrophosphatende) der beiden C5-Körper Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP) zu dem Monoterpenevorläufer Geranylpyrophosphat (GPP). GPP kondensiert mit IPP zu Farnesylpyrophosphat (FPP) aus dem die Sesquiterpene gebildet werden. FPP und IPP bilden Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) den Grundbaustein der Diterpene (C20). Das Squalen (C30), das Vorläufermolekül der Triterpene, entstammt einer Schwanz-Schwanz-Kondensation von zwei FPP Molekülen. Die Steroide werden ebenfalls aus dem Squalen gebildet, ihnen werden aber im Laufe ihrer Synthese durch verschiedene Enzyme Kohlenstoffatome entfernt, so dass sie lediglich 27 C-Atome (Lanosterol) oder weniger (Steroidhormone C19-C21) besitzen.

Terpene werden nach der Zahl ihrer Kohlenstoffatome eingeteilt in (s. Abb. 3.2): **Hemiterpene** (C5); **Monoterpene** (C10); **Sesquiterpene** (C15); **Diterpene** (C20); **Triterpene** (C30); **Tetra-** und **Polyterpene** (C40 und mehr). Diese Einteilung geht ebenso wie der Name Terpene auf ihre erstmalige Isolierung aus Terpentin (Harzauslauf verschiedener Koniferen) zurück, mit der Definition des ersten isolierten Terpens als Monoterpene, das aus 10 C-Atomen bestand. Die meisten natürlichen Terpenoide durchlaufen mehrere Zyklisierungs- und Umlagerungsreaktionen, woraus ihre strukturelle Vielfalt resultiert. Abbildung 3.3 zeigt nur einige ausgewählte Beispiele verschiede-

ner Terpengerüstgerüste, abgeleitet aus Hill 2012 [3].

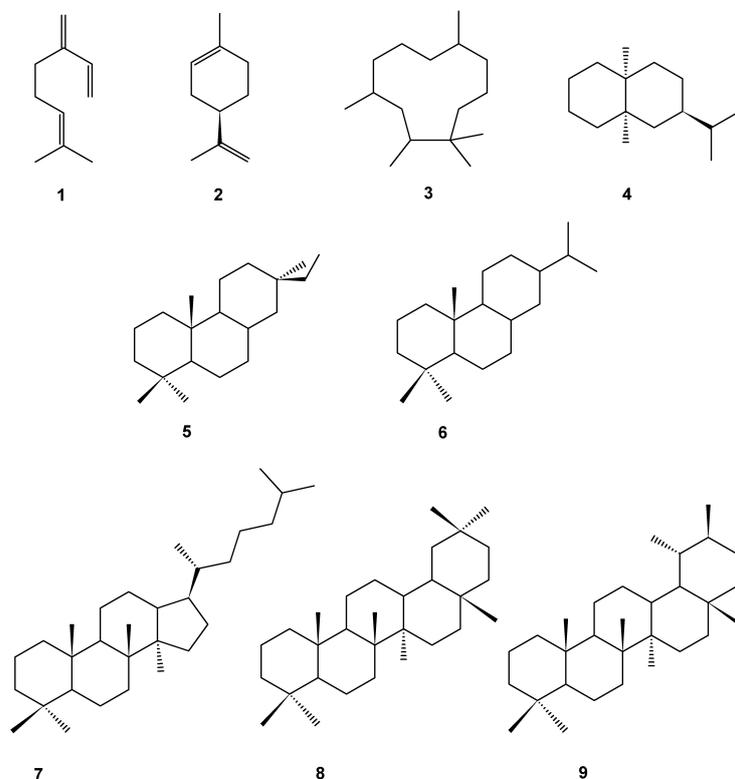


Abbildung 3.3: Einige Beispiele der strukturell verschiedenen Terpengerüstgerüste, die aus FPP, GPP, GGPP und Squalen gebildet werden: 1. Myristan (Monoterpen), 2. Limonan (Monoterpen), 3. Humulan (Sesquiterpen), 4. Valeran (Sesquiterpen), 5. Pimaran (Diterpen), 6. Abietan (Diterpen), 7. Dammaran (tetrazyklisches Triterpen), 8. Oleanan (pentazyklisches Triterpen), 9. Ursan (pentazyklisches Triterpen)

Terpene kommen vor allem in Harzen und ätherischen Ölen vor [4]. Diterpene etwa sind die Hauptbestandteile der Harzsäuren (Abietinsäure, Pimarsäure) verschiedener Koniferen, wo sie bei der Verschließung von Wunden mitwirken. Zudem wird ihnen eine Rolle bei der Resistenz gegenüber Fraßfeinden zugesprochen [5]. Glykosylierte Triterpene (Saponine) finden sich in fast allen höheren Pflanzen. Terpene und Terpenoide sind wichtige Rohstoffe und gewinnen auch als pharmazeutisch wirksame Substanzen aus Pflanzen und Tieren zunehmend an Bedeutung. Die niedermolekularen, flüchtigen Mono- und Sesquiterpene werden als Aromastoffe in der Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie verwendet, wie etwa das (R)-(+)-Limonen, welches in Zitronen- und Orangenöl vorhanden ist und Cremes, Duschgels und Shampoos ihren zitrus-

artigen Duft verleiht. Viele pharmakologische Eigenschaften von Pflanzen können auf Terpene zurückgeführt werden. Triterpene sind zum Beispiel die bioaktiven Komponenten der Ginsengwurzel (*Panax ginseng* C.A. Mey), auch Ginsenoside genannt, denen antitumorale, antivirale, antibakterielle, immunregulierende und neuroprotektive Eigenschaften zugesprochen werden [6, 7, 8, 9].

Unter den Isoprenoiden stellen die **Steroide** eine besondere Gruppe dar. Steroide sind in Tieren, Pflanzen und Pilzen zu finden. Zu den biologisch wichtigen Steroiden gehören die Sterine (Sterole), die Gallensäuren, Steroidhormone sowie die herzaktiven Cardenolide und Bufadienolide [4]. Die Steroidhormone des Menschen, werden ebenso wie die Gallensäuren und das Vitamin D aus Cholesterin gebildet. Sie werden in drei Klassen unterteilt, die Glucocorticoide, Mineralocorticoide und Sexualhormone, welche wiederum aufgeteilt sind in Progestagene, Androgene und Östrogene. Die Steroidhormone steuern lebenswichtige Prozesse im Körper. Progesteron und Östrogene sind wichtig für die Einnistung des Eis in den Uterus und die Follikelreifung. Die Androgene und Östrogene bewirken die Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale. Die Gluco- und Mineralocorticoide steuern den Zucker und Mineralhaushalt und damit einhergehend den Blutzuckerspiegel und Blutdruck [10]. Bei Insekten und Pflanzen spielen Steroidhormone ebenfalls eine gewichtige Rolle als Häutungs- (Ecdysone) beziehungsweise Wachstumshormone (Brassinosteroide).

3.1.2 Naturstoffe in der Medizin

Die Verwendung von Naturstoffen als Heilsubstanzen ist so alt wie die Menschheit. Eine der ältesten medizinischen Überlieferungen, die 2900 v. Chr. von den Ägyptern verfassten „Papyrus Ebers“, beinhalten Eintragungen über bereits 700 verschiedene pflanzliche Arzneimittel, die zum Gurgeln, als Tabletten, als Infusion oder Balsam eingesetzt wurden [11]. Naturstoffe werden auch heute noch in der Medizin zur Behandlung verschiedenster Krankheiten verwendet, allen voran Infektionen durch Bakterien, Krebs, neuronale Erkrankungen, kardiovaskuläre und intestinale

Leiden, Entzündungen und Hauterkrankungen. Ferner werden sie auch bei metabolischen und hormonellen Störungen und als Immunsuppressiva eingesetzt [12]. Interessanterweise besitzen heute noch 80 % der ursprünglich aus Pflanzen isolierten Naturstoffe ihren ethnopharmakologischen Verwendungszweck [13]. Die Dosierung pflanzlicher Extrakte gestaltet sich allerdings schwierig, da die Wirkstoffkonzentration vom Alter und der Konstitution der Pflanze abhängt. In der Schulmedizin verwendet man daher heute überwiegend isolierte Wirkstoffe.

Von den 877, von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen neuen Wirkstoffen („New Chemical Entities“ (NCEs)), die zwischen 1981 und 2002 eingetragen wurden, sind fast die Hälfte (49 %) Naturstoffe, semi-synthetische Naturstoffanaloga oder auf Naturstoffen basierende Substanzen [13]. Obgleich der größte Teil unserer Arzneimittel direkt oder indirekt von Naturstoffen abstammt, können nur die wenigsten pharmazeutisch wirksamen Naturstoffe direkt als Medikamente eingesetzt werden. Oftmals sind ihre Wirkungen zu schwach oder die Nebenwirkungen zu hoch [14]. Solche Substanzen, die bereits eine erwünschte biologische Wirkung zeigen, für deren therapeutischen Einsatz aber noch bestimmte Eigenschaften fehlen, nennt man Leitstrukturen. Der Begriff Leitstruktur beinhaltet zugleich, dass sich durch gezielte chemische Variationen aus ihnen Analoge herstellen lassen, die die ursprüngliche Substanz in ihrer Wirkstärke, Bioverfügbarkeit und (oder) Selektivität übertreffen [15].

Die vielleicht bekannteste Erfolgsgeschichte einer Leitstruktur ist die der **Acetylsalicylsäure** (s. Abb. 3.4), die von Bayer unter dem Handelsnamen Aspirin vertrieben wird. Der Wirkstoff Acetylsalicylsäure wurde 1897 erstmals von Dr. Felix Hoffmann in reiner Form stabil synthetisiert und seine Herstellung 1899 von Bayer patentiert (<http://www.bayer.de/de/Felix-Hoffmann.aspx>). Der eigentliche Naturstoff ist das Salicin, das aus D-Glucose und dem Salicylalkohol besteht (s. Abb. 3.4). Der aus dem Salicin durch Hydrolyse und anschließender Oxidation des respektiven Alkohols bzw. des Aldehyds (oder Hydrolyse des Methylesters) gewonnene eigentliche Wirkstoff – die Salicylsäure – wird heute vor allem in der Kosmetik und zur Behandlung von Akne eingesetzt. Seine acetylierte Form (Aspirin) aber ist das wohl bekannteste und weltweit

am häufigsten verschriebene Schmerzmittel geworden [16]. Ein historisch ebenfalls wichtiger arzneilich wirksamer Naturstoff ist das aus dem Schlafmohn *Papvera somniferum* stammende **Morphin**, das stärkste bekannte natürliche Analgetikum und einer der wenigen Naturstoffe, die auch heute noch in ihrer natürlichen Form eingesetzt werden [17]. Zu nennen ist an dieser Stelle auch das bei Herzschwäche eingesetzte **Digitoxin** aus *Digitalis lanata* (Digitalis), ein herzwirksames Glykosid mit steroidalem Aglykon, welches schon in den oben genannten Papyrus Ebers Erwähnung findet.

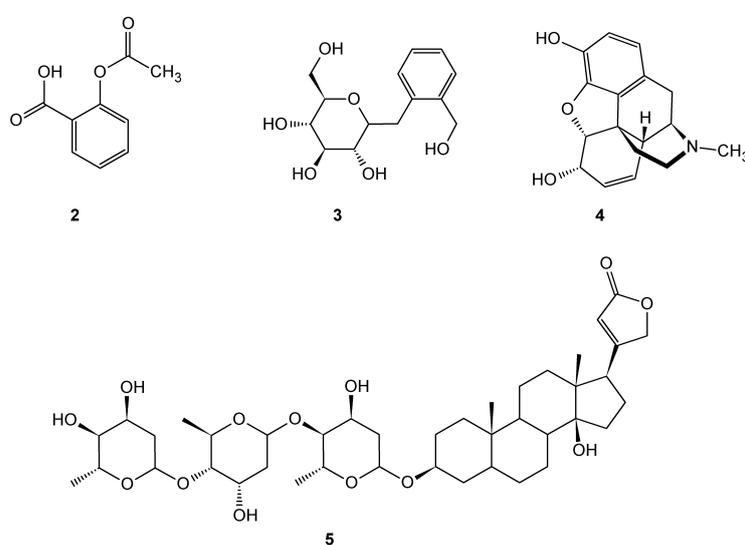


Abbildung 3.4: Beispiele arzneilich bedeutsamer Naturstoffe: 1. Salicylsäure 2. Salicin 3. Morphin 4. Digitoxin

3.1.3 Naturstoffe und Biotechnologie

Trotz ihrer chemischen Vielfalt und breiten Anwendung sinkt der Anteil von Naturstoffen in der Arzneimittelforschung stetig. In ihrer Blütezeit nach dem Zweiten Weltkrieg, als die Antibiotika die Arzneimittelmärkte eroberten, wurden viele neue Wirkstoffe darunter Streptomycin, Gentamicin und Tetracyclin als Nicht-Lactam-Antibiotika, aber auch die immer noch sehr erfolgreichen Statine wie Compactin und Mevinolin, entdeckt [18]. Die klassische Naturstoffforschung wurde zu Beginn dieses Jahrtausends allerdings durch die aufkommende kombinatorische Che-

mie ersetzt. Diese beinhaltet die Darstellung einer Vielzahl chemisch ähnlicher Verbindungen durch Verwendung von Synthesebausteinen und ermöglicht damit die Herstellung umfangreicher Substanzbibliotheken zur Identifikation neuer Wirkstoffe im Hochdurchsatzverfahren (HTS, engl. *high-throughput-screening*). Die klassische Naturstoffchemie ist dagegen nicht in der Lage, genügend Reinsubstanzen für diese HTS-Verfahren zur Verfügung zu stellen. Naturstoffe haben den großen Nachteil, dass sie oft selten und schwer zu erhalten sind. Problematisch ist zudem, dass ihre Identifizierung und Charakterisierung ein langwieriger und kostenintensiver Prozess ist, wobei im schlimmsten Fall eine bereits bekannte Substanz wiederentdeckt wird, die nicht mehr patentiert werden kann [19]. Dieser Mangel machte Platz für die kombinatorische Chemie, die nicht nur die Substanz sondern auch den entsprechenden Syntheseweg mitbringt und damit den Ansprüchen moderner HTS Verfahren besser gerecht wird [19]. Allerdings hat die kombinatorische Chemie von 1980 bis heute nur einen von der FDA zugelassenen Wirkstoff hervorgebracht, nämlich den Kinaseinhibitor Sorafendib [11]. Dagegen stellen Naturstoffe selbst 6 %, Derivate von Naturstoffen 27 % und aus naturstoffbasierenden Leitstrukturen hergestellte synthetische Derivate 28 % der von der FDA zugelassenen Medikamente (von 1980 bis 2002). Den Rest bilden synthetische Substanzen [20].

Die Biotechnologie bildet die entscheidende Schnittmenge zwischen der strukturellen Vielfalt der Naturstoffe und den Ansprüchen moderner Arzneimittelforschung. Zellsysteme, zellfreie („*crude*“)-Extrakte und teilweise oder ganz gereinigte Enzyme sind die Werkzeuge, die es ermöglichen Reaktionen durchzuführen, die sich auf chemischem Wege nur schwer oder gar nicht verwirklichen lassen. Den Grundstein zum Durchbruch der Enzyme als vielseitige Biokatalysatoren legten Willem „Pim“ Stemmer und Frances Arnold mit ihren Arbeiten an Methoden, die heute unter dem Begriff „Gerichtete Evolution“ zusammengefasst werden. Die rasante Entwicklung von DNA-Technologien zusammen mit bioinformatischen Methoden, ermöglichte Herstellung von umfangreichen Mutantenbibliotheken, die es ermöglichten Enzyme zu identifizieren, die über für die industrielle Biokatalyse notwendige Stabilität gegenüber Scherkräften, Hitze und orga-

nischen Lösemitteln verfügen [21]. Die Entschlüsselung ganzer Genome ermöglicht zudem das Aufspüren von Bausteinen (engl. „*Building-Blocks*“) oder vollständigen Biosynthesewegen, die zur Herstellung hochpreisiger Naturstoffe, Arzneimittel oder ihrer Vorstufen eingesetzt werden können. Die Verfahren ermöglichen heute bereits die Herstellung von Wirkstoffen aus billigen Vorläufermolekülen mit Hilfe rekombinanter Organismen [22, 14, 23]. Diese Techniken werden unter dem Begriff *synthetische Biologie* zusammengefasst. Als Meilensteine der synthetischen Biologie sind die Totalsynthese des Steroidhormons Cortisol, des Krebsmedikaments Taxol und des Anti-Malariamittels Artemisinin aus einfachen Kohlenstoffquellen in der Hefe zu nennen [24, 25, 26, 27]. Entscheidende Reaktionsschritte aller drei Biosynthesewege werden von einer Enzymfamilie, nämlich von Cytochrom P450 Enzymen, katalysiert [22].

Die Familie der Cytochrom P450 Enzyme ist an den meisten bekannten Biosynthesewegen pharmazeutisch bedeutsamer Sekundärmetabolite beteiligt. P450 Enzyme sind in der Lage eine Vielfalt von Reaktionen, vor allem Hydroxylierungen auch nichtaktiver C-H und C-C Bindungen, C-C Bindungsspaltungen und -knüpfungen, N-, O- und S-Desalkylierungen, Epoxidierungen u. a. mit hoher Selektivität durchzuführen [28]. Diese reaktive Vielfalt geht einher mit einer unglaublich großen Zahl an Isoenzymen. Die Suche nach P450-Genen in der NCBI-Datenbank gibt aktuell 24.697 Ergebnisse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), wobei ihre Zahl mit der Sequenzierung neuer Genome stetig wächst [29].

3.2 Cytochrome P450

3.2.1 Allgemeines

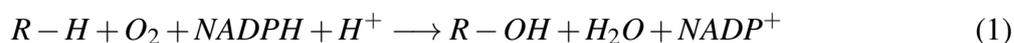
Cytochrom P450 Enzyme sind externe Monooxygenasen aus der Gruppe der eisenhaltigen b-Hämproteine. Sie gehören zu den ältesten bekannten Genfamilien. Es wird vermutet, dass sie von Mikroorganismen zur Detoxifizierung des ersten Sauerstoffs in der Atmosphäre verwendet wurden. Die Entdeckung von Steranen in Fossilien aus dem Präkambrium führt zur der Theorie, dass P450 Enzyme möglicherweise an der urzeitlichen Sterolbiosynthese beteiligt waren. Gestützt wird diese These dadurch, dass die 14α -Demethylase (CYP51), welche die Bildung von Cholesterol aus Lanosterol katalysiert, in über 82 Organismen aus allen fünf Reichen vertreten ist [30]. Im Laufe der Evolution haben Cytochrome P450 darüber hinaus eine Vielzahl verschiedener Aufgaben im anabolen und katabolen Stoffwechsel von Pro- und Eukaryoten übernommen. Beim Menschen partizipieren P450 Enzyme an der Biosynthese des Cholesterins, bewerkstelligen die Steroidhormonbiosynthese, sind beteiligt an der Herstellung der Prostaglandine, spielen eine Rolle bei der Synthese der Hormonformen des Vitamin D und sie übernehmen 75 % des Phase-I-Metabolismus der Leber, den ein Großteil der Fremdstoffe, insbesondere Arzneimittel, vor ihrer renalen Ausscheidung passiert [31].

Die stetig wachsende Zahl an P450 Isoformen erfordert eine einheitliche Nomenklatur. Eine solche wurde bereits 1987 entworfen, nach der die Enzyme anhand von Sequenzhomologien eingeteilt werden. Angehörige der P450 Superfamilie werden dabei mit dem Kürzel „CYP“ (Cytochrom P450) versehen, die entsprechende Familie (mind. 40 % Sequenzidentität) wird von einer Zahl angezeigt, die nächste Unterteilung, die Subfamilie (mind. 55 % Sequenzidentität) wird durch einen Buchstaben repräsentiert und zuletzt bezeichnet eine weitere Zahl das entsprechende Isoenzym (Bsp. CYP106A2). Trotz hoher Sequenzunterschiede sind sich alle P450 Enzyme strukturell ähnlich. Sie besitzen eine trigonal-pyramidale Grundstruktur, die von einem Vier-Helix-Bündel gestützt wird [32, 33, 34]. Die einzige in allen P450 Enzymen konservierte

Aminosäure ist das Cystein, welches den proximalen Liganden des Häm-Eisens stellt. Eine weitere stark konservierte Aminosäure ist ein Threonin, das bei der Protonenübertragung während der Katalyse (s. u.) assistiert.

3.2.2 P450 Reaktionsmechanismus

Im Allgemeinen katalysieren P450 Enzyme die Spaltung molekularen Sauerstoffs, wobei ein Atom in das Substrat eingebaut wird, während das andere zu Wasser reagiert (Monooxygenasen) (s. Gl. 1).



Der Katalysemechanismus der P450 Enzyme durchläuft mehrere Zwischenstufen, die nicht alle bis ins Detail geklärt sind. Die Hydroxylierungsreaktion ist aber gut verstanden und es existiert ein allgemein akzeptiertes Konsensusmodell [35]. Bei diesem werden auf dem Weg zum hydroxylierten Produkt acht Intermediate durchlaufen (s. Abb. 3.5), wobei das Häm-Eisen in drei Oxidationsstufen (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{4+}) auftritt. Die Katalyse beginnt mit dem Substrateintritt in das aktive Zentrum des Cytochroms **i**), welcher in den meisten Fällen einhergeht mit der Verdrängung des Wassers als 6. Liganden des Häm-Eisens, wodurch dieses vom oktaedrischen Low-Spin (LS)-Zustand in den pentazyklischen High-Spin (HS)-Zustand überführt wird (s. Abschnitt 3.2.4). Mit dem HS-Shift geht ein Anstieg des Redoxpotentials um bis zu 300 mV einher, welcher die nachfolgende Aufnahme eines Elektrons **ii**) erleichtert. Diese Ein-Elektron-Reduktion überführt das Fe^{III} in Fe^{II} , welches nun ein Sauerstoffmolekül bindet **iii**), wodurch der Fe^{II} -Dioxykomplex bzw. Fe^{III} Superoxid-Komplex (s. Abb. 3.5) gebildet wird. Danach folgt ein erneuter Elektronentransfer **iv**), welcher das negativ geladene Fe^{III} -Peroxy-Intermediat generiert. Die nachfolgende Protonierung **v**) führt zur Bildung des Hydroperoxy-Komplexes (Fe^{III} -COOH), auch bezeichnet als *Compound 0*. Einer weiteren Protonierung **vi**) folgt die heterolytische Spaltung der O-O Bin-

dung bei gleichzeitiger Reduktion des distalen Sauerstoffatoms zu Wasser. Zurück bleibt das hochreaktive Ferryl-Oxo-Intermediat ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$, Porphyrin π -Kationradikal), welches als *Compound I* bezeichnet wird **vii**). Schließlich wird ein Proton vom Substrat abstrahiert, es kommt zu einer radikalischen Rekombination (radikalischer „*rebound*-Mechanismus“), die das hydroxylierte Produkt gibt. Zuletzt dissoziiert das Produkt vom aktiven Zentrum ab **viii**) und das Enzym kehrt in den ursprünglichen wassergebundenen LS-Zustand zurück.

Neben diesem Hauptweg besitzt der Katalysemechanismus drei potentielle Abzweigungen „*shunt-pathways*“ (s. Abb. 3.5). Diese Reaktionen verbrauchen ebenfalls Reduktionsäquivalente, ohne dass es zur Hydroxylierung des Substrates kommt, weshalb man auch von Entkopplungsreaktionen spricht. In allen Fällen kommt es auf unterschiedlichen Wegen zur Rückbildung des HS- Fe^{III} -Intermediats (ii). Die erste *shunt*-Reaktion ist die **Autooxidation**, bei der ein Superoxid anion O_2^- vom Superoxid-Komplex abgespalten wird. Der zweite, auch **Peroxid-Shunt** genannte, Weg verläuft über die Bildung von Wasserstoffperoxid aus Compound 0. Dieser Weg ist der einzig reversible und kann prinzipiell dazu genutzt werden, Peroxide als Elektronenlieferanten zu benutzen. Die letzte Abzweigung, die **Oxidation**, beinhaltet die Bildung von Wasser aus Compound I, wobei zwei Moleküle NAD(P)H verbraucht werden.

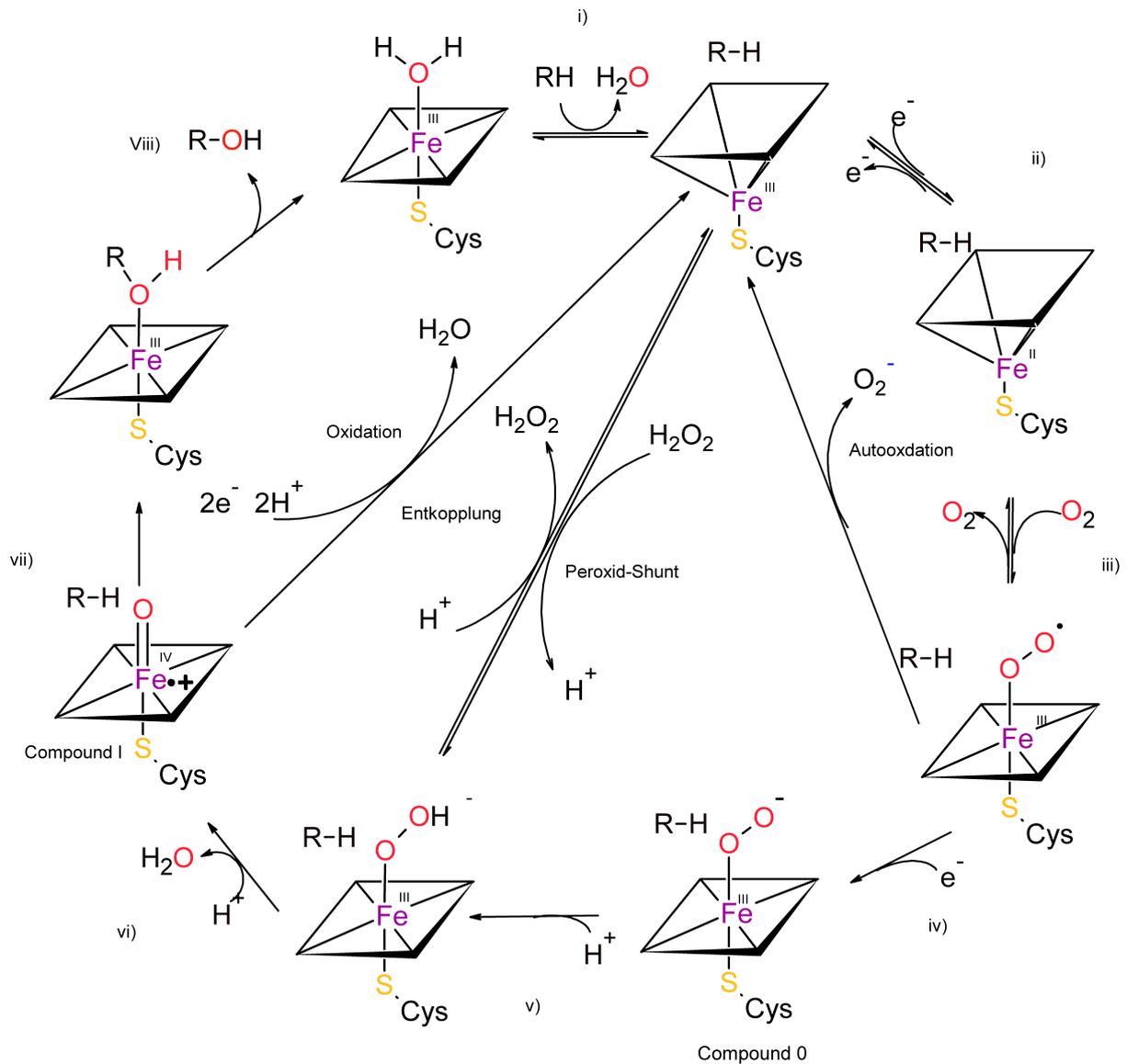
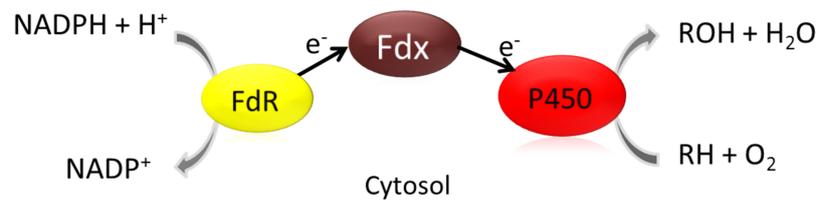


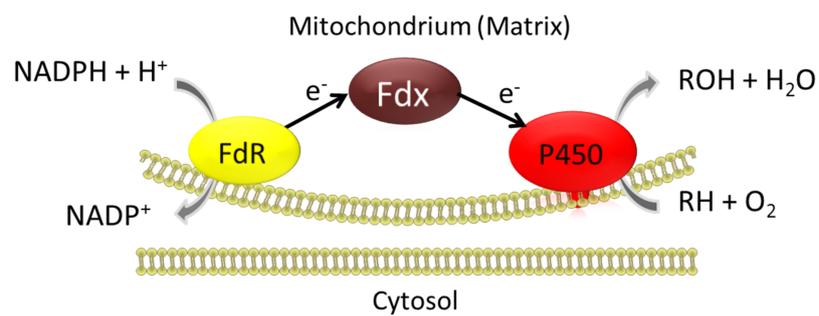
Abbildung 3.5: Allgemeiner Katalysemechanismus der P450 abhängigen Hydroxylierung nach Ortiz de Montellano [35]. Auf dem Weg zum hydroxylierten Produkt durchläuft das Häm-Eisen drei Oxidationsstufen und es werden acht Intermediate gebildet (s. Reaktionen i-viii). Der Katalysemechanismus verläuft über zwei Ein-Elektronen-Reduktionen eine zweimalige Protonierung (i-vi), gefolgt von einer heterolytischen Bindungsspaltung (vii) und einer abschließenden radikalischen Rekombination (viii).

3.2.3 Elektronentransferpartner

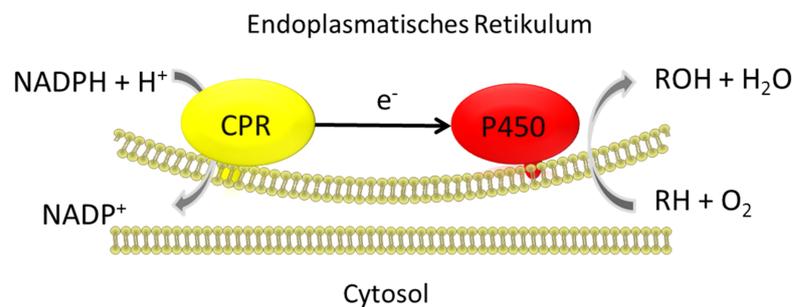
Der oben beschriebene Reaktionsmechanismus ist angewiesen auf die Belieferung mit Elektronen durch externe Donatoren. Diese sind in der Regel NADPH bzw. NADH [35]. Nur die wenigsten - sogenannten *selbstständigen* (engl. „*self-sufficient*“) - P450 Enzyme sind in der Lage, direkt mit ihren externen Elektronenlieferanten zu interagieren. Der Großteil der P450 Enzyme bezieht seine Elektronen indirekt über eine Elektronentransferkette, bestehend aus ein oder zwei Transferproteinen, die die Übertragung der Reduktionsäquivalente von NAD(P)H zum Häm-Eisen übernehmen. Die P450 Enzymsysteme können anhand ihrer Elektronentransferpartner in Klassen eingeteilt werden. Die meisten P450 Systeme gehören den Klassen I und II an. Klasse I umfasst die mitochondrialen und die meisten bakteriellen Enzymsysteme, in denen eine Ferredoxin-Reduktase und ein Ferredoxin den Elektronentransport übernehmen. Die Klasse II beinhaltet den mikrosomalen Typ, der seine Elektronen von einer Diflavin-Cytochrom-P450-Reduktase erhält (s. Abb. 3.6). Insgesamt sind bisher elf verschiedene Elektronentransportsysteme, darunter auch verschiedene Fusionsproteine bestehend aus P450 und Elektronentransferpartner, beschrieben [36]. Bei den eukaryotischen P450 Enzymen ist die Ferredoxin- bzw. die Cytochromreduktase, ebenso wie das Cytochrom P450 selbst membranständig, bzw. membranassoziiert. Lediglich das Ferredoxin der mitochondrialen P450 Enzyme liegt gelöst vor. Bei den Prokaryoten sind alle Komponenten des Enzymsystems löslich und befinden sich im Zytosol.



Klasse I: Bakteriell



Klasse I: Mitochondrial



Klasse II: Mikrosomal

Abbildung 3.6: Cytochrom-P450 Enzymsysteme der Klassen I und II mit Elektronentransferpartnern. Klasse I ist in Pro- und Eukaryoten vertreten, bei den Prokaryoten liegen alle drei Komponenten im Cytosol vor, während die mitochondrialen Proteine der Eukaryoten membranassoziiert (FdR) bzw. membranengebunden (P450) und nur teilweise löslich (Fdx) sind. Das mikrosomale System der Eukaryoten enthält keine lösliche Komponente.

3.2.4 Spektroskopische Eigenschaften der P450 Enzyme

Das erste P450, dessen 3D-Struktur mittels Röntgenkristallografie aufgeklärt werden konnte, war das Campher hydroxylierende CYP101 (P450cam) aus *Pseudomonas putida* [37]. In der Zwi-

schenzeit wurde die 3D-Struktur vieler weiterer P450 Enzyme aufgeklärt. Dabei zeigte sich, dass den P450 Enzymen eine einheitliche Struktur zu Grunde liegt [34, 33]. Die gemeinsame Grundform der P450 Enzyme hat zur Folge, dass sie sehr ähnliche spektroskopische Eigenschaften besitzen, obgleich sich ihre biochemischen Eigenschaften teils sehr stark voneinander unterscheiden. Der Porphyrin-Chromophor, welcher den P450 Enzymen ihre charakteristisch rote Farbe verleiht, ermöglicht Analysen mit einer Vielzahl spektroskopischer Techniken, darunter EPR-, NMR-, MCD-, Mössbauer-, Röntgenstrahl- und Resonanz-Raman-Spektroskopie. Die Absorptionsspektroskopie im sichtbaren und nahen UV Bereich (UV-Vis) ist die dominierende biophysikalische Charakterisierungsmethode der P450 Enzyme [38], weil die Durchführung der Absorptionssmessung einfach, die benötigten Instrumente verhältnismäßig kostengünstig sind und sie auch bei geringen Konzentrationen sensitive Messergebnisse liefert.

Die Absorptionsspektren von Hämproteinen ändern sich mit dem Oxidationszustand des Häm-Eisens, daher können Oxidations- bzw. Reduktionsprozesse dargestellt werden. Das namensgebende, spektrale Charakteristikum der P450 Enzyme ist das Absorptionsmaximum bei 450 nm im reduzierten, CO-komplexierten Zustand [39, 40]. Dieses für Hämproteine unübliche Absorptionsmaximum hat seinen Ursprung in der Natur des proximalen Häm-Liganden, welcher durch das Thiolat-Anion eines Cysteins gestellt wird und nicht von einem Histidin, wie es bei anderen Hämproteinen üblich ist (s. Abb. 3.7) [41, 35]. Im Gegensatz dazu weist das oxidierte, nicht komplexierte P450 das für b-Hämproteine typische Absorptionsmaximum bei 417 nm auf. Da sich die P450 Enzyme in ihrer grundlegenden Form stark ähneln, ist das Maß dieser Absorptionsänderung ebenfalls für die meisten P450 Enzyme sehr ähnlich und kann zur Bestimmung der Enzymkonzentration durch eine einfache Absorptionssmessung verwendet werden.

Die optische Absorptionssmessung von P450s ist auch sensitiv für den Spinzustand des Häm-Eisens. Übergangsmetallione wie Fe^{+2} , Fe^{+3} und Co^{+3} besitzen im isolierten Zustand fünf d-Orbitale gleicher Energie (entartet). Dreiwertiges Eisen besitzt fünf Elektronen in den oberen Energieniveaus ($3d^5$). Von diesen fünf Elektronen können alle den gleichen Spin besitzen (alle

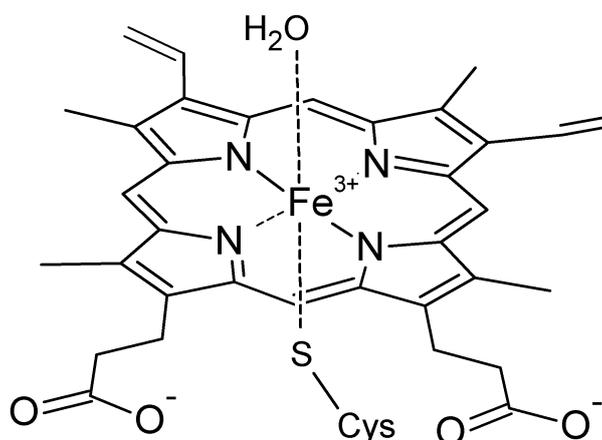


Abbildung 3.7: Protoporphyrin XI im aktiven Zentrum von Cytochrom P450 Enzymen: Als fünfte Liganden des Häm-Eisens stellt ein Cysteinrest ein Thiolat-Anion (proximal zum Protein). Der sechste Ligand (distal) ist im substratfreien Enzym ein Wassermolekül.

fünf d-Orbitale sind einfach besetzt) womit sich ein summarische Spin von $5/2$ ergibt, in diesem Falle spricht man von „Hohem Spin“ HS (engl. „high-spin“). Es können aber auch Orbitale voll besetzt sein und drei Elektronen einen Spin von $+1/2$ und zwei einen Spin von $-1/2$ besitzen, wodurch der summarische Spin $+1/2$ beträgt. Diesen Zustand nennt man dementsprechend „niedrigen Spin“ LS (engl. „low-spin“). Im oktaedrischen Übergangsmetall-Komplex, wie im Falle des Häm-Eisens, kommt es durch die Annäherung des Liganden zu elektrostatischen Abstoßungen der Elektronen der d-Orbitale. Die Liganden nähern sich den d_{z^2} - und $d_{x^2-y^2}$ - Orbitalen stärker an, so dass die Abstoßungseffekte dort stärker zum Tragen kommen und diese Orbitale energetisch ungünstiger werden, es kommt also zur Aufspaltung der d-Orbitale (s. Abb. 3.8). Ist die Energiedifferenz Δ größer als die Spinpaarungsenergie, liegt der Komplex im LS vor. Im oktaedrischen Übergangsmetallkomplex können LS und HS sowie intermediäre Zustände vorliegen, was die Katalyse spinverbotener Reaktionen, wie die Insertion eines Sauerstoffmoleküls in eine nichtaktivierte C-H-Bindung, überhaupt erst ermöglicht [42, 43, 44].

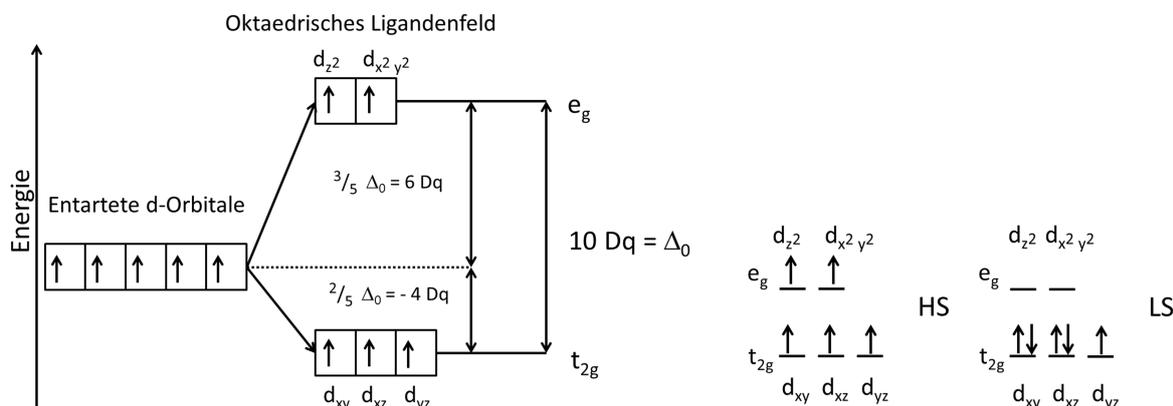


Abbildung 3.8: Aufspaltung der entarteten d-Orbitale im oktaedrischen Ligandenfeld (links): Übergangsmetallione besitzen 5 einfach besetzte d-Orbitale gleicher Energie (entartet). Die Annäherung eines Liganden führt zur Aufspaltung der Energieniveaus, das Maß der Aufspaltung wird von der Natur des Liganden, dem Oxidationszustands des Zentralatoms und vor allem von der Anzahl der Liganden bestimmt und hat die Einheit Dq . Ist die Energiedifferenz zwischen den Niveaus größer als die Spinpaarungsenergie, verbleiben die Elektronen im niedrigeren Energieniveau [45]. Elektronenverteilung im „High-Spin“ (HS) bzw. „Low-Spin“ Zustand von Eisen(III)-Übergangsmetallkomplexen im oktaedrischen Ligandenfeld (rechts): Dreiwertiges Eisen besitzt fünf Elektronen in den oberen Energieniveaus ($3d^5$). Besitzen die fünf Elektronen den gleichen Spin (alle fünf d-Orbitale sind einfach besetzt) ergibt sich ein summarischer Spin von $5/2$, in diesem Falle spricht man von „Hohem Spin“ HS (engl. „high-spin“). Sind die Orbitale voll besetzt, so besitzen drei Elektronen einen Spin von $+1/2$ und zwei einen Spin von $-1/2$ besitzen, wodurch der summarische Spin $+1/2$ beträgt. Diesen Zustand nennt man dementsprechend „niedrigen Spin“ LS (engl. „low-spin“).

Sligar et al. zeigten 1976 am Beispiel des bakteriellen P450cam (CYP101), dass das substratfreie Enzym zu 94 % im LS-Zustand vorliegt [46]. Anders verhält es sich jedoch bei Bindung eines Substrates in das aktive Zentrum der Enzyme, wenn der sechste Ligand des Häm-Eisens verdrängt wird. Mit der Verdrängung des Liganden geht eine Konformationsänderung einher, der oktaedrische, sechsfach koordinierte Eisen-Komplex geht in einen fünffachkoordinierten, quadratisch-pyramidalen Komplex über. Im pyramidalen Ligandenfeld ist die Aufspaltung der Orbitale, aufgrund der wesentlich verringerten Elektronen-Ligand-Abstoßung, wesentlich geringer als im oktaedrischen Ligandenfeld, so dass es hier ausschließlich die HS-Form gibt [47]. Demgegenüber kommt es bei der Substitution des Wassers durch einen stärkeren Liganden, beispielweise Stickstoff, dazu, dass die Aufspaltung der d-Orbitale vergrößert wird, so dass der LS-Anteil in der Enzymlösung erhöht wird.

Beide Ereignisse, der Übergang in den tetraedischen HS-Komplex, bzw. die Stabilisierung des LS-Komplexes durch starke Liganden, lassen sich spektralfotometrisch untersuchen, da HS- und LS-Eisenkomplexe unterschiedliche *d-d*-Übergänge aufweisen. HS- und LS-P450s unterscheiden sich also signifikant in ihren Absorptionsspektren. Da die Absorption des P450 Enzyms im HS-Zustand im Vergleich zur Gesamtabsorption oft relativ gering ist, ist die Differenzspektroskopie besser zur Darstellung von LS- zu HS-Übergängen geeignet, als die Aufnahme von absoluten Spektren [48]. Es werden grundsätzlich zwei Arten von Differenzspektren unterschieden: Das für das HS-Eisen charakteristische Typ I-Spektrum, ausgewiesen durch ein Absorptionsmaximum bei 385-390 nm und dem Minimum bei 420 nm und das dem LS-Zustand eigene Typ II-Spektrum, charakterisiert durch ein Minimum bei 420 nm und Maximum bei ca. 425 nm (s. Abb. 3.9). Ein sogenanntes "reverses" Typ I-Spektrum, mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm und einem Minimum bei 390 nm kommt zustande, wenn ein hoher Anteil HS-Enzym vorliegt und dieser durch Zugabe eines Liganden in den LS-Zustand überführt wird [49]. Führt die Bindung eines Substrats oder eines Inhibitors nicht zu einer Änderung des Absorptionsverhaltens, spricht man von einem Typ 0-Spektrum. Diese spektralen Eigenschaften können zur Identifizierung von Liganden von P450 Enzymen genutzt werden, wobei Typ II-Liganden zu meist als Inhibitoren fungieren während die meisten Typ I-Liganden auch Substrate der Enzyme darstellen.

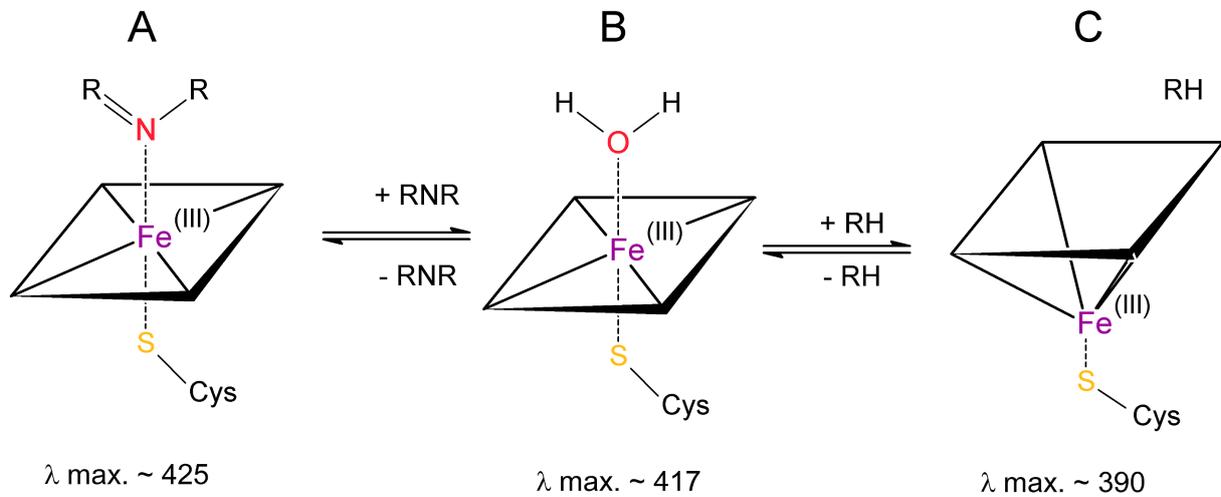


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Koordination von stickstoffhaltigen Liganden (A), Wasser (B) ans Häm-Eisen bzw. die Verdrängung des Wassers durch ein Substrat (C), sowie die Wellenlängen λ der daraus resultierenden Absorptionsmaxima (nach Sono 1982 [49]).

3.3 CYP106A2 aus *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium (*B. megaterium*) ist ein im Boden vorkommendes, grampositives Stäbchen, das seit vielen Jahren in der industriellen Biotechnologie verwendet wird [50]. Es findet als Produktionsstamm für Penicillin G acylase, Polyhydroxybutyrat und Vitamin B₁₂ Verwendung [51]. *B. megaterium*, das im Englischen oft mit „big beast“ übersetzt wird, ist mit einem Zellvolumen von 60 μm^3 das größte bekannte Bakterium und ca. hundertmal größer als *Escherichia coli* (*E. coli*). *B. megaterium* Arten konnten aus den verschiedensten Habitaten, darunter Meerwasser, Honig, Fisch und getrocknetem Essen isoliert werden. Es ist in der Lage auf 65 verschiedenen Kohlenstoffquellen zu wachsen, was seine Kultivierung einfach und vor allem kostengünstig macht. Dienen Zucker als Hauptkohlenstoffquelle, so werden diese über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg und den Pentosephosphatweg in den Tricarbonsäurezyklus eingespeist [52, 53]. Aus biotechnologischer Sicht entscheidend ist, dass *B. megaterium* einen intakten Glyoxylatweg besitzt, wodurch es zur Weiterverwendung von Acetat befähigt ist. Damit wird der bei *E. coli* oft beobachtete sogenannte „Overflow“-Metabolismus verhindert, der durch eine hohe Acetatkonzentration im Medium charakterisiert ist.

B. megaterium ist zudem ein ausgezeichneter Proteinexpressionsstamm. Er besitzt gegenüber gramnegativen Bakterien wie etwa *E. coli* den Vorteil, dass es nicht zur Bildung von Endotoxinen befähigt ist. Darüber hinaus besitzt *B. megaterium* keine alkalinen Proteasen und ist in der Lage, Plasmide stabil zu replizieren und diese auch ohne Selektionsdruck über viele Generationen zu behalten [54, 55]. Basierend auf dem 1991 von Rygus und Hillen identifizierten Promotor P_{xylA} wurden verschiedene Systeme zur Xylose induzierten Expression für *B. megaterium* entwickelt, die Ausbeuten bis zu von 1,25 g Protein pro Liter Kultur ermöglichen. Es wurden auch *B. megaterium* Stämme, wie der WH320-Stamm kreiert, in denen das CRE-Element zur katabolen Repression des P_{xylA} Promotors ausgeschaltet ist, was Proteinexpression auch in Medien mit hohem Glucoseanteil erlaubt [56, 57, 58]. Die Kultivierungsbedingungen haben dabei einen erheblichen Einfluss auf die Produktivität der Proteinexpression. Fürch et al. zeigten anhand me-

tabolischer Flux-Analysen, dass die intrazelluläre NADPH-Konzentration maßgeblich über die verwendete Zuckerquelle gesteuert werden kann [53].

CYP106A2 aus *B. megaterium* ist ein lösliches, 47 kD großes Protein, bestehend aus 410 Aminosäuren, das aufgrund seiner präferentiellen Hydroxylierung von Steroiden in Position 15 β auch 15 β -Hydroxylase genannt wird. Die Entdeckung eines Systems zur 15 β -Hydroxylierung von Steroiden mit *Bacillus megaterium* ATCC13368 geht zurück auf Mc. Aleer *et al.* 1958 [59]. Siebzehn Jahre später schrieb Berg *et al.* die Hydroxylaseaktivität einem P450 Enzym zu [60], welches er weitere vier Jahre später bis zu Homogenität reinigte und erstmals funktionell charakterisierte [61]. In seinen Arbeiten klassifiziert er das, von ihm als P450-meg bezeichnete, Enzym als Steroid-Hydroxylase, die ausschließlich 3-oxo- Δ^4 -Steroide, vorwiegend in Position 15 β hydroxyliert. Später benennt er die Elektronentransferpartner des CYP106A2 als Megarodoxin und Megaredoxin-Reduktase [62]. Zwar gelang Berg die teilweise Reinigung der Megaredoxin-Reduktase, allerdings konnten beide Redoxpartner bis heute nicht kloniert werden. Rauschenbach *et al.* gelang schließlich die vollständige Sequenzierung und heterologe Expression des CYP106A2 in *E. coli* und *B. subtilis* [63, 64].

CYP106A2 lässt sich in *E. coli* in ausgesprochen hohen Raten (bis 1000 nmol/l Kultur) [65, 66] stabil exprimieren und kann mit einer Reihe heterologer Redoxpartner erfolgreich sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* rekonstituiert werden. Unter anderem mit dem bovinen Adrenodoxin (Adx) und der Adrenodoxin-Reduktase (AdR) sowie dem aus *Pseudomonas putida* stammenden Putidaredoxin und der Putidaredoxin-Reduktase [67, 65, 61, 68]. Rauschenbach *et al.* zeigten, dass in *B. subtilis* ebenfalls Systeme zur Elektronenübertragung auf CYP106A2 vorhanden sind [63]. Der Beweis hierfür wurde indirekt mittels messbarer Hydroxylierungsaktivität von CYP106A2 nach Expression in *B. subtilis* ohne Zugabe externer Elektronentransferproteine erbracht. Auch das cyanobakterielle *Anabaena* 7119 Ferredoxin zusammen mit der entsprechenden Ferredoxin-NADP-Reduktase der Photosynthese konnten CYP106A2 erfolgreich bei der Hydroxylierung assistieren, wobei interessanterweise die Hydroxylaseaktivität auch über das *Anabaena* Flavodo-

xin getriggert werden kann. Eine Reduktion durch die aus der Klasse II stammenden CPR wurde bisher nicht nachgewiesen. Am besten charakterisiert und auch am erfolgreichsten eingesetzt ist das bovine System aus AdR und Adx unter Verwendung einer verkürzten Form des des Adx, nämlich Adx₄₋₁₀₈. Die verkürzte Form besitzt ein niedrigeres Redoxpotential als das Wildtyp-Protein, wodurch es besser in der Lage ist, die Reduktion des CYP106A2 zu übernehmen, welches selbst ein stark negatives Redoxpotential ($E^0 = -128 \text{ mV}$) besitzt [69].

CYP106A2 vermag eine ganze Reihe biotechnologisch interessanter Substrate stereoselektiv zu hydroxylieren. Die ersten ausführlichen Untersuchungen zum Substratspektrum wurden von Berg et al. durchgeführt. Die meisten seiner beschriebenen Substrate sind 3-oxo- Δ -4-Steroide. Zudem sind bis auf die N-Demethylierung des Antidepressivums Imipramin, bisher ausschließlich Hydroxylierungsreaktionen von CYP106A2 bekannt. Die wichtigsten Steroids substrate sind in Abb. 3.10 aufgeführt. Darunter Progesteron, Androstendion, Desoxycorticosteron, Cholesteron und 11-Desoxycortisol. Die Reaktion dieser Substrate mit CYP106A2 führt, wie bereits erwähnt, zur 15 β -hydroxylierten Spezies als Haupt- oder alleiniges Reaktionsprodukt. Die Nebenproduktbildung ist vor allem für die Reaktion von CYP106A2 mit Progesteron intensiv untersucht worden insbesondere, weil hydroxylierte Progesteronderivate als Arzneimittel, vor allem als Kontrazeptiva und in der Hormonersatztherapie, Anwendung finden. Neben 15 β -Hydroxyprogesteron wurden noch 6 β , 9 α und 11 α hydroxylierte Progesteronderivate identifiziert. Durch Kombination von gerichteter Evolution und rationalem Proteindesign konnte die Selektivität der Progesteronreaktion mit CYP106A2 von 15 β in Richtung 11 α geändert werden [70]. 11 α -Hydroxyprogesteron ist ein besonders interessantes Reaktionsprodukt, weil es sich als potenter Inhibitor der 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase *in vitro* und *in vivo* erwiesen hat [71, 72]. Bei längerer Reaktionszeit, treten vermehrt auch polyhydroxylierte Progesteronspezies in Erscheinung [73]. Die genaue Stellung der Hydroxygruppen in den polyhydroxylierten Spezies ist allerdings nicht bekannt. Für die Herstellung von Progesteronderivaten wurde für CYP106A2 ein *E.coli* basiertes Ganzzellsystem entwickelt, das nach Erweiterung um ein NADPH-Regenerations-

system effizient zur Herstellung hydroxylierter Steroide eingesetzt werden kann. Dabei stellten Zehentgruber et al. fest, dass das System hauptsächlich durch die Substratverfügbarkeit limitiert wird. Dieses Problem konnten sie erfolgreich umgehen, indem sie lyophilisierte Rohextrakte im repetitiven Satzreaktor verwendeten [74]. Bleif umging das Problem der Bioverfügbarkeit durch Wechsel vom gramnegativen *E. coli* zum grampositiven *B. megaterium*. Dieser Wechsel ermöglichte die Umsetzung der Diterpensäure Abietinsäure in biotechnologisch relevantem Maßstab, ohne dass die Zellen zuvor permeabilisiert werden mussten [75]. Darüberhinaus konnte Bleif im Zuge ihrer Doktorarbeit weitere hochinteressante Terpensäuren (18 β -Glycyrrhitinsäure, Oleanolsäure und Ursolsäure) als Substrate für CYP106A2 identifizieren. Diese Erkenntnisse ermutigten uns, eine 502 Substanzen umfassende Naturstoffbibliothek (Biomol) zur Screenen und zusammen mit einer rationalen Substratsuche weitere bioaktive Naturstoffe zu identifizieren, die durch CYP106A2 hydroxyliert werden.

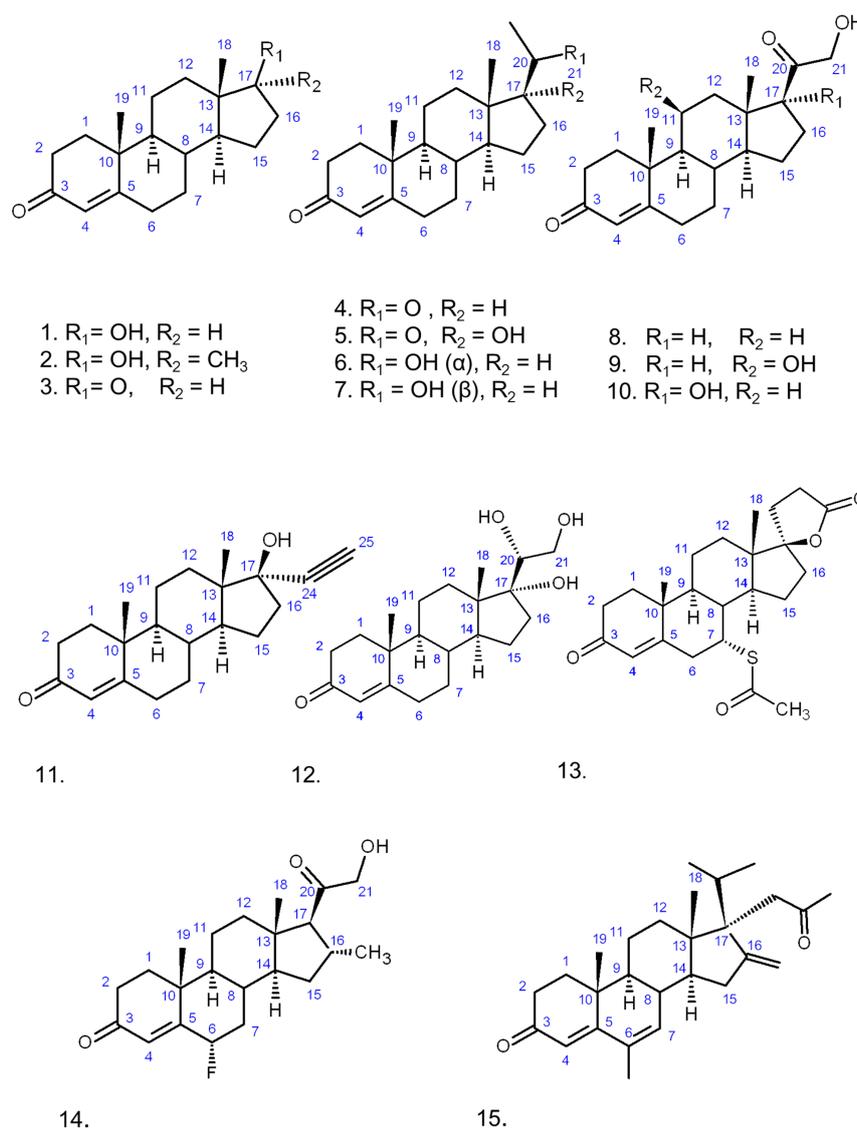


Abbildung 3.10: Bekannte Steroidssubstrate von CYP106A2: 1. Testosteron, 2. 17-Methyltestosteron, 3. Androstendion, 4. Progesteron, 5. 17-Hydroxyprogesteron, 6. 4-Pregnen-20 α -ol-3-on, 7. 4-Pregnen-20 β -ol-3-on, 8. Desoxycorticosteron, 9. Corticosteron, 10. Reichstein Substanz S, 11. Ethisteron, 12. 4-Pregnen-17 α ,20 α ,21-triol-3-on, 13. Spironolacton, 14. 6-Fluor-16-methyldesoxycorticosteron, 15. Methylengestrolacetat [60, 64, 73, 76, 65, 66, 77, 78].

3.4 Zielstellung

Naturstoffe besitzen eine unermessliche strukturelle Vielfalt, die sie zu einer wertvollen Resource zur Entwicklung neuer Arzneimittel macht. Jedoch werden Naturstoffe zumeist nicht direkt als Medikament eingesetzt, vielmehr dienen sie als sogenannte Leitstrukturen bei der Arzneimittelherstellung. Enzymatische Katalysen spielen hierfür als Alternative zur klassischen chemischen Synthese eine immer größere Rolle. Die P450 Enzymfamilie rückt dabei aufgrund ihrer reaktiven Vielfalt und ihres biotechnologischen Potentials zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Jedoch steht die Suche nach neuen Substraten dem Einsatz dieser Enzyme als Biokatalysator voran. Diese gestaltet sich für P450 Enzyme besonders schwierig, weil die von ihnen umgesetzten Substanzen ein unermessliches Spektrum, von einfachen Kohlenwasserstoffen bis hin zu komplexen Polyketiden, umspannen. Chromatographische Verfahren, an die massenspektrometrische Analysen gekoppelt sind, wurden bereits zum Screening für P450 Substrate etabliert, ihre Anwendung ist allerdings kosten- und zeitintensiv und nur für spezialisierte Screeninglabore realisierbar. Eine breite Grundlagenforschung erfordert einfachere, kostengünstigere Screeningmethoden. Deshalb war das Hauptanliegen dieser Arbeit die Etablierung eines Screeningsystems für P450 Enzyme, mit dem unabhängig von der Natur der Testsubstanzen komplexe Naturstoffbibliotheken nach neuen Substraten durchsucht werden können. Die Screeningmethode sollte auf einer einfachen Absorptionsmessung im Mikrotiterplattenmaßstab beruhen. Die Reaktionsprodukte sollten im Ganzzellumsatz hergestellt und mittels NMR-Analysen identifiziert werden. Darüber hinaus sollten der Ganzzellumsatz mit *B. megaterium* ATCC13368 mit den neuen Substraten unter biotechnologischen Gesichtspunkten charakterisiert und optimiert werden. Erste Untersuchungen hinsichtlich der Wirksamkeit neuer Produkte sollten mit *in vitro* Zytotoxizitätstests an zwei Säugerzelllinien erfolgen.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien und Lösemittel

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Standardquellen bezogen und waren von analytischer Reinheit. Die für die DC und Kieselgel-Säulenchromatographie verwendeten Lösemittel waren HPLC-grade. Zur HPLC Analyse wurden HPLC-grade bzw. gradient-grade Lösemittel benutzt.

4.1.2 Bakterienstämme und Plasmide

Die heterologe Expression des Cytochrom P450 CYP106A2 erfolgte in *E. coli* JM109 Zellen unter Verwendung des Expressionsplasmids pKKHCmeg modifizierten Protokoll nach Simgen et. al [68]. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Biokatalysen wurden *Bacillus megaterium* Bakterienzellen benutzt. Zur Untersuchung CYP106A2-abhängiger Reaktionen diente der Stamm *B. megaterium* ATCC13368, der endogen das CYP106A2 codiert und das Enzym in der stationären Phase exprimiert. Als Kontrolle wurde ein $\Delta cyp106a2$ ko-Stamm verwendet. Beide Stämme im Folgenden als wt- und ko-Stamm (Wildtyp und knockout) bezeichnet, wurden freundlicherweise von Dr. R. Rauschenbach zur Verfügung gestellt [63]. Zur Optimierung von Substratumsetzungen in *B. megaterium* wurde darüber hinaus der Stamm MS941 eingesetzt [79]. Dieser Expressionsstamm wurde bereits von Dr. S. Bleif mit dem Plasmid pSMF2.1-CAA transformiert. Dieses codiert für CYP106A2 sowie die bovine Adrenodoxinreduktase und das bovine, verkürzte Adrenodoxin₁₋₁₀₈ und ermöglicht somit die Xylose-induzierte Überexpression aller drei Proteine [80].

Tabelle 4.1: Expressionsplasmide

| Vektor | Beschreibung | Größe [kb] | Referenz |
|------------|---|------------|---------------------|
| pKKHCmeg | Expressionsvektor PTrc, MCS enthält u.a. Nco I und Hind III Erkennungssequenz, Ampr, pBR322 ori und <i>cyp106a2</i> | 2,8 | Hannemann 2006 [81] |
| pSMF2.1CAA | Expressionsvektor (tracistronisch) für CYP106A2, bovine AdR und bovines Adx ₁₋₁₀₈ Ap ^r , Tcr ^r | 7,76 | Bleif 2011 [80] |

Tabelle 4.2: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|-----------|--|---------------------------------|
| JM109 | <i>endA1 recA1 gyrA96 thi</i> <i>hsdR17 (r- mk +) relA1 supE44</i> <i>δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB</i> <i>lacI^qZ ΔM15]</i> | Yanish-Perron 1985[82] |
| ATCC13368 | Wildtyp (Genom nicht bekannt) | Rauschenbach 1993[63] |
| ATCC12269 | <i>Δcyp106a2</i> (ko) | Rauschenbach 1993 [63] |
| MS941 | DSM319 <i>ΔnprM</i> | Wittchen und Meinhardt 1995[83] |

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Anfertigung von Kryokulturen Zur Aufbewahrung von *E. coli* bzw. *B. megaterium* Zellen wurden 200 μ l Kultur mit gleichem Volumen sterilem Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefrosten. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte bei -80 °C bis zur Weiterverwendung.

4.2.1.2 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von Plasmid-DNA Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Sambrook et al.. Die zur Expression von CYP106A2 verwendeten JM109-Bakterienzellen wurden aus einer frischen Übernachtskultur in 400 ml LB-Medium überführt (1:1000) und bis zu einer OD₆₀₀ 1 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4500 g geerntet und in eiskaltem Transferpuffer 1 (TFP I s. Tab. 4.3) resuspendiert. Die Zellen wurden dann 60 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert. Die geernteten Zellen wurden erneut, diesmal in 2 ml Transferpuffer 2 (TFP II s. Tab. 4.3), resuspendiert, zu 100 μ l aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefrosten. Die Lagerung der Zellen erfolgte bis zu ihrer Verarbeitung bei -80 °C. Die Bestimmung der Kompetenz erfolgte durch Transformation von 50 μ l Zellen mit 0,25 ng PUC19 Plasmid-DNA. Aliquots des Transformationsansatzes wurden auf NB^{amp}-Agarplatten (Ampicillin 100 μ g/ml) ausgestrichen und somit die Fähigkeit zur Aufnahme von Plasmid-DNA bestimmt. Durch Ausstreichen nicht transformierter Zellen auf NB^{amp}-Agarplatten wurden die Zellen auf mögliche Kontaminationen überprüft.

Tabelle 4.3: Puffer zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen (sterilfiltriert, Lagerung 4 °C)

| TFP I | | |
|---------------------------------|-------------|--------|
| Lösung | Stocklösung | Menge |
| CH ₃ COOK | 1 M | 3 ml |
| KCl | 1 M | 10 ml |
| CaCl ₂ | 1 M | 1 ml |
| MnCl ₂ | 1 M | 5 ml |
| Glyzerin | reinst. | 12 ml |
| ad 100 ml H ₂ O (dd) | | |
| TFP II | | |
| Lösung | Stocklösung | Menge |
| MOPS | 0,2 M | 3 ml |
| KCl | 1 M | 0,2 ml |
| CaCl ₂ | 1 M | 1,5 ml |
| Glyzerin | reinst. | 2,4 ml |
| ad 20 ml H ₂ O (dd) | | |

Die Transformation der *E. coli*-Zellen erfolgte mittels Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden im Wasserbad. 50 µl Zellen wurden zusammen mit ca. 50 ng Plasmid-DNA versetzt, auf Eis aufgetaut und anschließend dem Hitzeschock unterzogen. Unmittelbar nach der Hitzebehandlung wurden die Zellen für 10 min eisgekühlt. Dann wurden 500 µl 37 °C warmes SOC-Medium (In einem Liter: Hefeextrakt 5 g, Trypton 20 g, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Glucose 20 mM, ad. 1 l H₂O_{dest}) zu den Zellen gegeben und eine Erholungsphase von 45 min bei 37 °C und moderatem Schütteln angeschlossen.

4.2.1.3 Plasmidisolierung Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Nucleo Spin[®] Plasmid-Präparationskits nach den Angaben des Herstellers.

4.2.2 Kultivierung der Bakterien

4.2.2.1 *E. coli* Die Anzucht von *E. coli*-Bakterienzellen erfolgte mit komplexen Flüssig- bzw. Festmedien (LB bzw. NB-Agar, BD, Difco), die nach den Angaben der Hersteller angesetzt wurden. *E. coli* wurde bei 37 °C und 190 upm in Erlenmeyerkolben angezogen. Die Bebrütung der Agarplatten erfolgte ebenfalls bei 37 °C. Mit Kolonien bewachsene Platten wurden max. 14 Tage bei 4 °C gelagert.

4.2.2.2 *B. megaterium* Die Anzucht von *B. megaterium* erfolgte in flüssigem Komplexmedium, supplementiert mit 5 ml Glycerin und einem pH von 7,4 eingestellt mit 10 x Kaliumphosphatpuffer (KPP). Das Medium war aus 25 g Hefeextrakt (BD, USA), 12 g Soyton (BD, USA), 5 ml Glycerin (reinst), 2,31 g KH₂PO₄ und 12,54 g K₂HPO₄ zusammengesetzt. *Bacillus megaterium*-Zellen wurden zur besseren Belüftung ausschließlich in mit Schikane versehenen Erlenmeyerkolben bei 150 upm und 30 °C kultiviert. Die Kultivierung der Kulturen, die zur Biokatalyse verwendet wurden, erfolgte, sofern nicht anders angegeben, für 16 h. Die Herstellung von Übernachtskulturen erfolgte durch Inokulation von 50 ml Medium mit 500 µl Kryokultur. Die Selektion des Δ*cyp106a2* knockout-Stammes (ko), bzw. des mit dem Expressionsplasmid pSMF2.1-CAA transformierten MS941-Stammes (CAA), erfolgte durch Zugabe von 10 µg/ml Tetracyclin.

4.2.2.3 Wachstumskurve *B. megaterium* Wachstumskurven von *B. megaterium*-Zellen wurden in dieser Arbeit verwendet, um potentiell schädliche Einflüsse von Dipterocarpol, DHEA und Pregnenolon, zu untersuchen. Dazu wurden je 50 ml Soyton-Komplexmedium mit 500 µl einer frischen Übernachtskultur beimpft und wie gewohnt kultiviert. Die Kulturen wurden zu ver-

schiedenen Zeitpunkten (0, 2, 4, 8, 12, 16, 24 h) beprobt und die OD bei 578 nm (OD_{578}), gegen steriles Medium als Kontrolle, im Zweistrahlphotometer (V-650 Jasco) bestimmt. Der Einfluss der CYP106A2 Substrate auf das Zellwachstum wurde untersucht, indem den Kulturen nach 4 h (Ende der anfänglichen Lag-Phase) je 250 μ M Substrat zugegeben wurde. Einer Kultur, die als Kontrolle diente, wurde lediglich das Lösungsmittel Ethanol in gleicher Menge (2,5 ml), zugegeben.

4.2.3 Heterologe Proteinexpression

4.2.3.1 Expression von CYP106A2 in *E. coli* Das pKKHCmeg Expressionsplasmid, welches für CYP106A2 codiert, wurde in *E. coli*-JM109-Zellen transformiert und 100 μ l transformierte Zellen auf LB-Nähragar (versehen mit 10 mg/ml Ampicillin) ausgestrichen und bei 37 °C 24 h bebrütet. LB-Vorkulturen (50 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben) wurden dann mit je einem einzelnen Klon der Platte beimpft (LB-Flüssigkultur mit 10 mg/ml Ampicillin) und erneut 24 h bei 37 °C und 190 upm inkubiert. 10 ml der Vorkultur wurden verwendet, um eine 1 l Hauptkultur in einem 2 l Erlenmeyerkolben zu inokulieren. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 190 upm bis zu einer OD_{600} von 1 wachsen gelassen. Die Induktion der Expression erfolgte anschließend durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM). Zudem wurde den Kulturen die Häm-Vorstufe δ -Aminolävulinsäure zugegeben (Endkonzentration 0,5 mM). Die Proteinexpression erfolgte bei 30 °C und 190 upm. Nach 48 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (4500 g, 15 min, 4 °C) und bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

4.2.3.2 Expression von CYP106A2, AdR und Adx in *B. megaterium* MS941 Zur Expression von CYP106A2, AdR und Adx in *B. megaterium* wurde der Expressionsstamm MS941 verwendet. Mit dem Expressionsplasmid pSMF2.1_CAA transformierte Zellen wurden als Kryokultur freundlicherweise von Dr. S. Bleif zur Verfügung gestellt. Die Expression erfolgte nach dem von ihr etablierten Protokoll unter folgenden Bedingungen: 50 ml Soyton-Komplexmedium (mit

10 mg/ml Tetracyclin) wurden mit 500 μ l einer frischen 16 h-Kultur beimpft und bei 30 °C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4 angezogen. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 0,5 % (w/v) Xylose (in H₂O, sterilfiltriert). Die Expression fand bei 30 °C für 24 h statt. Als Kontrolle wurde stets der nicht transformierte Stamm MS941 mitgeführt. Die Expression der drei Proteine wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Fr. Dr. Bleif untersucht. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde lediglich die Überexpression des P450 durch CO-Differenzspektroskopie überprüft. Auf Anwesenheit des vollständigen P450-Enzymsystems wurde durch vorhandensein der Enzymaktivität geschlossen.

4.2.4 Reinigung von CYP106A2 aus *E. coli*

Zur Reinigung von CYP106A2 wurde 1 l Expressionskultur entweder frisch geerntet bzw. ein bei -20 °C gelagertes Pellet bei Raumtemperatur aufgetaut. Geerntete Bakterien aus 1 l Kultur wurden in 100 ml Lysepuffer (20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl, 0,1 mM DTE, pH 8,0) resuspendiert und tropfenweise mit dem Serienproteaseinhibitor PMSF (100 mM, gelöst in Isopropanol) bis zu einer Endkonzentration von 1 mM versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultrasonifikation (Sonotrodentyp 1), mit einer Amplitude von 25 μ m, einer Pulsdauer von 30 s, Ratio 1 für 20 min auf Eis.

Die Reinigung von CYP106A2 erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Simgen et al. über drei Säulen (s. u.) [68]. Die aufgeschlossenen Zellen wurden 35 min bei 4° C und 35000 g (Ultrazentrifuge im Vakuum) zentrifugiert und der rötliche Überstand weiterverwendet. Der Überstand wurde mit 20 ml Säulenpuffer A (20 mM Tris/Cl, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl, 0,1 mM DTE) verdünnt und auf eine äquilibrierte SOURCE-30Q Anionenaustauschersäule geladen (Flussrate 1,5 ml/min). Anschließend wurde die Säule mit Säulenpuffer A (2x Säulenvolumen) gewaschen. Die Elution von CYP106A2 erfolgte mit steigender Menge Säulenpuffer B (20 mM Tris/Cl, 0,1 mM DTE, 0,4 M NaCl) unter Verwendung des in Tabelle 4.4 aufgeführten Gradienten.

Tabelle 4.4: Gradient zur Elution von CYP106A2 von SOURCE-30Q

| Volumen | Anteil Puffer B (v/v) |
|------------|-----------------------|
| 0-20 ml | 0 % |
| 20-100 ml | 20 % |
| 100-150 ml | 50 % |
| 150-200 ml | 79 % |
| 200-250 ml | 100 % |

Die erhaltenen Fraktionen wurden spektralfotometrisch vermessen (200 - 700 nm) und Fraktionen mit einem Reinheitsindex (Q-wert A_{417}/A_{280}) über 0,6 vereinigt. Die Enzymlösung wurde anschließend mittels Centriprep-YM30-Zentrifugationsfiltern auf 1-2 ml konzentriert und auf eine Hiload 16/60 Superdex 75 prep-grade Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Größenausschlusschromatografie wurde dann mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (0,1 mM DTE, 0,1 mM EDTA) bei einer Flussrate von 0,3 ml in der Minute, durchgeführt. Die roten Fraktionen wurden erneut fotometrisch vermessen und diejenigen mit einem Q-Wert über 1 vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden mit destilliertem Wasser fünffach verdünnt auf eine, mit Säulenpuffer C (10 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 0,1 mM DTE, 0,1 mM EDTA) äquilibrierte, Hydroxylapatit-Säule geladen (Flussrate 1,5 ml/min). Zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine wurde die Säule mit Säulenpuffer C (3x Säulenvolumen) gewaschen. Die Elution des CYP106A2 erfolgte mittels stufenweiser Erhöhung der Phosphatkonzentration durch Beimischung von Säulenpuffer D (100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 0,1 mM DTE, 0,1 mM EDTA) nach dem in Tabelle 4.5 angegebenen Gradienten.

Tabelle 4.5: Gradient zur Elution von CYP106A2 von Hydroxylapatit-Säule

| Volumen | Anteil Puffer C (v/v) |
|------------|-----------------------|
| 0-30 ml | 0 % |
| 30-180ml | 40 % |
| 180-250 ml | 80 % |
| 250-300 ml | 100 % |

Die P450-haltigen Fraktionen mit dem höchsten Reinheitsindex (Q-Wert zwischen 1,5 und 1,7) wurden erneut vereinigt und der P450-Gehalt bestimmt. Die Proteinlösung wurde schließlich auf 2-3 ml konzentriert, so dass die Enzymkonzentration durchschnittlich 300 μ M betrug. Zur Aufbewahrung wurde das gereinigte CYP106A2 zu 200 μ l aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.2.5 UV/Vis-Spektroskopie

Die Aufnahme von UV/Vis-Spektren erfolgte an Zweistrahlphotometern (Shimadzu UV2101PC (Kyoto, Japan), JASCO V-600 (Gross-Ulmstadt, Deutschland)). Die Aufnahme der Spektren erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur unter Verwendung einer Proben- und einer Referenzküvette. Die aufgenommenen Spektren wurden mit der Origin 7.5 pro bzw. Origin 8.6 pro sowie der JASCO-Spektra-Analyse Software ausgewertet.

4.2.5.1 CO-Differenzspektroskopie Zur Bestimmung der P450-Konzentration wurde die CO-Differenzspektroskopie angewandt. Wie bereits von Omura und Sato beschrieben, besitzen die Cytochrome P450 im reduzierten, CO-komplexierten Zustand das namensgebende Absorptionsmaximum bei 450 nm [40]. Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Aliquot gereinigtes Enzym mit Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) 200-fach verdünnt, reduziert und auf zwei Quarz-Küvetten (Hellma QS-Präzisionsküvette aus Quarzglas SUPRASIL, 115B-QS 10 mm) verteilt. Die Reduktion des CYP106A2 erfolgte durch Zugabe einer kleinen Spatelspitze Natrium-

dithionit direkt zur Proteinlösung. Nach Durchführung der Basislinienkorrektur (400 - 500 nm) wurde die Probenküvette mit 30 Bläschen Kohlenstoffmonoxid (CO) begast und ein Spektrum (400 - 500 nm) gemessen. Aus dem sich ergebenden Differenzspektrum wurde die P450-Konzentration nach folgender Formel errechnet:

$$c(P450) = \frac{\Delta A_{450-490} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\epsilon \times d} \quad (2)$$

$c(P450)$ = Konzentration P450 in mM

$\Delta A_{450-490}$ = Differenz der Absorbtionen bei 450 bzw. 490 nm

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient ($91 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

d = Schichtdicke

4.2.5.2 Differenzspektroskopie zur Bestimmung der Bindungsaffinität Zur Charakterisierung der Affinität von Typ I-Substraten an CYP106A2 wurde die Differenzspektroskopie angewandt. Soweit nicht anders angegeben wurden alle Differenzspektren mit $10 \mu\text{M}$ Enzym in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Ermittlung der Bindungskonstanten wurden Tandemküvetten verwendet. Tandemküvetten besitzen zwei Kavitäten, im Folgenden als R1 und R2 für die Kavitäten der Referenzküvette sowie P1 und P2, für die Kavitäten der Probenküvette bezeichnet. Die Kavitäten R1 und P1 wurden je mit $800 \mu\text{l}$ Enzymlösung ($5 \mu\text{M}$ CYP106A2 in 50 mM KPP pH 7,4) und die Kavitäten R2 und P2 mit Puffer (P2, R2) beschickt und eine Basislinienkorrektur (300 - 500 nm) durchgeführt. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde der P450-Ligand in $0,4 \mu\text{l}$ Schritten aus 1 bzw. 5 mM DMSO-Stocklösungen titriert. Die Zugabe erfolgte sowohl zur Enzymlösung der Probenküvette (P1) als auch in die Pufferlösung der Referenzküvette (R2). Der Zugabe folgte eine Durchmischung der Proben mit der Pipette. Anschließend wurden die Proben 2 min vor Aufnahme der Spektren inkubiert. Die Zugabe erfolgte bis das substratinduzierte Absorptionsmaximum bei 388 nm nicht mehr anstieg (Substratsättigung). Die Berechnung der Dissoziationskonstanten K_D erfolgte

durch Auftragen der Differenz aus Maxima und Minima der Bindspektren ΔA ($A_{388} - A_{417}$) über die eingesetzte Substratkonzentration und anschließende hyperbolische Regression.

$$A_{380-417} = \frac{A_{380-417max} \cdot [S]}{K_D + [S]} \quad (3)$$

4.2.6 Untersuchung von Substratumsetzungen mittels *in vitro* Rekonstitution

Cytochrom P450-abhängige *in vitro* Substratumsetzungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in 50 mM HEPES (0,05 % Tween 20, pH 7,4) bei 30 °C und 750 upm für 20 min durchgeführt. Die Reaktionsansätze bestanden aus dem P450-System (0,25 μ M Cytochrom, 0,5 μ M AdR, 10 μ M Adx), einem NADPH-regenerierenden System (5 mM Glucose-6-phosphat, 1 mM $MgCl_2$, 1 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase) sowie 50 μ M Substrat. Die Ansätze wurden auf 30 °C erwärmt und die Reaktion durch Zugabe von ebenfalls 30 °C warmem NADPH (Endkonzentration 100 μ M) gestartet und nach Ablauf der Reaktionszeit durch Zugabe von 500 μ l Ethylacetat gestoppt. Nach kräftigem Durchmischen (1 min Vortex) und anschließender Zentrifugation bei 10000 g für 10 min wurden die organischen Phasen entnommen und der Extraktionsschritt anschließend nochmal wiederholt. Die erhaltenen organischen Phasen wurden vereinigt und in der Speed Vac getrocknet. Proben, die nicht am gleichen Tag weiterverarbeitet wurden, wurden bei -20 °C gelagert. Zur Identifizierung neuer CYP106A2-Substrate wurden die Reaktionen standardmäßig mit 50 bzw. 100 μ M Substrat durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Umsetzungen ohne NADPH.

4.2.6.1 Michealis-Menten Kinetik der *in vitro*-Reaktionen Zur Charakterisierung der *in vitro* Reaktionen von DHEA und Dipterocarpol wurden Michealis-Menten-Kinetiken erstellt. Dazu wurden Reaktionen mit steigenden Konzentrationen der Substrate DHEA (0-400 μ M) und Dipterocarpol (0-300 μ M) durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug in allen Fällen 2 min, damit die maximale Umsatzrate unter 20 % (steady-state Annahme bei Substratüberschuss) lag.

Die apparenten kinetischen Parameter der Reaktion wurden durch HPLC-Analysen der DHEA-Umsetzungen bzw. DC-Analysen der Dipterocarpol-Umsetzungen und Integration der Peakflächen bzw. Spotintensitäten ermittelt. Die Michaelis-Konstante K_M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} wurden durch hyperbolische Regression des erhaltenen Plots bestimmt.

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (4)$$

4.2.7 Screening der Biomol-Naturstoffbibliothek

4.2.7.1 Naturstoffbibliothek: Herstellung der Screeningplatten Zur Identifizierung neuer Substrate für CYP106A2 wurde die 502 Substanzen umfassende Naturstoffbank von *Biomol international* (Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA) verwendet. Die Biomol-Naturstoffbibliothek enthält von jeder Substanz 1 mg, gelöst in 500 μ l DMSO. Zur Durchführung des Screenings wurden zunächst Stocklösungen der Substanzen hergestellt. Dazu wurden jeweils 1 mM DMSO-Lösungen in lösemittelbeständigen, schwarzen Polystyrolplatten (Nunc F96 MicroWellTM Platten, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland) angesetzt. Diese Arbeitsplatten wurden mit Aluminiumfolie abgedichtet und bei -20 °C gelagert. Die Naturstoffbibliothek selbst wurde bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.7.2 NADPH-Verbrauch als Screeningmethode Die Messung des NADPH-Verbrauchs während der P450-Reaktion wurde fotometrisch verfolgt. Dazu wurden die Umsetzungen direkt in Halbmikroquarzküvetten in einem auf 30 °C temperierten Küvetenschlitten durchgeführt. Das P450-Enzymsystem wurde mit AdR, Adx und CYP106A2 rekonstituiert (s. unten), das Reaktionsvolumen betrug 500 μ l. Die Ansätze wurden mit verschiedenen Substratkonzentrationen versetzt und auf 30 °C für 10 min vorgewärmt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 100 μ M, ebenfalls 30 °C warmem NADPH (1 mM Stock im Umsatzpuffer) gestartet und die Absorptionsänderung bei 340 nm für 5 min verfolgt. Um den NADPH-Verbrauch zur

Identifikation neuer CYP106A2-Substrate verwenden zu können, wurde der substratabhängige NADPH-Verbrauch in 96-well Platten untersucht. Es wurden transparente PureGrade 96-well ft Platten (pureGradeTM, Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland) verwendet. Das P450-Enzymsystem wurde wie beschrieben rekonstituiert (s. Abschnitt 4.2.6), das Reaktionsvolumen in den Platten betrug 250 μ l. Zur Ermittlung der optimalen Screening-Bedingungen wurden Substratkonzentrationen von 50 bis 400 μ M getestet. Die Reaktionsansätze wurden auf 30 °C erwärmt und die Reaktion durch Zugabe von, im Reaktionspuffer gelösten, ebenfalls 30 °C warmem, NADPH (100 μ M, aus 1 mM Stock) gestartet. Die Absorptionsänderung wurde bei 340 nm für 15 min verfolgt. Die NADPH-Abnahme wurde mit dem Tecan GENios Plattenreader (GMI Inc, Minnesota USA) vermessen, die Readertemperatur wurde 30 min vor Versuchsbeginn auf 30 °C eingestellt und die Platten wurden zwischen den Messungen 45 s geschüttelt (genaue Einstellungen des Plattenreaders s. Tab 4.6).

Tabelle 4.6: XFluor4Safire II Einstellungen zum Anwenden des NADPH-Verbrauchs als Screeningmethode in 96-well Mikrotiterplatten

| NADPH Verbrauchsassay: Reader Einstellungen | |
|--|---------------|
| Measurement Mode: | Absorbance |
| Measurement wavelength: | 340 nm |
| Number of flashes: | 50 |
| Plate definition file: | NUN96ftp.pdf |
| Number of kinetic cycles: | 16 bzw. 31 |
| Kinetik interval: | 60 bzw. 120 s |
| Valid temperature range: | 30 -37 °C |
| Shake duration between cycles (Orbital low): | 45 s |
| Target temperature: | 30 °C |

4.2.7.3 Differenzspektroskopie als Screeningmethode Die Differenzspektroskopie wurde zur Verwendung als Screeningmethode in 96-well ft Mikrotiterplatten (pureGrade™, Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland) durchgeführt. Das Screening wurde mit 250 μ l 5 μ M Enzymlösung in 50 mM KPP durchgeführt. Zunächst wurde die Enzymlösung vorgelegt und das substratfreie Spektrum von 300 - 500 nm gemessen. Anschließend wurden 5 μ M Testsubstanz (1,25 μ l, DMSO = 0,5 %) zugegeben. Danach wurden die Platten bei Raumtemperatur 15 min inkubiert bevor schließlich die Bindespektren aufgenommen wurden. Die Differenzspektren wurden durch Subtraktion der substratfreien Spektren von den Bindespektren (Microsoft Excell 2003, Microsoft Corporation, Redmond, USA) erhalten. Die eingestellten Parameter des Tecan-Saphire Plattenlesegerätes sind in Tabelle 4.7 aufgeführt.

Tabelle 4.7: XFluor4Safire II Einstellungen zum Anwenden der Differenzspektroskopie als Screeningmethode in 96-well Mikrotiterplatten

| Differenzspektroskopie als Screeningmethode: Reader Einstellungen | |
|---|-------------|
| Measurement Mode: | Absorbance |
| Wavelength scan type: | Absorbance |
| Wavelength start: | 300 nm |
| Wavelength end: | 500 nm |
| Scan number: | 21 |
| Wavelength step size: | 10 nm |
| Number of reads: | 100 |
| Plate definition file: | NUN96ft.pdf |
| Target Temperature: | 25 °C |

4.2.8 Ganzzellkatalyse

Um zu überprüfen, ob die CYP106A2-Substrate *in vivo* von *B. megaterium* ATCC13368 umgesetzt werden, wurden 50 ml mit 500 μ l einer *B. megaterium* Kryokultur beimpft und 24 h bei

30 °C und 150 rpm kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurden erneut 50 ml Kultur (in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen) beimpft und 16 h bei 30 °C und 150 rpm kultiviert. Anschließend erfolgte die Substratzugabe (200 μ M sofern nicht anders angegeben). Zur Analyse der Umsätze wurden 500 μ l Proben entnommen, mit Ethylacetat extrahiert, getrocknet und bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt. Die Dipterocarpolprodukte wurden mit 500 μ l einer frischen 16 h Kultur in 1,5 ml Eppendorfreaktiongefäßen umgesetzt, weil die vorhandenen Mengen für Umsetzungen in 50 ml nicht ausreichten. Die Umsetzungen erfolgten bei 30 °C für 60 min bei 1000 upm im Eppendorf-Thermomixer.

4.2.8.1 Bestimmung der Aktivität der *Bacillus megaterium*-Kulturen Um die Aktivität der *B. megaterium*-Kulturen über einen Zeitraum von 48 h zu bestimmen, wurden 50 ml Komplexmedium mit 500 μ l Zellen und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Kulturen wurden nach 16, 24 und 48 h zu je 500 μ l beprobt und die Aliquots in frische 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Zur Bestimmung der Aktivität wurden den Proben jeweils 100 μ M Substrat zugesetzt und 30 min bei 30 °C und 750 upm im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen durch Zugabe von 500 μ M Ethylacetat gestoppt und zweimal extrahiert. Nach Zusammenführen und Trocknen der organischen Phasen wurden die Umsätze mittels HPLC analysiert. Die Aktivität wurde über die Substratabnahme bestimmt. Zur Ermittlung der relativen Aktivitäten wurde die Aktivität nach 16 h Inkubation als 100 % (1) gesetzt und die übrigen Aktivitäten in Relation zum 16 h Wert dargestellt. Als Substrate dienten in diesem Falle Androstendion und Testosteron, da beide über ihre Keto-En Funktion einfach über die HPLC analysiert werden können und die Aktivität unabhängig von den in der Arbeit verwendeten Substraten überprüft werden sollte.

4.2.8.2 Bestimmung des P450-Gehalts in *B. megaterium* Zur Bestimmung des P450-Gehalts wurden 1 ml Proben bei 10000 g 10 min zentrifugiert und in 1 ml Lysepuffer (Tris HCl 50 mM, pH 8,0) resuspendiert. Dann wurden 1 mg/ml Lysozym und 1 mg/ml DNaseI frisch zugegeben

und die Zellen schließlich bei 37 °C 30 min inkubiert. Der Inkubation schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt zur Abtrennung der Zelldebris an. Der danach erhaltene gelblich-rote, durchsichtige Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgemäß überführt und ein CO-Differenzspektrum aufgenommen (s. u.).

4.2.8.3 Präparativer Substratumsatz Die Umsetzung größerer Mengen Substrat sowie die Charakterisierung der Steroidumsetzungen mit *Bacillus megaterium* ATCC13368 erfolgte in 2000 ml Schikanekolben. Die Substrate wurden grundsätzlich als ethanolische Lösung zugegeben, wobei der Anteil an Ethanol maximal 5 % (v/v) betrug. Die Umsetzungen wurden in 1 l Kultur, verteilt auf 4 Kolben zu je 250 ml durchgeführt. Die Zugabe der Substrate erfolgte nach 16-stündiger Kultivierung. Um den Verlauf der Reaktion zu verfolgen wurden nach 2, 4, 8 und 24 h Proben (500 µl) entnommen und mittels DC analysiert. War kein Substrat mehr detektierbar bzw. konnte keine weitere Reaktion mehr festgestellt werden, wurde die Reaktion nach Vereinen der Kulturen durch Zugabe von 500 ml Ethylacetat gestoppt und die Produkte durch dreimalige Flüssig-Flüssig-Extraktion mit je 500 ml Ethylacetat gewonnen. Nach Vereinen der organischen Phasen wurde das Ethylacetat im Rotationsverdampfer bis zur Trockne abrotiert. Der erhaltene bräunlich-gelbe Rückstand wurde für die Säulenchromatographie eingesetzt.

4.2.8.4 Umsetzungen mit ruhenden Zellen Als ruhende Zellen (engl. „resting cells“) werden lebende, nicht teilende Bakterienzellen bezeichnet. Diese werden in der Regel nach Ernten der Bakterien und ihrer Überführung in Puffer erhalten. Im Gegensatz dazu meint der Ausdruck wachsende Zellen (engl. „growing cells“) in Komplex- oder definierten Medien kultivierte, sich teilende Bakterienzellen. Die sogenannten ruhenden Zellen haben den Vorteil, dass Biokonversionen unabhängig vom Zellwachstum untersucht werden können [74, 84]. Zudem hat sich gezeigt, dass sich durch das Waschen der Zellen störende Nebenprodukte entfernen lassen, die ansonsten die Enzymreaktion hemmen können [85] oder die Analytik erschweren. Zur Herstellung ruhender *B. megaterium*-Zellen wurden 50 ml Komplexmedium mit 500 µl einer frischen

Übernachtskultur beimpft und 16 h bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4500 g für 10 min geerntet und in 50 ml sterilen 100 mM KPP (pH 7,4) überführt. Die Umsetzungen erfolgten dann analog zu denen mit wachsenden Zellen bei 30 °C in Schikankolben.

4.2.8.5 Umsetzungen mit *B. megaterium* MS941_CAA Zur Optimierung der CYP106A2-abhängigen Ganzzellkatalyse wurde von Bleif das Plasmid pSMF2.1CAA entwickelt, das erfolgreich in *B. megaterium* MS941 transformiert wurde und die heterologe Überexpression von CYP106A2 (267 nmol in einem Liter nach 24 h) sowie einer Elektronentransferkette bestehend aus bovinem Adrenodoxin₄₋₁₀₈ und boviner Adrenodoxinreduktase (AdR) ermöglicht [80]. Nach 24 h Expression (s.o.) wurden die Zellen geerntet und die Umsetzungen mit ruhenden MS941_CAA Zellen durchgeführt (s. o).

4.2.8.6 Berechnung von Umsatzrate, Ausbeute und Selektivität der *in vivo* Biokatalysen Sofern nicht anders angegeben bezeichnen die in der Arbeit aufgeführten Ausbeuten die Produktmengen (in mg, bzw. %) nach Reinigung der Umsätze über Kieselgel-60. Zudem wurden die maximalen (theoretischen) Ausbeuten der Reaktionen berechnet nach:

$$\eta_P = \sigma \cdot \chi \quad (5)$$

wobei der Substratumsatz χ in Prozent definiert wird als

$$\chi_S = \frac{[S]_0 - [S]}{[S]_0} * 100 \quad (6)$$

und die Selektivität der Reaktion bezogen auf das Substrat errechnet wird durch

$$\sigma_{SP} = \frac{[P] - [P]_0}{[S]_0 - [S]} \cdot \frac{v_S}{v_P} \quad (7)$$

wobei $v_{S,P}$ die stöchiometrischen Faktoren der Edukte bzw. Produkte darstellen.

4.2.9 Chromatographische Methoden

4.2.9.1 Dünnschichtchromatographie Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde zur Analyse der *in vitro* bzw. *in vivo* Umsetzungen von Substraten verwendet, welche keine UV-aktiven Gruppen besitzen und daher in der HPLC mit UV-VIS Detektor nur schlecht detektiert werden können. Des Weiteren wurde die DC zur Analyse der *in vivo* Umsetzungen in Komplexmedium verwendet. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten dünnschichtchromatographischen Analysen wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten verwendet (4 x 8 cm; Kieselgel 60; Schichtdicke, 0,2 mm; Roth, Karlsruhe Deutschland). Die getrockneten Extrakte aus den jeweiligen *in vivo* bzw. *in vitro* Umsetzungen wurden in 30 μ l Ethylacetat gelöst und zu 2 bzw. 4 μ l (sofern nicht anders angegeben) auf die DC-Platten aufgebracht. Nach vollständigem Verdampfen des Lösungsmittels wurden die Platten in einem rechteckigen Lösemitteltank einmal entwickelt und anschließend mit einem Heißluftföhn getrocknet. Die Analyten wurden durch Färbung mit einem Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz sichtbar gemacht. Dazu wurden die trockenen Platten in ein Färbebad (5 ml 4-Methoxybenzaldehyd, 3,75 ml Eisessig, 2,5 ml Schwefelsäure und 488,75 ml Ethanol) getaucht und die Farbreaktion durch Erhitzen mit dem Heißluftföhn auf ca. 100 °C gestartet. Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz reagiert mit Terpenoiden zu blau bis blauvioletten Produkten.

4.2.9.2 Säulenchromatographie Die präparative Trennung der in *B. megaterium* hergestellten Produkte erfolgte durch Normalphasen Säulenchromatographie unter Verwendung einer Handpumpe. Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 (0,040 - 0,063 nm) verwendet. Ca. 150 ml Kieselgel wurden in der mobilen Phase aufgeschlemmt und zügig in die Säule eingefüllt. Dabei wurde mit einem Korkring seitlich sanft gegen die Säule geklopft, um die Packungsdichte zu vergrößern und eine regelmäßige Packung zu erlauben („Quick-and-Dirty“-Methode). Dem

Kieselgel wurde eine Spatelspitze Seesand vorgelegt. Die Säule wurde nach Packen mit einem Messlöffel Seesand überschichtet. Die aus den präparativen Umsetzungen erhaltenen Rückstände wurden in bis zu 2 ml Ethylacetat gelöst und auf den Seesand aufgetragen. Nach Einsinken der Probe wurde die Säule mit mobiler Phase überschichtet, das Lösemittelresevoir (250 ml) angeschlossen und die Handpumpe angebracht. Der Säulendurchfluss wurde manuell gesammelt, die Fraktionsgröße betrug 15 ml. Die Fraktionen mit den entsprechenden Reaktionsprodukten wurden mittels DC-Analyse aufgespürt und diejenigen, die ausschließlich das gewünschte Reaktionsprodukt enthielten, vereinigt. Eine Auflistung der zur Reinigung der jeweiligen Reaktionsprodukte verwendeten Lösemittelgemische findet sich in Tabelle 4.8.

Tabelle 4.8: Auflistung der zur Säulenchromatographie verwendeten mobilen Phasen.

| Analyt | Lösemittel | Mischungsverhältnis |
|--|----------------------------|---------------------|
| DHEA-Umsatz | Ethylacetat | – |
| 7 β -OH-DHEA (Reinigung) | Hexan/Ethylacetat/Methanol | 1 : 4 : 0,5 |
| Pregnenolon (Umsatz) | Ethylacetat | – |
| Dipterocarpol (Umsatz) | Hexan/Ethylacetat | 1 : 1 |
| 7 β -OH-Dipterocarpol (Reinigung] | Hexan/Ethylacetat | 1 : 3 |
| 7 β ,11 α -OH ₂ -Dipterocarpol (Reinigung) | Ethylacetat | – |

4.2.9.3 rpHPLC Für die Umkehrphasen Hochdruckflüssigkeitschromatographie, kurz rp-HPLC (engl. *reversed phase high performance liquid chromatographie*, rpHPLC) wurde die JASCO 900ter Serie (Pu-980 HPLC Pumpe, AS-950 Fraktionssammler, UV-975 UV/vis Detektor, und LG-980-02, Gradienteneinheit (Jasco, Gross-Umstadt, Germany)) bzw. die 2000ter Serie verwendet. Alle Analysen wurden auf einer Umkehrphasen ec MN Nucleodor C18-Säule (5 μ m, 4,0 * 125 mm) (Macherey Nagel, Bethlehem, PA, USA) bei konstanter Flussrate (1,0 ml/min) und Temperatur des Säulenofens (40 °C, Thermostat BFO-04 (W.O Electronics, Langenzersdorf, Österreich)) durchgeführt. Alle verwendeten Lösemittel waren von HPLC-Reinheit. Die Lösemittel,

die bei Detektionen bei 210 nm eingesetzt wurden, waren von „Gradient-Grade“-Reinheit. Das verwendete Wasser wurde mit der Milli-Q-Biocell (Millipore, Bedford, MA, USA) gereinigt. Die Detektion der Steroide und Terpenoide mit Keto-En-Struktur erfolgte bei 240 nm, die Flavonoide und Noscapin wurden bei 254 nm detektiert. Die keine konjugierte Doppelbindungen enthaltenden Substanzen wurden bei 210 nm vermessen. Die Integration der Peakflächen erfolgte mit der Jasco-Chrompass Chromatographie Software (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) und die Auswertung der Daten wurde mit der Origin Pro 8.6 Software (Origin Lab, MA, USA) durchgeführt. Die LC-MS-Messungen wurden im Rahmen einer Kooperation mit Denis Pompon (CNRS Gif-Sur-Yvette, Paris (jetzt Toulouse), durchgeführt. Dort wurde ein Waters®Alliance®HT LC/MS System verwendet. Die Messungen wurden eigenständig unter Anleitung von Dr. Philippe Urban durchgeführt.

4.2.10 Kernspin-Resonanz-Spektroskopie

Alle in dieser Arbeit gezeigten NMR-Analysen wurden von Dr. J. Zapp (Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken) durchgeführt. Die NMR-Spektren wurden mit einem DRX 500 NMR-Spektrometer der Firma Bruker (Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen.

4.2.11 Zellkultur

Die COS-1 bzw. HeLa-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM High-Glucose, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), mit 5 % fötalem Kälberserum angereichert bei 37 °C, 95 % rel. Luftfeuchte in sterilen Zellkulturschalen kultiviert. 500 ml Medium wurde vor Verwendung 5 ml Streptomycin-Penicillin Mix (100x, Corning, Virginia, USA) zugegeben. Die Zellen waren vor Verwendung maximal vier Passagen alt, um möglichst vitale Zellen zu verwenden.

4.2.11.1 XTT-basierter Zytotoxizitätstest Zytotoxizitätstests wurden mit dem „In vitro Toxicology Assay Kit, XTT-based“ (TOX-2) von Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA) durchgeführt [86]. Die Zellen wuchsen dafür bis zu ca. 80 % Konfluenz, wurden anschließend trypsinisiert, zu je 10.000 Zellen pro Vertiefung in 96-well Platten ausgesät und erneut 24 h bebrütet. Anschließend wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen (0-250 μ M) der Testsubstanzen versetzt. Als Lösemittel diente in allen Fällen DMSO, wobei serielle Verdünnungen verwendet wurden, so dass stets das gleiche DMSO Volumen eingesetzt wurde, wobei die Gesamtmenge an DMSO 1 % (v/v) nicht überschritt. Somit sollten Lösungsmittelleffekte weitestgehend ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurden jeweils eine DMSO-Kontrolle und eine Kontrolle mit unbehandelten Zellen mitgeführt. Alle Tests wurden in mindestens dreifacher Ausführung gemacht. Die Behandlung der Zellen erfolgte für 24 h bei 37 °C, 95 % rel. Luftfeuchte und 5 % CO₂. Anschließend wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen einmal mit 100 μ l PBS gewaschen. Danach wurden 100 μ l DMEM ohne Phenolrot, mit 20 % XTT (nach Herstellerangaben angesetzt) zugegeben und zusammen mit den Zellen 2 -4 h inkubiert. Die Bildung des orange-gelben Formazansalzes durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen wurde fotometrisch im Mikrotiterplattenreader vermessen. Aus den erhaltenen Absorptionen (A_{450} (spezifisch für das Tetrazoliumsalz) und A_{650} (unspezifische Absorption) wurde die Viabilität der Zellen errechnet durch:

$$\text{Viabilität} : A = A_{450}(\text{Test}) - A_{650}(\text{Test}) - A_{450}(\text{Kontrolle}) \quad (8)$$

5 Ergebnisse

5.1 Substratscreening

5.1.1 NADPH-Verbrauch als Screeningmethode

Cytochrome P450 beziehen die für ihre Katalyse benötigten Elektronen von externen Donatoren, meist NADH oder NADPH. Dabei wird pro gebildetem Produktmolekül ein Äquivalent NADPH zu NADP⁺ oxidiert (S. Gl. 1). Dieser stöchiometrische NADPH-Verbrauch kann spektralfotometrisch verfolgt werden, da NADPH im Gegensatz zur oxidierten Form NADP⁺ ein typisches Absorptionsmaximum bei 340 nm besitzt. Diese Eigenschaft sollte dazu verwendet werden, neue Substrate für CYP106A2 aus einer 502 Substanzen umfassenden Naturstoffbibliothek zu identifizieren. Zunächst wurde überprüft, ob die Absorption im gewünschten Konzentrationsbereich mit der Konzentration linear steigt. Es wurden Kavitäten einer 96-well Mikrotiterplatte mit Umsatzpuffer und NADPH (0-200 μ M) beschickt (Endvolumen 250 μ l) und die Absorption bei 340 nm gemessen. Die Zunahme der Absorption bei 340 nm verläuft in Abhängigkeit der NADPH-Konzentration stetig bis zur maximal eingesetzten Konzentration (200 μ M) (s. Abb. 5.1).

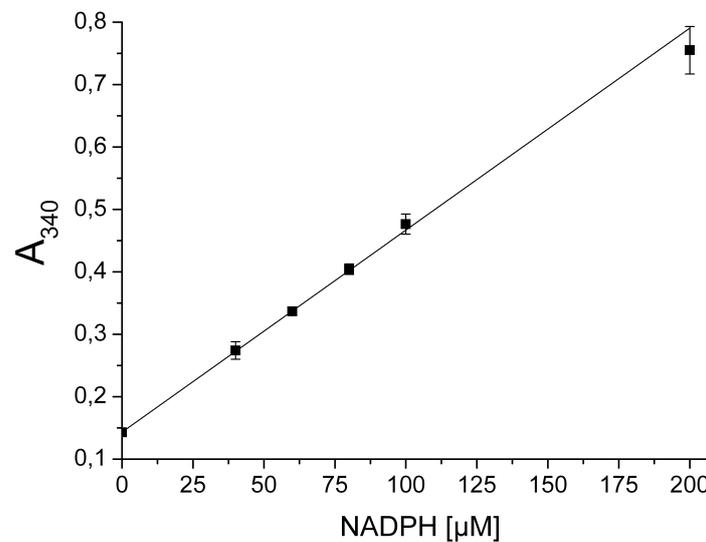


Abbildung 5.1: Absorptionsmessung bei 340 nm: 0 - 200 μM NADPH in 250 μl 50 mM HEPES pH 7,4. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur in einer 96-well Mikrotiterplatte. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen.

Das CYP106A2-Enzymsystem wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der bovinen AdR und einer verkürzten Form des bovinen Adx (Adx₄₋₁₀₈) rekonstituiert. Bereits 1993 zeigten Hanukoglu et al., dass bei der Elektronenübertragung von NADPH auf CYP11A1 via AdR und Adx Elektronen abfließen. Um das Maß des Elektronenverbrauchs des hier verwendeten rekonstituierten Systems ohne stattfindende Katalyse zu bestimmen, wurde der NADPH-Verbrauch ohne Substratzugabe gemessen. Dem auf 30 °C temperierten Reaktionsgemisch (CYP106A2/AdR/Adx (1/2/10)), in 50 mM HEPES pH 7,4) wurden dazu 100 μM ebenfalls 30 °C warmes NADPH (gelöst in 50 mM HEPES pH 7,4) zugegeben und die Absorption bei 340 nm über 30 min gemessen. Nach 30 min betrug die relative NADPH Abnahme durchschnittlich $39,2 \pm 7,2 \%$ (s. Abb. 5.2). Insgesamt zeigt die Abnahme einen linearen Verlauf, es zeichnet sich keine Sättigung ab.

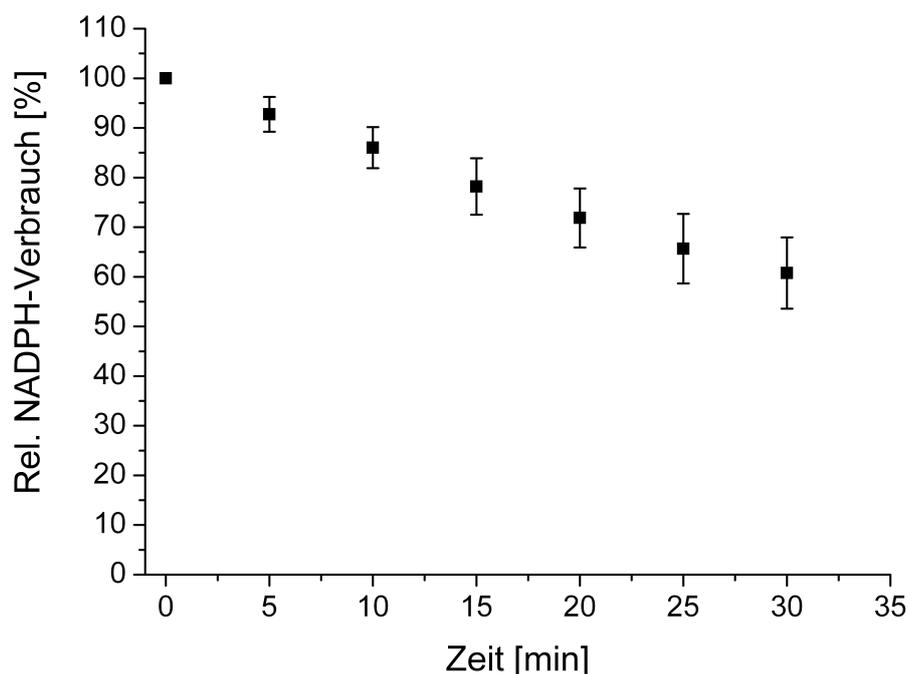


Abbildung 5.2: NADPH-Abnahme in Abwesenheit von Substrat: Der Reaktionsansatz bestand aus 0,5 μM CYP106A2, 5 μM Adx und 1 μM AdR in 50 mM HEPES pH 7,4 (supplementiert mit 0,05 % Tween 20). Dem auf 30 °C vorgewärmten Reaktionsansatz wurden 100 μM ebenfalls 30 °C warmes NADPH zugesetzt und die Absorption (340 nm) bei 30 °C über 30 min verfolgt und die prozentuale Abnahme ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Messungen.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Substratumsetzung durch Erfassung des NADPH-Verbrauchs gemessen werden kann. Dazu wurde der gleiche Ansatz gewählt und diesmal das Steroids substrat Desoxycorticosteron (300 μM) zugesetzt. In Anwesenheit des Substrats DOC wird das NADPH in den ersten Minuten der Reaktion deutlich schneller verbraucht, als im Vergleich zur substratfreien Kontrolle und liegt nach 10 min schon bei durchschnittlich $60,87 \pm 1,66$ % (s. Abb. 5.3). Zwischen 8 und 10 min beginnt die NADPH-Abnahme zu stagnieren.

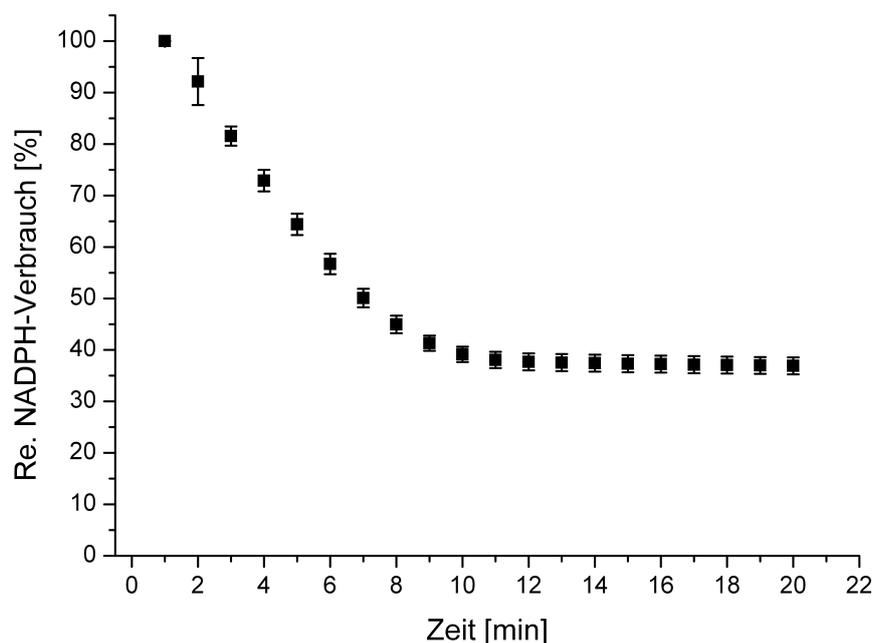


Abbildung 5.3: NADPH-Verbrauch bei Reaktion mit dem Substrat Desoxycorticosteron: Der Reaktionsansatz bestand aus $0,5 \mu\text{M}$ CYP106A2, $5 \mu\text{M}$ Adx und $1 \mu\text{M}$ AdR in 50 mM HEPES pH 7,4 (supplementiert mit $0,05 \%$ Tween 20) und $300 \mu\text{M}$ DOC. Dem auf $30 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmten Reaktionsansatz wurden $100 \mu\text{M}$ ebenfalls $30 \text{ }^\circ\text{C}$ warmes NADPH zugesetzt und die Absorption (340 nm) bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ über 30 min verfolgt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf Messungen.

Da diese Methodik zur Identifikation neuer Substrate aus der Biomol-Naturstoffbibliothek angewandt werden sollte, wurde ein Testscreen mit bekannten Substraten durchgeführt. Als Negativkontrollen diente das bis dato als Substrat des CYP106A2 identifizierte DHEA sowie das Lösungsmittel Ethanol (ohne Substrat) und der unspezifische P450-Inhibitor Imidazol (je $300 \mu\text{M}$). Die bekannten Steroidsubstrate des CYP106A2 beschleunigten alle den Verbrauch an NADPH in den ersten 10 min der Reaktion (siehe Abb. 5.5). Im substratfreien Ansatz sowie in dem Ansatz mit Imidazol war die Abnahme an NADPH dagegen deutlich langsamer. Überraschenderweise war jedoch auch die Abnahme von NADPH in Gegenwart der vermeintlichen Negativkontrolle DHEA stark beschleunigt (s. Abb.5.5) und lag nach 10 min bei rund 50% . Zunächst lag die Vermutung nahe, dass die Bindung von DHEA eine Entkopplungsreaktion zur Folge hat, da DHEA bereits in der Vergangenheit ohne Erfolg als Substrat für CYP106A2 eingesetzt wurde [61]. Daher wurde die DHEA-Reaktion nachfolgend mittels HPLC analysiert und eine Produktbildung

konnte aufgezeigt werden (s. Abschnitt 2.1.4). Damit gelang in dieser Arbeit erstmalig die Identifizierung eines 3-hydroxy- Δ^5 -Steroids als Substrat von CYP106A2.

Allerdings waren die verwendeten Substratkonzentrationen von $300 \mu\text{M}$ zum Screenen der Naturstoffbibliothek nicht einsetzbar, da diese nur jeweils 1 mg der jeweiligen Substanzen enthält. Dadurch lassen sich von manchen dieser Substanzen keine $300 \mu\text{M}$ Lösungen herstellen. Es wurden deshalb auch niedrigere Substratkonzentrationen eingesetzt und untersucht, ob sich der NADPH-Verbrauch als Screeningmethode eignet. Allerdings ließ sich im angestrebten Konzentrationsbereich (bis max. $50 \mu\text{M}$ Substrat) eine substratabhängige Abnahme des NADPH nicht mehr feststellen. Die Verringerung der NADPH-Konzentration, damit das Verhältnis von Substrat und NADPH nicht geändert wird, führte dazu, dass zu Beginn der Messung bereits zu viel NADPH verbraucht war, so dass ein Umsatz nicht mehr eindeutig nachgewiesen werden konnte. Daher wurde auf die Anwendung des NADPH-Assays zum Screenen der Naturstoffbibliothek verzichtet.

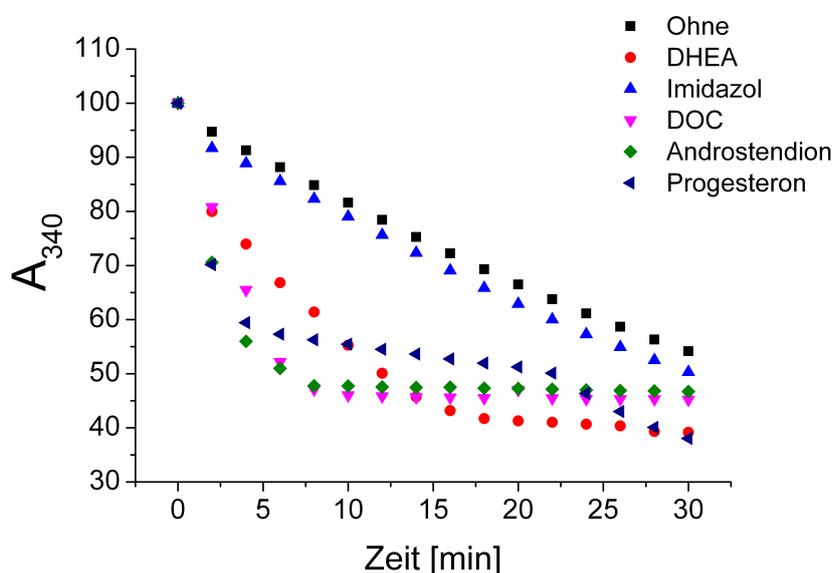


Abbildung 5.4: Test-Screen: Messung des NADPH-Verbrauchs in einer 96-well Mikrotiterplatte: Reaktionsansatz bestand aus $0,5 \mu\text{M}$ CYP106A2, $5 \mu\text{M}$ Adx und $1 \mu\text{M}$ AdR in 50 mM HEPES pH 7,4 (supplementiert mit $0,05 \%$ Tween 20). Dem auf $30 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmten Reaktionsansatz wurden $100 \mu\text{M}$ ebenfalls $30 \text{ }^\circ\text{C}$ warmes NADPH zugesetzt und die Absorption (340 nm) bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ über 30 min verfolgt. Die Substrate Androstendion, DOC und Progesteron, der Inhibitor Imidazol sowie die Negativkontrolle DHEA wurden zu je $300 \mu\text{M}$ zugesetzt, ein Ansatz („ohne“) enthielt nur das Lösungsmittel Ethanol (1% (v/v)).

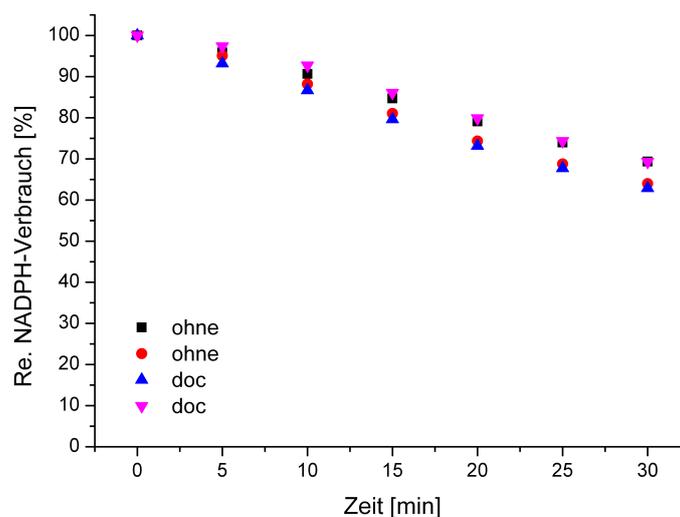


Abbildung 5.5: Messung des NADPH-Verbrauchs in 96-well Mikrotiterplatte: Reaktionsansatz bestand aus $0,5 \mu\text{M}$ CYP106A2, $5 \mu\text{M}$ Adx und $1 \mu\text{M}$ AdR in 50 mM HEPES pH 7,4 (supplementiert mit $0,05 \%$ Tween 20). Dem auf $30 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmten Reaktionsansatz wurden $100 \mu\text{M}$ ebenfalls $30 \text{ }^\circ\text{C}$ warmes NADPH zugesetzt und die Absorption (340 nm) bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ über 30 min verfolgt. Getestet wurden $100 \mu\text{M}$ DOC im Vergleich zu substratfreien Proben, denen nur das Lösungsmittel Ethanol zugesetzt wurde (1% (v/v)).

5.1.2 Differenzspektroskopie als Screeningmethode

Die Bindung eines Substrates im aktiven Zentrum von P450 Enzymen führt in der Regel zur Überführung des Häm-Eisens in den HS-Zustand. Diese Änderung des Spinzustandes führt auch zu einer Änderung der Absorption der Häm-Gruppe (s. Abschnitt 3.2.4). Das Maximum der Soretbande ist im Low-Spin-Zustand bei 417 nm und verschiebt sich im High-Spin-Zustand zu niedrigeren Wellenlängen, etwa zwischen 380 und 390 nm [87].

Um die Differenzspektroskopie als Screeningmethode anzupassen, wurden zunächst Versuche durchgeführt, um sowohl die eingesetzte Enzym- als auch Substratmenge, die zur Darstellung eines Spin-Shifts benötigt werden, zu minimieren. Die Ermittlung des besten Enzym-Substrat-Verhältnisses wurde zunächst im Zweistrahlphotometer mit Quarz-Küvetten (Schichtdicke 1 cm , $400 \mu\text{l}$ Messvolumen) durchgeführt. Als Testsubstanz diente Cholestenon, eines der bis dato wenig bekannten HS-Substrate von CYP106A2. Beginnend mit $10 \mu\text{M}$ Substrat und $10 \mu\text{M}$ Enzym wurden verschiedene Verhältnisse ausgetestet. Schließlich konnte gezeigt werden, dass sich

bei äquimolarem Verhältnis von 5 μM Cytochrom mit 5 μM Substrat die Spin-Verschiebungen durch Substratbindung gut nachweisen lassen. Bei geringerer Cytochrom- und/oder Substratkonzentration konnten keine Spin-Shifts mehr detektiert werden. Anschließend wurden die Messungen in 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt. Zunächst wurde versucht, die Spinverschiebung mit absoluten Spektren statt mit Differenzspektren nachzuweisen. Der substratinduzierte Übergang vom LS- zum HS-Zustand der P450 Proteine ist aber nicht selten gering. Diese Beobachtung konnte auch für CYP106A2 gemacht werden, bei dem der HS-Anteil des cholestenon gebundenen Enzyms bei ca. 12 % liegt. Absolute Spektren eigneten sich daher nicht zur Darstellung der Spinverschiebung im Screeningverfahren (s. Abb. 5.6). Im Folgenden wurde daher versucht, drei Kavitäten nur mit Enzymlösung zu beschicken und als Referenzwerte zur Berechnung der Differenzspektren zu benutzen. Dieses Verfahren führte in den Tests allerdings zu keinen guten Ergebnissen, da sich die Messungengenauigkeit zwischen den einzelnen Kavitäten als recht hoch erwiesen hat.

Daher wurden zunächst alle Kavitäten mit Enzymlösung befüllt und die Absorptionsspektren von 300 bis 500 nm gemessen. Anschließend wurden die Testsubstanzen zugegeben (1,25 μl DMSO-Lösung) und nach 15-minütiger Inkubation erneut vermessen. Die Differenzspektren wurden durch manuelle Subtraktion der substratfreien Spektren von den Substratbindespektren mit Excel erhalten.

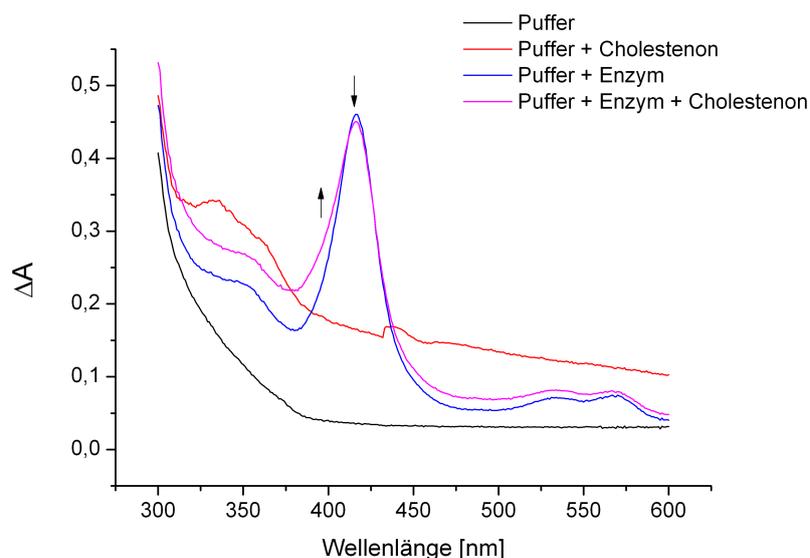


Abbildung 5.6: Absorptionsspektren aufgenommen in 96-well Mikrotiterplatten: Messvolumen 250 μ l, Absorption aufgenommen zwischen 300 und 500 nm, in 10 nm Schritten, bei 25 °C. Die Spektren stellen Einzelmessungen aus unterschiedlichen Kavitäten (engl. „wells“) einer Platte dar.

Mit diesen Bedingungen wurde ein „Test-Screen“ durchgeführt, mit Betulinsäure und Cholestenon als Typ I-Substrat, Imidazol als Typ II-Inhibitor, 11-Desoxycorticosteron (DOC) und Pregnenolon als Negativ- und DMSO als Lösemittelkontrolle. Die Abbildung 5.7 zeigt, dass die beiden Positivkontrollen Betulinsäure und Cholestenon jeweils ein Typ I-Spektrum generieren, wobei $\Delta A_{380-420}$ mit Betulinsäure (0,10) deutlich größer ist als mit Cholestenon (0,02). Entgegen den in der Literatur beschriebenen Daten induzierte DOC unter den oben genannten Bedingungen ebenfalls einen High-Spin-Shift ($\Delta A_{380-420} = 0,047$). Unter Screeninbedingungen beträgt der HS-Anteil des CYP106A2 im betulungebundenen Zustand demnach ca. 22 %, mit 11-Desoxycorticosteron ca. 10 % und mit Cholestenon 4 %. Die anderen Spektren entsprachen den Erwartungen, bei Zugabe von Pregnenolon bzw. DMSO allein ändert sich die Absorption des Enzyms nicht, durch Verdünnung der Probe nimmt lediglich die Absorption bei 420 nm ab (s. Abb. 5.7).

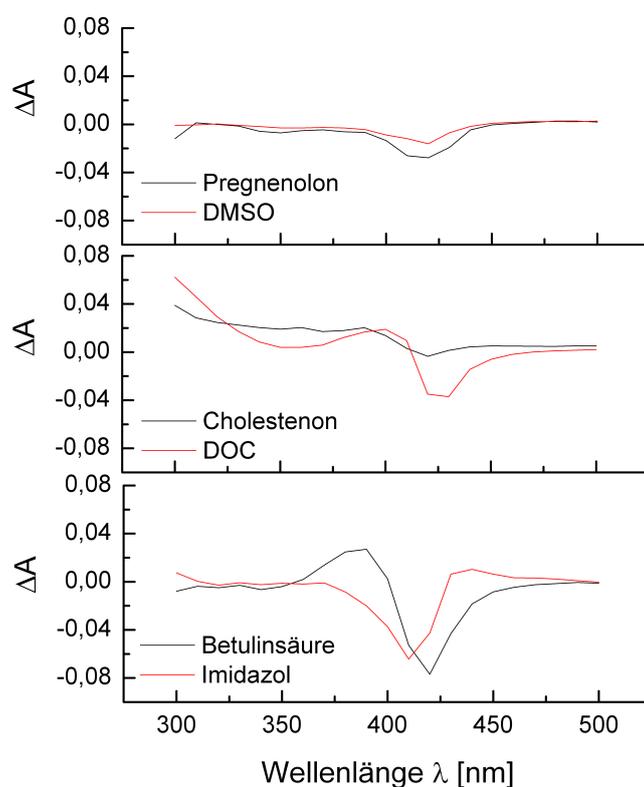


Abbildung 5.7: Testscreen in einer 96-well Platte: 5 μM P450 (in 50 mM KPP, 250 μl) versetzt mit je 5 μM Substanz (DMSO 1 % (v/v)).

Die Naturstoffbibliothek wurde daraufhin mit diesen Bedingungen auf neue Substrate für CYP106A2 durchmustert. Das Screening erzielte 12 Treffer, darunter die bereits bekannten vier Typ I-Substrate; Oleanolsäure, Betulinsäure, Glycyrrhitinsäure und Ursolsäure [77, 78]. Es konnten weiterhin acht bisher in der Literatur nicht beschriebene Typ I-Liganden des CYP106A2 erfasst werden: Rhamnetin, Geraldol, Alpha-apo-Oxytetracyclin, Noscadin, Sarsasapogenin, Panaxadiol, Dipterocarpol und Betulin (s. Abb. 5.9, 5.10) [88]. Nachfolgende Messungen im Zweistrahlphotometer bestätigten die Ergebnisse des Screenings.

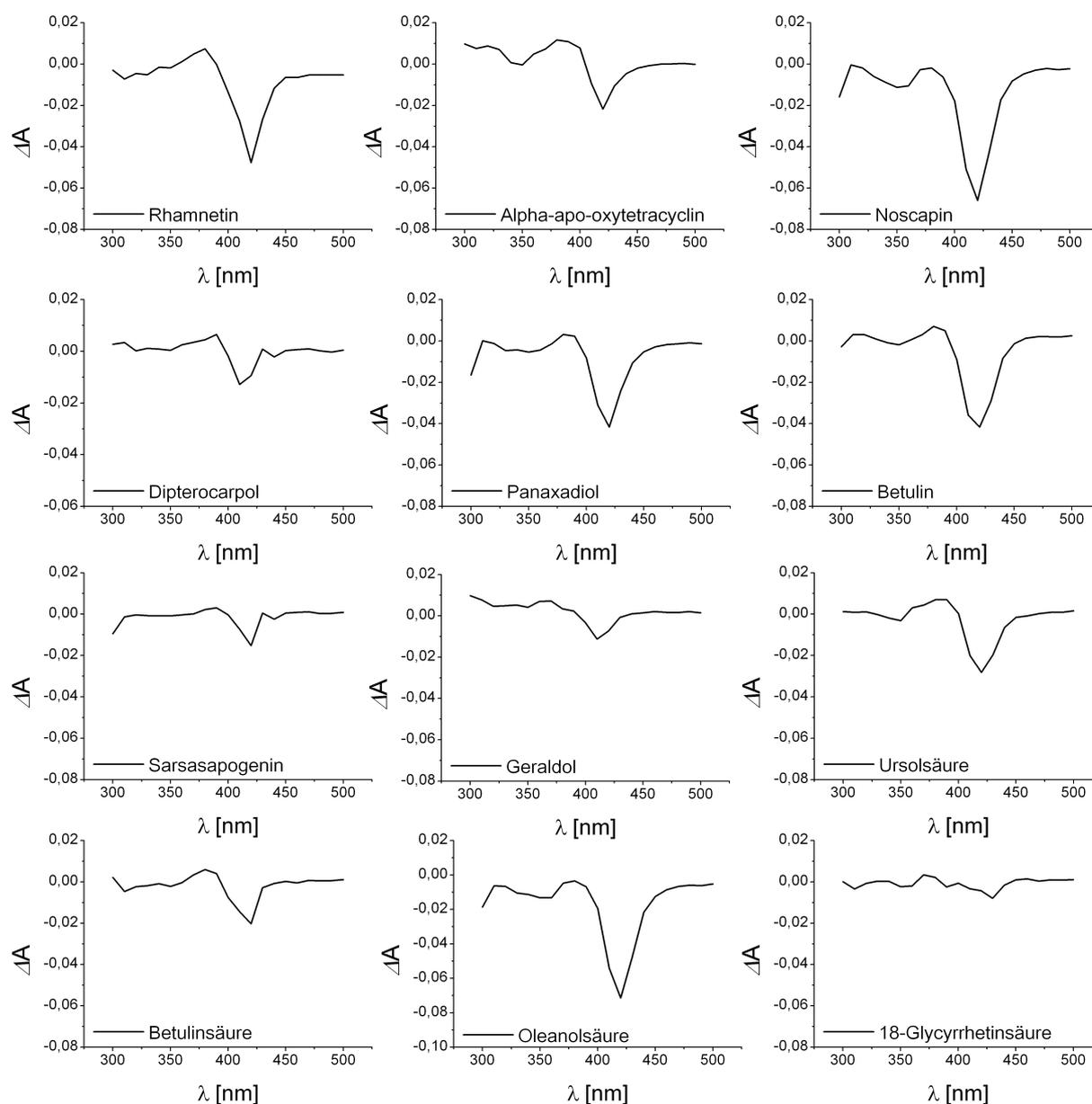


Abbildung 5.8: Screening Hits: Erhaltene Typ I-Spektren nach Screenen der Naturstoffbibliothek mit CYP106A2 in 96-well Mikrotiterplatten. Verwendet wurden $5 \mu\text{M}$ Cytochrom und $5 \mu\text{M}$ Substanz (gelöst in DMSO (1 % (v/v))) in 50 mM KPP pH 7,4. Die Messungen wurden bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ im Plattenleser durchgeführt. Die Messung erfolgte von 300 bis 500 nm in 10 nm Schritten und 100 reads/well. Zunächst wurden die Platten mit Proteinlösung beschickt und vermessen, dann erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen und nach 15 min Inkubation bei RT wurden die Platten erneut vermessen, die Differenzspektren wurden durch die Subtraktion der substratgebundenen von den substratfreien Spektren (Excel 2003) erhalten.

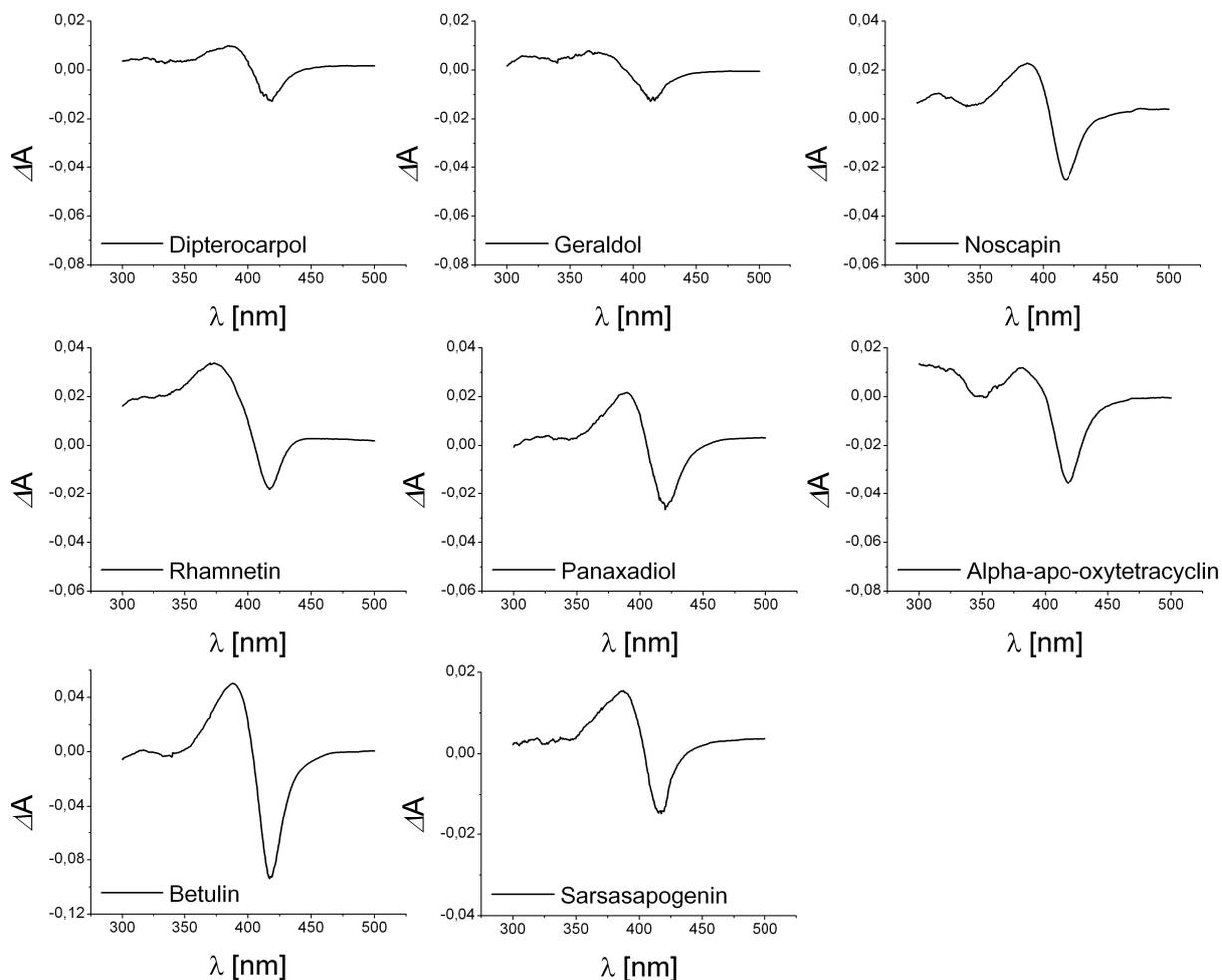


Abbildung 5.9: Screening Hits: Differenzspektren der 8 neu identifizierten Screening Hits im Zweistrahl-
fotometer. Verwendet wurden $5 \mu\text{M}$ Cytochrom und $5 \mu\text{M}$ Substanz (gelöst in DMSO (1 % (v/v))) in
50 mM KPP pH 7,4. Die Messungen wurden bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ Küvettentemperatur durchgeführt. Nach Zugabe
der Substrate wurden die Proben 15 min inkubiert.

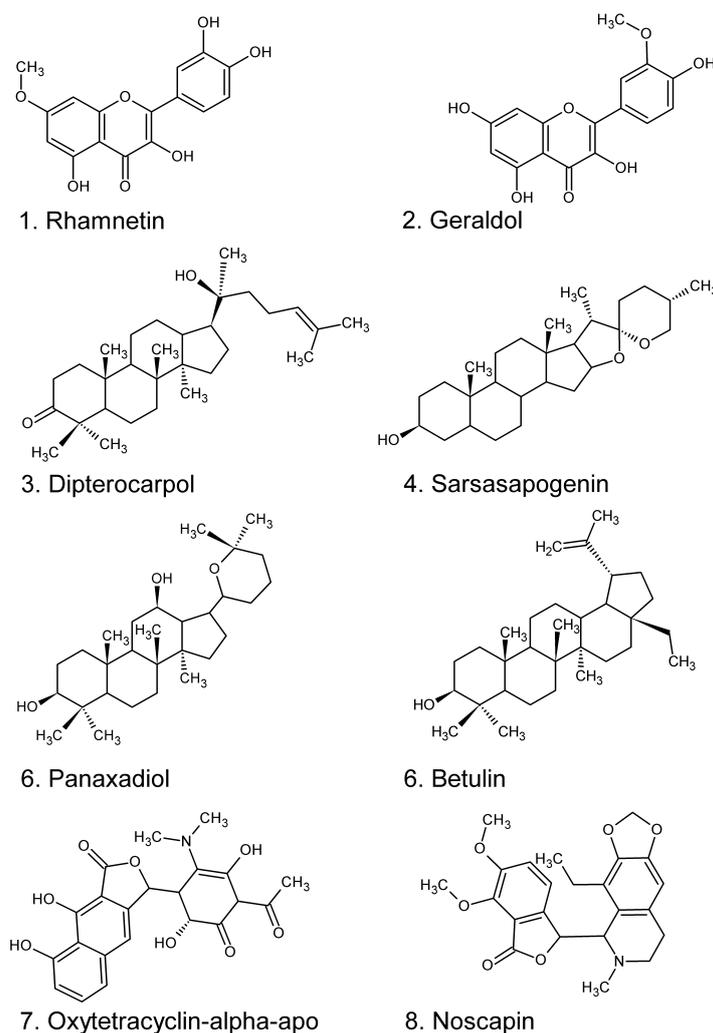


Abbildung 5.10: Screening Hits Strukturen

Die Qualität eines Screeningsystems misst sich maßgeblich am Anteil falsch-negativer Ergebnisse. Um falsch-negative Ergebnisse im hier durchgeführten Screening auszuschließen, wurden mit Substanzen, die unter Screeningbedingungen keinen HS-Shift in CYP106A2 induziert hatten, den Treffern aber strukturell ähnlich sind, Differenzspektren im Zweistahlphotometer aufgenommen. Als Stichproben wurden Quercetin, Quassin, Luteolin, Sitosterol, Dihydroxyflavon, Cino-bufagen und Panaxatriol ausgewählt. Von diesen Substanzen induzierte keine einen Spin-Shift, weshalb von einer vernachlässigbar geringen Rate falsch-negativer Ergebnisse ausgegangen werden kann. Die Differenzspektroskopie stellte sich damit als sensitive Screeningmethode dar, weil

alle gefundenen Typ I-Liganden durch Messungen im Zweistrahlphotometer bestätigt und keine falsch-negativen Messergebnisse verzeichnet werden konnten.

5.1.3 *In vitro* Umsetzungen der Screening Hits

Diejenigen Substanzen, deren Bindung an CYP106A2 in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen wurde, wurden in einem *in vitro* rekonstituierten System bezüglich einer Umsetzung durch CYP106A2 getestet. Die Analyse der Umsetzungen wurde je nach Struktur mittels HPLC (UV-aktives π -Elektronensystem) oder DC (Terpenoide ohne konjugierte Doppelbindungen) durchgeführt. Nachweislich entstanden nur bei der Reaktion von CYP106A2 mit den beiden Triterpenoiden Dipterocarpol und Betulin Produkte.

Mittels Differenzspektroskopie wird die Interaktion von Substanzen im aktiven Zentrum spektrofotometrisch dargestellt. Deshalb kann diese Methode zur Bestimmung der Bindungskonstanten herangezogen werden, wobei zu beachten ist, dass CYP106A2 auch im substratgesättigten Zustand nicht zu 100 % als HS-Enzym vorliegt: Damit können die so ermittelten Dissoziationskonstanten K_D nur näherungsweise die Realität widerspiegeln. Der K_D -Wert von Betulin wurde durch Titration einer 10 μM CYP106A2 Lösung in 50 mM KPP pH 7,4 mit 0-50 μM Betulin in Tandemküvetten bestimmt. Der K_D -Wert von Betulin beträgt $16 \pm 2 \mu\text{M}$, ihre Affinität ist damit vergleichbar mit der, der Betulinsäure (K_D 14,5 μM) [78].

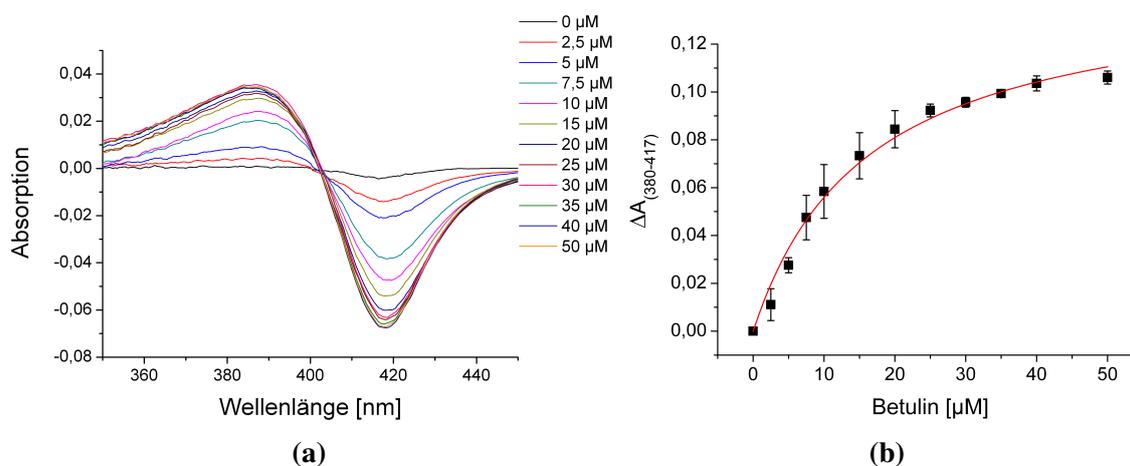


Abbildung 5.11: Titration von Betulin zu je 10 μM CYP106A2 gelöst in 50 mM KPP (pH 7,4) von 0 - 50 μM (a). Die Dissoziationskonstante (K_D) wurden durch Plotten der Differenzen $\Delta A_{388-417}$ gegen die eingesetzte Substratkonzentration und anschließende hyperbolische Regression zu 16 ± 2 bestimmt (b).

Die Reaktion von Betulin resultierte in einem Produkt, das mit dem Laufmittelgemisch Hexan/Ethylacetat 50/50 mit einem R_f -Wert von 0,28 eluierte. Da das gebildete Reaktionsprodukt polarer als das Substrat ist und zudem für CYP106A2 bisher nur Hydroxylierungsreaktionen beschrieben sind, handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein hydroxyliertes Reaktionsprodukt. Leider gelang es nicht, genügend Produkt für eine anschließende NMR-Analyse zu gewinnen. Versuche, das potentiell hydroxylierte Produkt mittels Massenspektrum nachzuweisen, schlugen fehl, da die Substanz weder durch MALDI- noch durch ESI-Verfahren ionisiert werden konnte. Die Umsetzung von Betulinsäure mit dem *Bacillus megaterium* ATCC13368 wurde bereits intensiv untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Betulinsäure zu mehreren, u. a. auch an Position 7, hydroxylierten Produkten umgesetzt wird. Chatterjee et al. beschrieben, dass wahrscheinlich mehrere Enzyme an der Metabolisierung beteiligt sind. Zudem sind die Betulinsäure, Betulin und ihre Derivate auch unter pharmakologischen Gesichtspunkten bereits untersucht, so dass die Umsetzung dieser Substanz im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde [89, 90, 91, 92, 93].

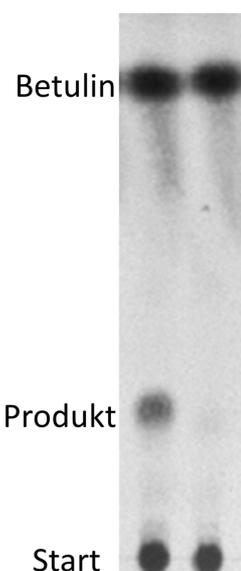


Abbildung 5.12: DC-Chromatogramme der *in vitro* Umsetzung von Betulin zu einem potentiell hydroxylierten Hauptprodukt mit CYP106A2. Das rekonstituierte Enzymsystem bestand aus $0,25 \mu\text{M}$ CYP106A2, $1 \mu\text{M}$ AdR und $5 \mu\text{M}$ Adx sowie einem NADPH-Regenerationssystem. Die Reaktion erfolgte bei 30°C für 30 min in $500 \mu\text{l}$ HEPES pH 7,4. Der Reaktionsansatz wurde zweimal mit je $500 \mu\text{l}$ Ethylacetat extrahiert und mittels DC, unter Verwendung von Ethylacetat und Hexan (1:1) als mobiler Phase, analysiert. Die Analyten wurden mit einem Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz gefärbt. Eine Negativkontrolle (Reaktionsansatz ohne CYP106A2) ist links dargestellt

Die Dissoziationskonstante von Dipterocarpol wurde ebenfalls mittels Differenzspektroskopie bestimmt und betrug $2,83 \pm 0,35 \mu\text{M}$ [88]. Damit bindet Dipterocarpol etwa 8 mal stärker an CYP106A2 als Betulin. Die Affinität von Dipterocarpol ist vergleichbar mit anderen Substraten von CYP106A2, etwa von 11-Desoxycorticosteron ($K_D = 5,2 \mu\text{M}$) und Oleanolsäure ($K_D = 5,89 \mu\text{M}$). Generell liegen die K_D -Werte der CYP106A2 Substrate im unteren mikromolaren Bereich. Jedoch ist anzumerken, dass für viele Substrate des Enzyms die Dissoziationskonstante nicht bekannt ist, weil die meisten Steroide und die Abietinsäure keinen HS-Shift induzieren und sich der K_D -Wert daher nicht einfach über Differenzspektroskopie messen lässt. Die Affinitäten der CYP106A2-Substrate ist, verglichen mit den natürlichen Substraten der humanen steroidmetabolisierenden und an anderen anabolen Stoffwechselwegen beteiligten P450s (die Familien 5-51), nicht besonders hoch. Allerdings weisen die Cytochrom P450 Enzyme der Leber (Familien 1-3),

die den Fremdstoffwechsel übernehmen, ebenfalls oft weniger starke Affinitäten gegenüber ihren Substraten auf [31]. Die niedrigen Affinitäten von CYP106A2 gegenüber seinen bisher bekannten Substraten sprechen dafür, dass diese Steroidhydroxylase nicht am anabolen Stoffwechsel von *B. megaterium* beteiligt ist, sondern ähnlich den Lebercytochromen bei der Entgiftung mitwirken könnte. Diese These wird dadurch gestützt, dass das Enzym erst in der stationären Phase gebildet wird.

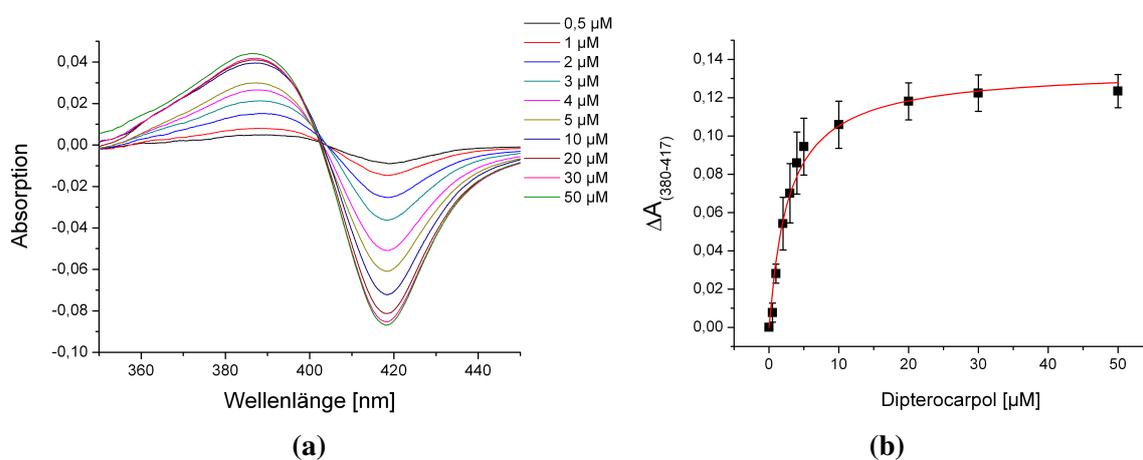


Abbildung 5.13: Titration von Dipteroicarpol (a) zu je 10 μM CYP106A2 gelöst in 50 mM KPP (pH 7,4) von 0 - 50 μM . Die Dissoziationskonstante (K_D) wurde durch Plotten der Differenzen $\Delta A_{388-417}$ gegen die eingesetzte Substratkonzentration und anschließender hyperbolischer Regression zu (b) $2,83 \pm 0,35$ bestimmt.

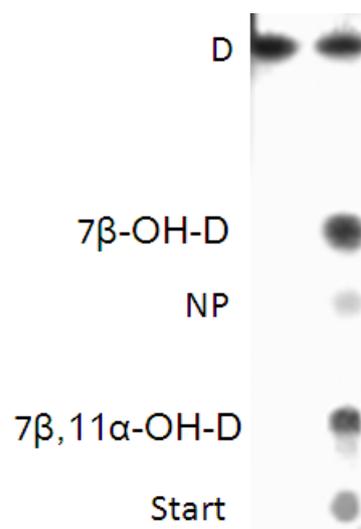


Abbildung 5.14: DC-Chromatogramme der *in vitro* Umsetzung von Dipterocarpol: Das rekonstituierte Enzymsystem bestand aus 0,25 μM CYP106A2, 1 μM AdR und 5 μM Adx sowie einem NADPH-Regenerationssystem. Die Reaktion erfolgte bei 30 °C für 30 min in 500 μl HEPES pH 7,4. Der Reaktionsansatz wurde zweimal mit je 500 μl Ethylacetat extrahiert und mittels DC, unter Verwendung von Ethylacetat und Hexan (1:1) als mobiler Phase, analysiert. Die Analyten wurden mit einem Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz gefärbt. Es konnten drei Produkte mit den respektiven R_f -Werten 0.62, 0.42 und 0.21 detektiert werden. Eine Negativkontrolle (Reaktionsansatz ohne CYP106A2) ist links aufgetragen.

Bei der Umsetzung von Dipterocarpol mit CYP106A2 konnten drei Produkte (P1,P2,P3) mit den respektiven R_f -Werten 0.62, 0.42 und 0.21 detektiert werden. Dipterocarpol wird *in vitro* demnach weniger selektiv umgesetzt als Betulin. Kein Reaktionsprodukt war in der Negativkontrolle ohne P450 nachzuweisen, weshalb auch bei der Dipterocarpolumsetzung davon ausgegangen werden kann, dass die Reaktion spezifisch durch CYP106A2 katalysiert wird.

5.1.4 *In vitro* Umsetzungen mit strukturverwandten Substraten

Nicht alle Substrate von CYP106A2 sind in der Lage, das Enzym in den HS-Zustand zu überführen. Daher wurde neben dem Screening der Naturstoffbibliothek auch eine rationale Substratsuche durchgeführt. Dazu wurden den Screening-Hits strukturell ähnliche, bioaktive Substanzen ausgewählt und ihre Umsetzung mit CYP106A2 direkt *in vitro* getestet. Die Reaktionen wurden, je nach Natur der Substrate, mittels DC, HPLC bzw. LC-MS analysiert. Ausgewählt wurden Sub-

stanzen, deren Kernstruktur mit der bisher bekannter CYP106A2-Substrate übereinstimmt. Sie variieren in den Strukturbereichen, die anscheinend wenig bis keinen Einfluss auf die Hydroxylierungsaktivität nehmen, wie die Substituenten am D-Ring und zusätzliche Ringe (E, F). Ein Teil der Substrate wurde freundlicherweise von Prof. Denis Pompon zur Verfügung gestellt. Die LC-MS-Messungen wurden am CNRS in Paris in der Arbeitsgruppe von Denis Pompon unter Leitung von Dr. Philippe Urban durchgeführt.

Ausgewählt wurden bioaktive Substanzen mit pharmazeutischem Potential, darunter Gitoxigenin und Digitoxigenin, die Sapogenine herzwirksamer Glykoside aus Digitalis sowie die strukturell verwandten, ebenfalls herzwirksamen Krötengifte Bufalin und Cinobufagin, die schwach giftigen steroidal Alkaloide der Nachtschattengewächse (z. B. Tomate und Kartoffel) Solanidin und Solasodin, das pentacyclische Triterpene Friedelin sowie der sekundäre Pflanzenfarbstoff Quercetin, ein Antioxidanz, welches in vielen Obst- und Gemüsesorten, vor allem in Äpfeln, zu finden ist. Von den letzteren konnte keines mit CYP106A2 in ein neues Produkt überführt werden.

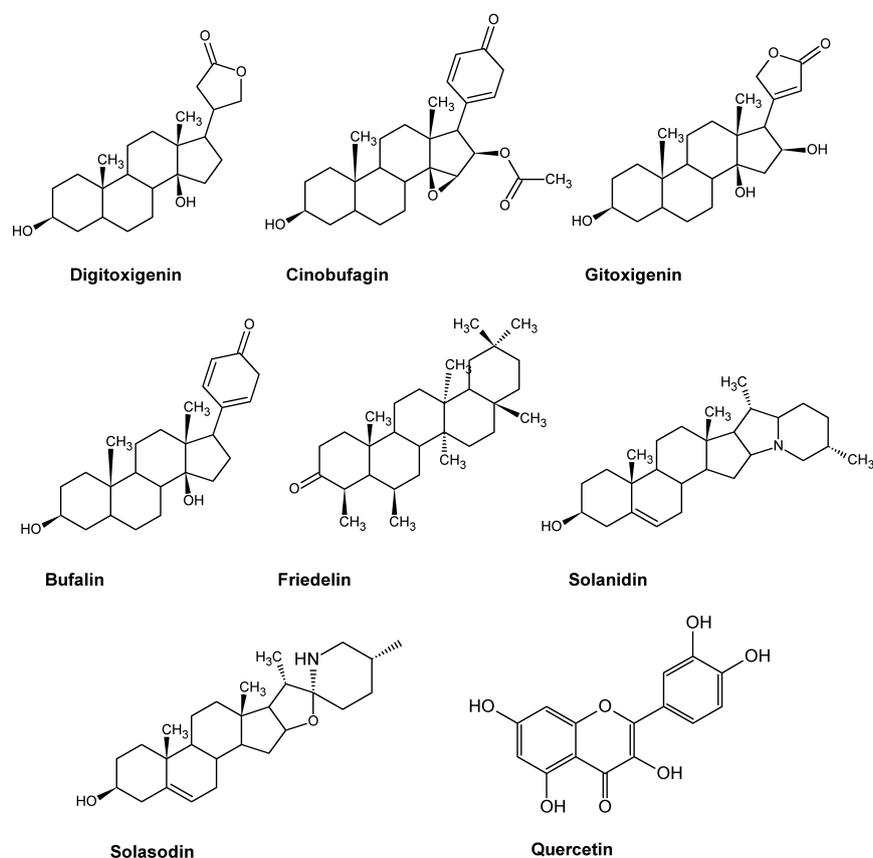


Abbildung 5.15: Substanzen, die auf Hydroxylierungsaktivität mit CYP106A2 *in vitro* getestet wurden. Ausgesucht nach ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu bereits bekannten Substraten des Enzyms.

Von den Sapogeninen der herzwirksamen Glykoside reagierte nur Digitoxigenin mit CYP106A2. Gitoxigenin, Bufalin und Cinobufagin wurden im *in vitro* rekonstituierten System nicht umgesetzt. Digitoxigenin reagiert mit CYP106A2 relativ unselektiv zu vier Produkten. Die jeweiligen Produkte eluierten bei isokratischer Trennung mit einem Laufmittelgemisch bestehend aus ACN/Wasser 40/60 deutlich schneller als das Substrat (T_R $5,02 \pm 0,05$ min), deshalb und weil für CYP106A2 bisher nur Hydroxylierungsreaktionen beschrieben sind, ist es wahrscheinlich, dass diese Produkte einfach- bzw. mehrfachhydroxylierte Spezies von Digitoxigenin darstellen. Nach 15-minütiger Reaktion von $100 \mu\text{M}$ Digitoxigenin mit $0,05 \mu\text{M}$ CYP106A2 bei 30°C wurden ca. 74 % des Substrates in 33 % P4 (T_R 3,42), 16 % P2 (T_R 1,53 min), 10 % P3 (T_R 1,86 min) und 4 % P1 (T_R 1,32 min) umgesetzt.

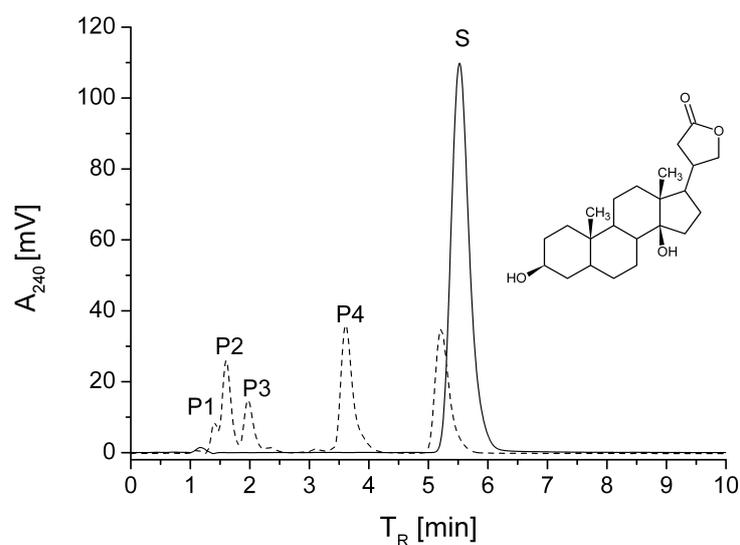


Abbildung 5.16: HPLC-Chromatogramm der *in vitro* Umsetzung von Digitoxigenin: Das rekonstituierte Enzymsystem bestand aus $0,25 \mu\text{M}$ CYP106A2, $1 \mu\text{M}$ AdR und $5 \mu\text{M}$ Adx sowie einem NADPH-Regenerationssystem. Die Reaktion erfolgte bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ für 15 min in $500 \mu\text{l}$ HEPES pH 7,4. Der Reaktionsansatz wurde zweimal mit je $500 \mu\text{l}$ Ethylacetat extrahiert und mittels HPLC analysiert. Die Trennung erfolgte isokratisch mit ACN/H₂O 40/60 als mobiler Phase, die Detektion bei 240 nm.

Die meisten Substrate von CYP106A2 besitzen einen steroidalen Grundkörper. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hydroxylierung von steroidal Substraten ohne 3-oxo- Δ^4 -Motif, nämlich Dipterocarpol und DHEA, erstmalig gezeigt. Zudem konnte in einer parallel laufenden Arbeit von Frau Dr. Bleif gezeigt werden, dass auch pentacyclische Triterpensäuren ohne ein solches Motif mit CYP106A2 zu hydroxylierten Produkten reagieren. Daher wurden im rationalen Screening erneut einige Steroide, darunter auch Nicht-3-oxo- Δ^4 -Steroide untersucht. Ausgewählt wurden Prednison (eine Vorstufe des aktiven Prednisolons) und Dexamethason, die als Medikamente eingesetzt werden und entzündungshemmende und immunsuppressive Wirkung zeigen sowie die körpereigenen Steroide 19-Hydroxyandrostendion, DHEA, Pregnenolon, Cis- und Transandrosteron, Estron und Estadiol. Da sowohl Dipterocarpol als auch Cholestenon von CYP106A2 umgesetzt werden, die beide über eine hydrophobe Seitenkette am C-17 verfügen, wurden auch die strukturell ähnlichen Steroide Cholesterol, Stigmasterol und Sitosterol getestet.

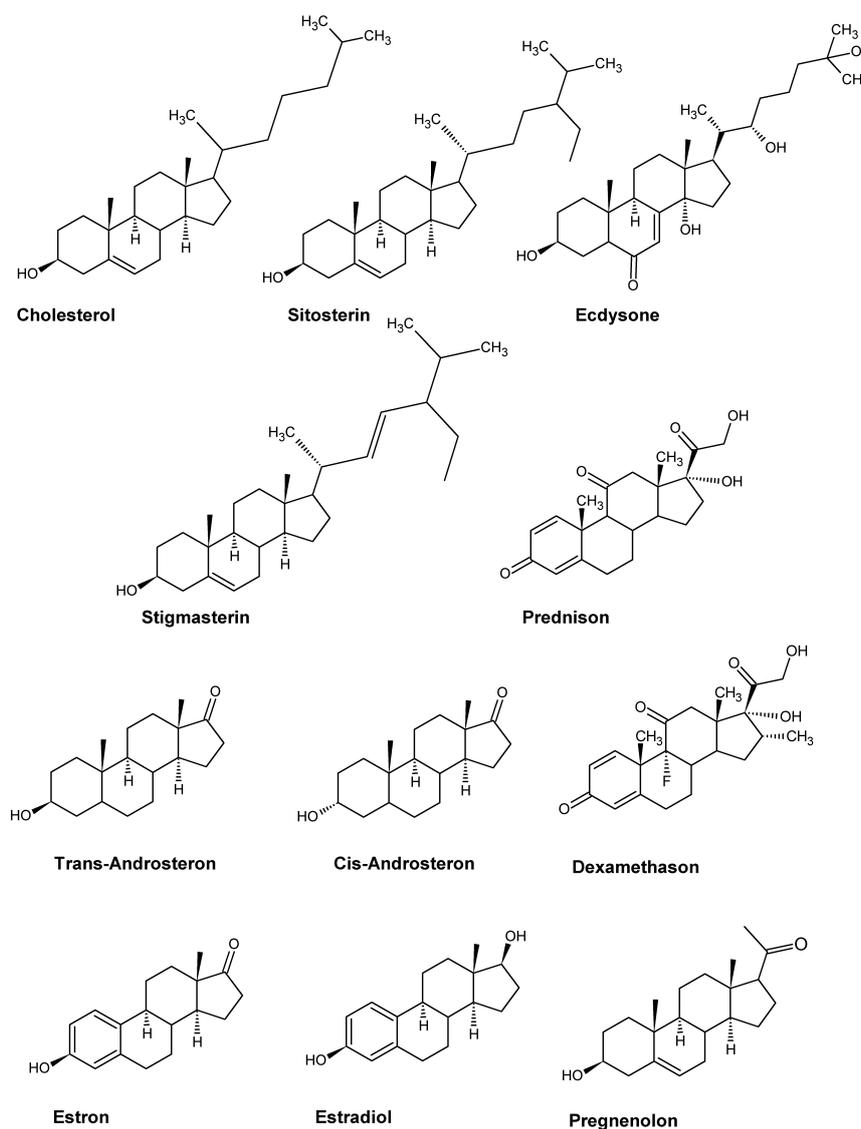


Abbildung 5.17: Steroide und Sterole, die auf Hydroxylierungsaktivität mit CYP106A2 *in vitro* getestet wurden. Ausgesucht nach ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu bereits bekannten Substraten des Enzyms.

Die Analyse der Reaktionen ergab, dass neben dem im NADPH-Verbrauchstest gefundenen DHEA auch Pregnenolon eindeutig als Substrat für CYP106A2 fungiert. Da die Steroide ohne Keto-En-Struktur kein Absorptionsmaximum bei 240 nm besitzen, können sie in der HPLC nur bei 210 nm sichtbar gemacht werden. Bei 210 nm absorbieren aber auch die verwendeten Lösemittel, daher wurden die Reaktionsgemische vor der HPLC-Analyse mit Cholesteroxidase versetzt, um die Hydroxylgruppe an C3 zur Ketogruppe zu oxidieren. Die Cholesteroxidase

se katalysiert ebenfalls die Umlagerung der Doppelbindung von Δ^5 zu Δ^4 , dadurch entsteht eine mesomeriestabilisierte Keto-En-Struktur, die die Detektion von DHEA bzw. Pregnenolon bei 240 nm ermöglicht. Unter den hier gewählten HPLC-Bedingungen (5 min Analysezeit) konnten für DHEA und Pregnenolon jeweils nur ein Produkt ($T_R = 1,3$ min (jeweils)) detektiert werden. Die Verwendung besserer Trennmethode, bzw. die Analyse der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie (s.u.) zeigte, dass in beiden Fällen zwei Reaktionsprodukte gebildet werden, wobei das Hauptprodukt jeweils an Position 7β hydroxyliert ist. Allerdings ergab die HPLC-Analyse der DHEA Reaktion mit CYP106A2, dass entgegen der Erwartung die Produktzunahme nicht proportional zur Substratabnahme verlief (s. Abb. 5.18). Es ist wahrscheinlich, dass die hydroxylierten Produkte weniger gute Substrate für die Cholesteroxidase darstellen, als DHEA und auch Pregnenolon selbst. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die Einführung der Hydroxygruppe in Position 7β eine Umlagerung der Doppelbindung von Δ^5 zu Δ^4 verhindert, so dass kein delokalisiertes π -Elektronensystem entsteht und die Absorption der Produkte bei 240 nm geringer ist als die des Substrats. Aus diesen Gründen wurde sowohl für die DHEA-, als auch für die Pregnenolon-Reaktion an dieser Stelle auf eine Quantifizierung der Produktbildung verzichtet. Die Umstellung von HPLC-grade zu gradient-grade-Lösemittel konnte die HPLC-Analyse der DHEA-Umsetzung bei 210 nm gemacht werden (s.u.). Die Pregnenolonprodukte ließen sich allerdings nicht detektieren, so dass die Analysen der Pregnenolonumsätze nachfolend ausschließlich mittels DC erfolgten.

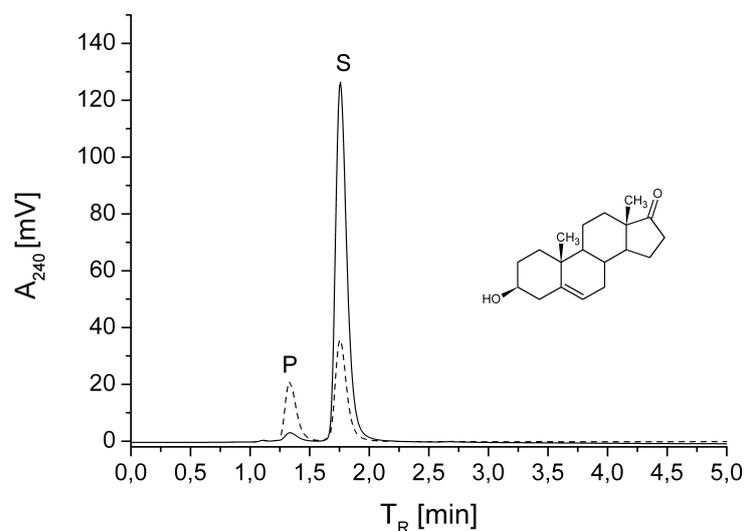


Abbildung 5.18: HPLC-Chromatogramm der *in vitro* Umsetzung von DHEA: Das rekonstituierte Enzymsystem bestand aus 0,25 μM CYP106A2, 1 μM AdR und 5 μM Adx sowie einem NADPH-Regenerationssystem. Die Reaktion erfolgte bei 30 °C für 15 min in 500 μl HEPES pH 7,4. Der Reaktionsansatz wurde zweimal mit je 500 μl Ethylacetat extrahiert und mittels HPLC analysiert. Die Trennung erfolgte isokratisch mit ACN/H₂O 40/60 als mobiler Phase, die Detektion bei 240 nm.

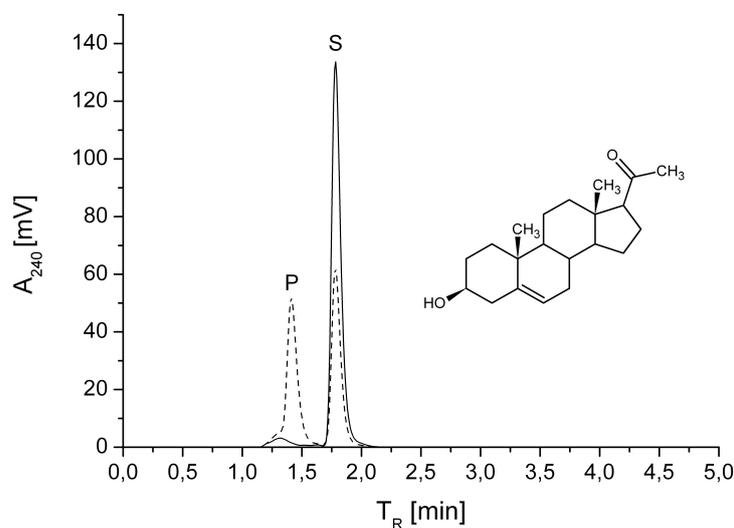


Abbildung 5.19: HPLC-Chromatogramm der *in vitro* Umsetzung von Pregnenolon: Das rekonstituierte Enzymsystem bestand aus 0,25 μM CYP106A2, 1 μM AdR und 5 μM Adx sowie einem NADPH-Regenerationssystem. Die Reaktion erfolgte bei 30 °C für 15 min in 500 μl HEPES pH 7,4. Der Reaktionsansatz wurde zweimal mit je 500 μl Ethylacetat extrahiert und mittels HPLC analysiert. Die Trennung erfolgte isokratisch mit ACN/H₂O 40/60 als mobiler Phase, die Detektion bei 240 nm.

Die beiden Steroidmedikamente Dexamethason und Prednison wurden durch CYP106A2 *in*

vitro in je ein hydroxyliertes Produkt überführt. Dexamethason (T_R 2,92 min) reagierte zu ca. 47 % zu einem Reaktionsprodukt (T_R 1,30 \pm min). Prednison (T_R 2,358 min) wurde fast vollständig (ca. 95 %) in ein Hauptprodukt (T_R 1,30 min) überführt. Dexamethason ist ein künstliches Derivat von Prednison und unterscheidet sich von diesem dadurch, dass es als zusätzliche Substituenten ein α -ständiges Fluor an Position 9 und eine ebenfalls α -ständige Methylgruppe an Position 16 besitzt. Leider konnten die aus der Reaktion mit CYP106A2 hervorgehenden Produkte nicht in ausreichender Menge für eine NMR gewonnen werden. Anhand der MS-Messungen im CNRS konnte gezeigt werden, dass der Massenunterschied nach erfolgter Enzymreaktion zwischen Prednison (m/z 393,16) zum Produkt (m/z 409,16) genau 16 beträgt. Dies entspricht der Addition einer Hydroxygruppe unter Abspaltung eines Protons. Da die Messungen unter positiver Ionisierung (Anlagerung eines Protons) gemacht wurden, tragen die Analyten alle eine zusätzliche Masseneinheit von +1. Zudem wurden für das Substrat und das Produkt Massen detektiert (m/z 373,20, m/z 355,19 bzw. m/z 389,20, m/z 371,19), welche rechnerisch denen des Substrats bzw. hydroxylierten Produktes nach ein- bzw. zweimaliger Wasserabspaltung entsprechen (s. Anhang).

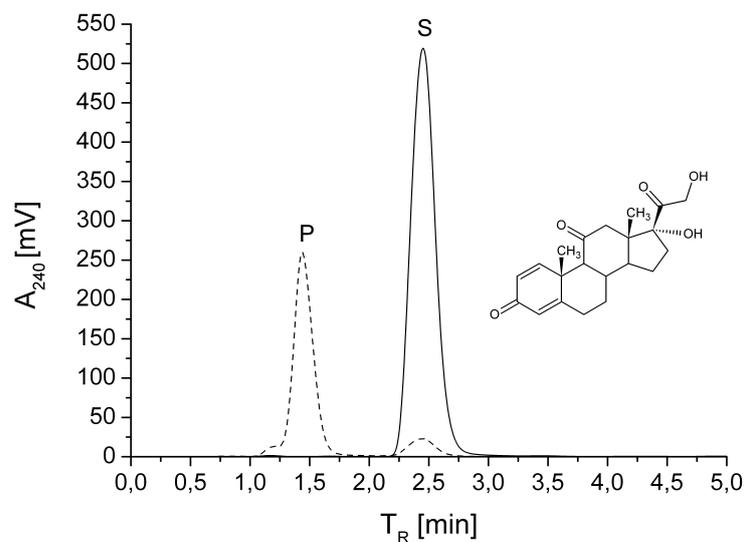


Abbildung 5.20: HPLC-Chromatogramm der *in vitro* Umsetzung von Prednison: Das rekonstituierte Enzymsystem bestand aus $0,25 \mu\text{M}$ CYP106A2, $1 \mu\text{M}$ AdR und $5 \mu\text{M}$ Adx sowie einem NADPH-Regenerationssystem. Die Reaktion erfolgte bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ für 15 min in $500 \mu\text{l}$ HEPES pH 7,4. Der Reaktionsansatz wurde zweimal mit je $500 \mu\text{l}$ Ethylacetat extrahiert und mittels HPLC analysiert. Die Trennung erfolgte isokratisch mit ACN/ H_2O 40/60 als mobiler Phase, die Detektion bei 240 nm.

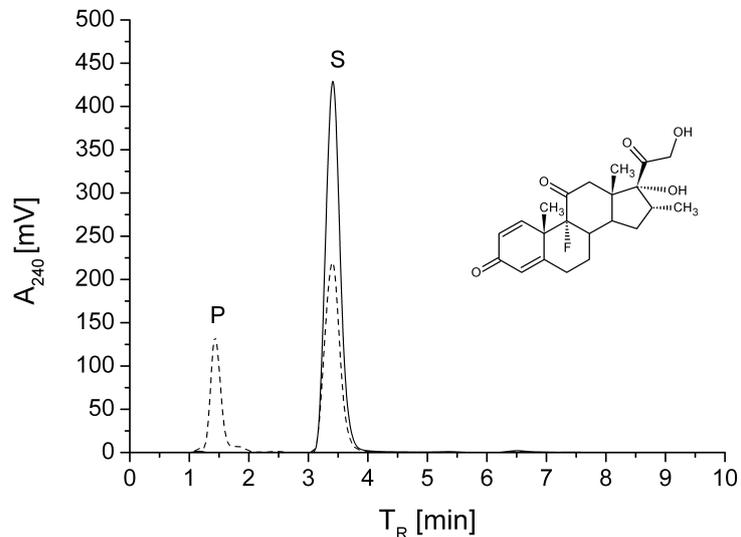


Abbildung 5.21: HPLC-Chromatogramm der *in vitro* Umsetzung von Dexamethason: Das rekonstituierte Enzymsystem bestand aus $0,25 \mu\text{M}$ CYP106A2, $1 \mu\text{M}$ AdR und $5 \mu\text{M}$ Adx sowie einem NADPH-Regenerationssystem. Die Reaktion erfolgte bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ für 15 min in $500 \mu\text{l}$ HEPES pH 7,4. Der Reaktionsansatz wurde zweimal mit je $500 \mu\text{l}$ Ethylacetat extrahiert und mittels HPLC analysiert. Die Trennung erfolgte isokratisch mit ACN/ H_2O 40/60 als mobiler Phase, die Detektion bei 240 nm.

5.2 Identifikation der Reaktionsprodukte mittels Ganzzellbiokatalyse

Mit Hilfe der HPLC, TLC bzw. LC-MS konnte gezeigt werden, dass die neu identifizierten CYP106A2-Substrate zu potentiell hydroxylierten Produkten überführt werden. In Ermangelung von HPLC-Standards ist es allerdings nicht möglich, anhand dieser Daten die Position der Hydroxylierung zu bestimmen. Um die Struktur der Reaktionsprodukte zu lösen, sollte daher die Methode der NMR-Spektroskopie angewandt werden, für die allerdings, je nach Reinheit, verhältnismäßig große Mengen Produkt (ca. 2 - 10 mg) vorliegen müssen. *In vitro* Rekonstitutionsassays eignen sich nur bedingt zur Herstellung solcher Mengen, da aufwendig gereinigtes Enzym und vor allem stöchiometrische Mengen des teuren Elektronendonors NADPH zur Verfügung gestellt werden müssen. Diese Limitierungen können durch *in vivo* Biokonversionen umgangen werden. Zur Herstellung der Reaktionsprodukte im präparativen Maßstab wurde der *Bacillus megaterium* Stamm ATCC13368 verwendet, welcher endogen für CYP106A2 codiert und das Enzym in der stationären Phase exprimiert. Ein *cyp106a2* ko-Stamm, der das Enzym nicht mehr bildet, da statt seiner ein Tetracyclinresistenzgen in das Genom integriert wurde, diente als Kontrolle.

Die *B. megaterium* Zellen wurden in einem komplexen Vollmedium bestehend aus Hefeextrakt, Soyton und Glycerin kultiviert, welches mit einem Kaliumphosphatpuffer auf einen pH von 7,4 eingestellt wurde. Dieses Medium wurde in der Vergangenheit bereits erfolgreich bei der Herstellung hydroxylierter Terpenoide verwendet [75]. Es unterscheidet sich von dem von Berg et. al. in den 1970er und 80er Jahren verwendeten Medium in seiner Zusammensetzung, in der hier vorliegenden Arbeit wurden 25 g statt 40 g Hefeextrakt, 12,5 g statt 16 g Sojabohnenextrakt und pH 7,4 statt pH 7,2 verwendet. In zellfreien Lysaten von *B. megaterium* konnte in dieser Arbeit nach Kultivierung in Schikanekolben ein P450-Gehalt von 135 nmol nach 24-stündiger Bebrütung gemessen werden. Im Δ -*cyp106a2*-Stamm konnte erwartungsgemäß kein Cytochrom P450 nachgewiesen werden [63]. Verglichen mit den von Berg et al. publizierten Expressionsraten von ca. 40 nmol/l Kultur, ist der P450-Gehalt nach Kultivierung in Schikanekolben ca. dreimal so hoch. Bleif konnte, ebenfalls durch Verwendung von Schikanekolben, ein

Expressionslevel im *B. megaterium* Expressionsstamm MS941_CAA für CYP106A2 von 264 nmol/l Kultur nachweisen. Weitere Kultivierungsbedingungen, wie die Verwendung zusätzlicher Kohlenstoffquellen zur Steigerung der Expression wurden von Maximilian Erhardt im Rahmen einer, von mir betreuten, Bachelorarbeit bearbeitet. Er konnte mit dem von Bleif entwickelten Expressionssystem bis zu 1000 nmol CYP106A2 pro Liter Expressionskultur nachweisen.

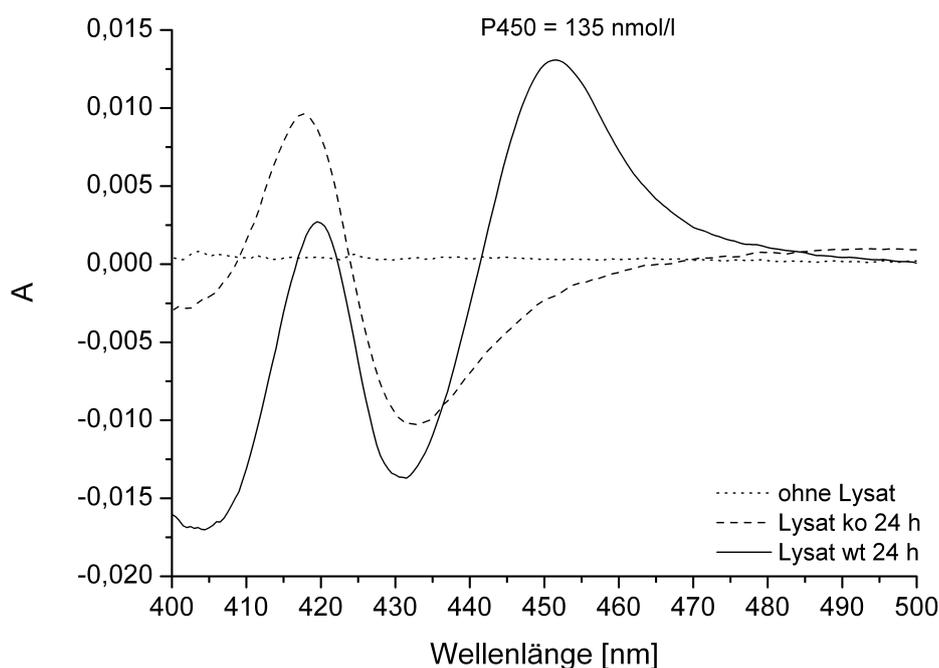


Abbildung 5.22: CO-Differenzspektroskopie von *B. megaterium* ATCC13368 (kompakte Linie) und dem respektiven ko-Stamm (gestrichelte Linie) Lysaten nach 24 h Kultivierung bei 30 °C in soytongehaltigem Komplexmedium.

5.2.1 Steroidderivate: Prednison, Dexamethason, Digitoxigenin

Die *B. megaterium* Zellen setzten das Substrat Digitoxigenin sehr unselektiv zu mindestens fünf Reaktionsprodukten um (R_T P1 = 1,21 min, P2 = 1,317, P3 = 1,857, P4 = 2,350, P5 = 3,267). Die potentiellen CYP106A2 Reaktionsprodukte eluieren sehr früh von der Säule und es wurde unter den gewählten Bedingungen keine Basislinientrennung erreicht (s. Abb.5.23). Zur besseren Trennung der Mediumbestandteile von den Umsatzprodukten wurde im Gegensatz zu den *in vitro* Reaktionen ein polareres Laufmittelgemisch (ACN/H₂O 30/70) eingesetzt. Das vermeint-

liche Hauptprodukt der Reaktion eluiert dennoch zusammen mit dem Injektionspeak, und ist nur sehr schwer von den stammeigenen Nebenprodukten zu unterscheiden, die hervorgehen aus der Verstoffwechslung des Mediums durch *B. megaterium*. Darüberhinaus wurde das vermeintliche zweite Hauptprodukt der Reaktion von CYP106A2 mit Digitoxigenin ebenfalls nach Inkubation mit dem ko-Stamm detektiert (s. Abb. 5.23). Das hydrophilere Hauptprodukt könnte eine durch CYP106A2 hydroxylierte Spezies dieses Zwischenproduktes darstellen. Der Wechsel der stationären Phase, etwa zu einem Material mit geänderter Hydrophobizität oder sterisch anspruchsvollen Substituenten, können eine Verbesserung der Trennleistung mit sich bringen, die es ermöglichen würde, die beobachteten Reaktionsprodukte voneinander zu trennen.

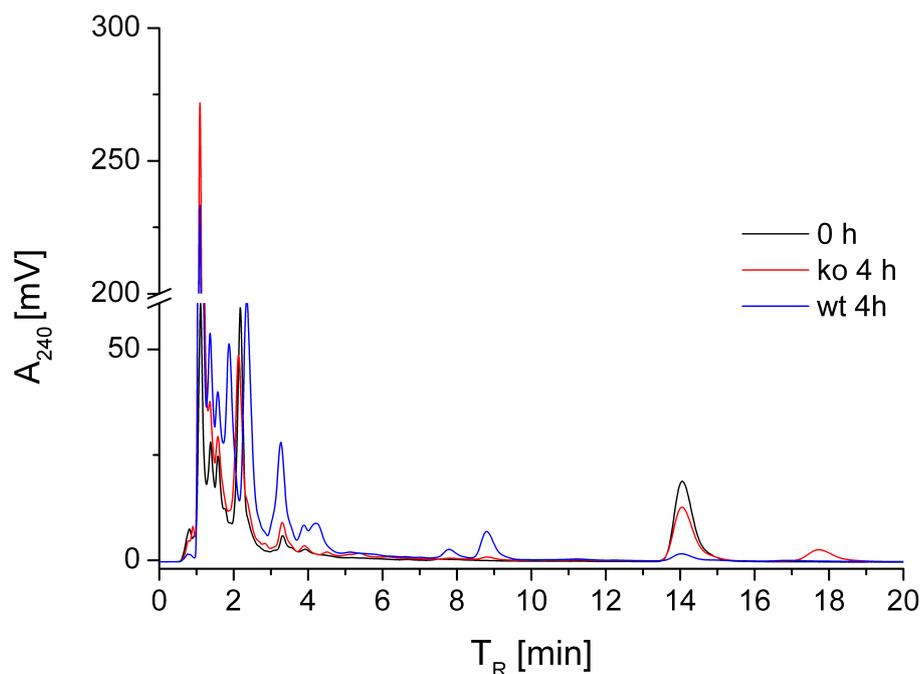


Abbildung 5.23: HPLC-Chromatogramm der *in vivo* Umsetzung von Digitoxigenin mit *B. megaterium* ATCC13368. 100 μM Substrat wurden mit 50 ml einer frischen 16 h Kultur *B. megaterium* bei 30 °C inkubiert. Die Kulturen wurden zu 500 μl beprobt, die Reaktion durch Zugabe von 500 μl Ethylacetat gestoppt und extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase wurde das Residuum in ACN/H₂O (30/70) gelöst und in die HPLC eingesetzt. Die Detektion der Analyten erfolgte bei 240 nm. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus ACN/H₂O (30/70), die Trennung wurde auf einer MN5 α -RPC18 Säule durchgeführt.

Das Steroidderivat Prednison wird ebenfalls sowohl von den wt als auch den CYP106A2 de-

fizienten *Bacillus* Zellen verstoffwechselt. Bei der Interaktion mit dem ko-Stamm entstehen aus Prednison (T_R 4,34 min) drei Reaktionsprodukte (T_R P1 = 1,12 min P2 = 1,93 min und P3 = 4,53 min) (s. Abb. 5.24). Interessanterweise eluiert P3 bei isokratischer Trennung später als Prednison von der Säule, was darauf hindeutet, dass es sich um ein weniger hydrophiles Produkt handeln könnte. Eine Hydroxylierungsreaktion ist daher auszuschließen. Höchstwahrscheinlich ist es ein Nebenprodukt aus einer Reaktion mit anderen *B. megaterium*-eigenen Enzymen. Ähnlich wie es bereits für die Betulinsäure beschrieben ist, könnte eine zelleigene Dehydrogenase eine der Hydroxygruppen des Enzyms zu einer Ketogruppe oxidiert haben [89]. Möglicherweise führt aber auch die Einführung einer zusätzlichen Hydroxygruppe zu einer Eliminierung von Wasser unter Bildung einer Doppelbindung. Ein solches Produkt würde auf der HPLC ebenfalls länger zurückgehalten. Nach vier Stunden konnten fast 90 % des Prednisons vom ko-Stamm verstoffwechselt werden. Der wt-Stamm bildete ebenfalls Reaktionsprodukte von Prednison (T_R P1 = 1,08 min, P2 = 1,83 min), wobei das vom ko-Stamm gebildete Reaktionsprodukt nicht detektiert wurde.

Da weder für Digitoxigenin oder Prednison noch Betulin Reaktionsprodukte identifiziert werden konnten, die sich zweifelsfrei auf die Reaktion des Substrates mit CYP106A2 zurückführen lassen, wurde auf eine Weiterbearbeitung dieser Substanzen im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

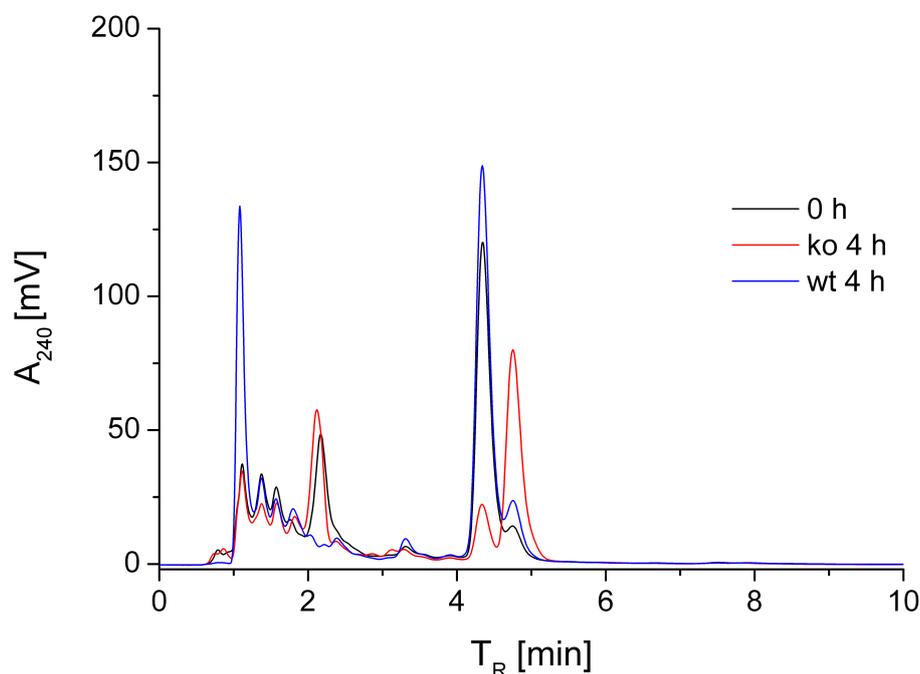


Abbildung 5.24: HPLC-Chromatogramm der *in vivo* Umsetzung von Prednison mit *B. megaterium* AT-CC13368. 100 μ M Substrat wurden mit 50 ml einer frischen 16 h Kultur *B. megaterium* bei 30 °C inkubiert. Die Kulturen wurden zu 500 μ l beprobt, die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l Ethylacetat gestoppt und extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase wurde das Residuum in ACN/H₂O (30/70) gelöst und in die HPLC eingesetzt. Die Detektion der Analyten erfolgte bei 240 nm. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus ACN/H₂O (30/70), die Trennung wurde auf einer MN5 α -RPC18 Säule durchgeführt.

Dexamethason (T_R 7,61) wurde weder vom wt- noch vom ko-Stamm in nennenswertem Maße umgesetzt (s. Abb. 5.25). Nach vier Stunden Inkubation sind noch 90 % des Substrates vorhanden. Die Differenz in der Menge des Substrates von 10 % ist darauf zurückzuführen, dass Dexamethason in die Zellen eindringen kann und sich dadurch die Extraktionseffizienz verringert, so dass weniger Substrat rückgewonnen werden konnte. Allerdings wurde die Extraktionseffizienz von Dexamethason aus *B. megaterium* nicht näher bestimmt. Aber es konnten keine spezifischen Reaktionsprodukte identifiziert werden, was die Vermutung, dass die Abnahme nicht durch eine Reaktion begründet ist, bestätigt. Lediglich die *B. megaterium* eigenen Stoffwechselprodukte konnten detektiert werden.

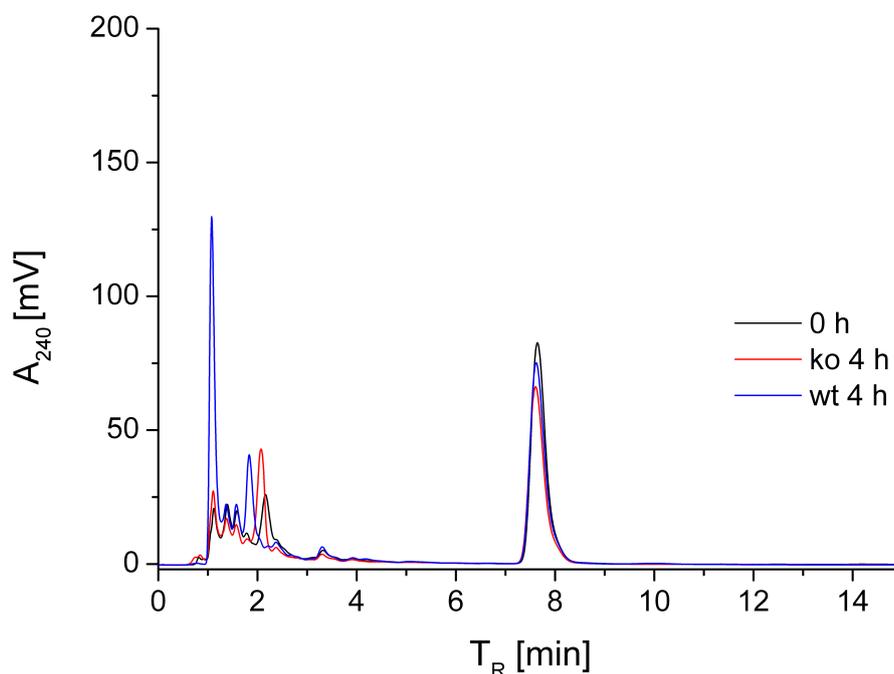


Abbildung 5.25: HPLC-Chromatogramm der *in vivo* Umsetzung von Dexamethason mit *B. megaterium* ATCC13368. 100 μ M Substrat wurden mit 50 ml einer frischen 16 h Kultur *B. megaterium* bei 30 °C inkubiert. Die Kulturen wurden zu 500 μ l beprobt, die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l Ethylacetat gestoppt und extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase wurde das Residuum in ACN/H₂O (30/70) gelöst und in die HPLC eingesetzt. Die Detektion der Analyten erfolgte bei 240 nm. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus ACN/H₂O (30/70), die Trennung wurde auf einer MN5 α -RPC18 Säule durchgeführt.

5.2.2 Dipterocarpol

Dipterocarpol konnte vom *B. megaterium* erfolgreich in zwei Hauptprodukte (R_f 0,6; 0,214) und vier Nebenprodukte (R_f 0,4; 0,38; 0,142 and 0,00285) umgewandelt werden, dagegen reagierte es nicht mit dem CYP106A2 defizienten ko-Stamm (s. Abb. 5.26). Die R_f -Werte der vom wt gebildeten Hauptprodukte stimmen mit denen der *in vitro* Reaktion überein. Das zudem keine Produktbildung nach Interaktion mit dem ko-Stamm stattfand, beweist, dass die gebildeten Produkte aus der Reaktion von Dipterocarpol mit CYP106A2 hervorgehen.

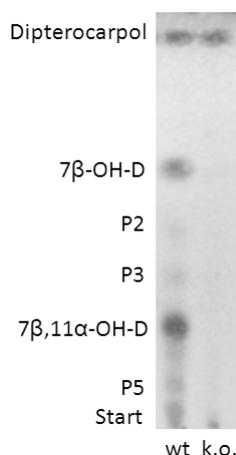


Abbildung 5.26: DC-Chromatogramm der *in vivo* Umsetzung von Dipterocarpol mit *B. megaterium* AT-CC13368. 100 μM Substrat wurden mit 50 ml einer frischen 16 h Kultur *B. megaterium* bei 30 °C inkubiert. Die Kulturen wurden zu 500 μl beprobt, die Reaktion durch Zugabe von 500 μl Ethylacetat gestoppt und extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase wurde das Residuum in Ethylacetat gelöst und auf TLC-Platten aufgetragen. Die Detektion der Analyten erfolgte durch Färbung der entwickelten Platte mit einem Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz-Tauchbad. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus Hexan/Ethylacetat (50/50), die Trennung wurde auf einer Kieselgel-60 DC-Platte durchgeführt.

Um ausreichende Mengen für eine NMR zu erhalten, wurde der Ganzzellumsatz in größerem Maßstab durchgeführt. Dazu wurden vier 2 l Erlenmeyer-Schikanekolben mit je 250 ml Komplexmedium befüllt und der Ganzzellumsatz somit in insgesamt 1 l Komplexmedium bei 30 °C für 24 h durchgeführt. Die Rückgewinnung des Substrates bzw. der Produkte erfolgte durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat. Nach Reinigung des gewonnenen Extraktes über eine Kieselgel-60 Säule konnten aus 150 mg Dipterocarpol 10 mg des ersten Reaktionsproduktes und 2 mg des zweiten Reaktionsproduktes erhalten werden. Zur Bestimmung der exakten Hydroxylierungsposition wurden mit den gereinigten Produkten NMR-Analysen durchgeführt. Alle in dieser Arbeit gezeigten NMR-Messungen und Analysen der Daten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Zapp (Pharmazeutische Biologie) durchgeführt. Das erste Hauptprodukt aus der Reaktion von Dipterocarpol mit CYP106A2 ($R_f = 0,6$) konnte mittels NMR als 7 β -Hydroxydipterocarpol identifiziert werden (s. Abb. 7.2 im Anhang). Das zweite Hauptprodukt der Reaktion konnte als zweifach hydroxylierte Spezies von Dipterocarpol identifiziert werden.

Die NMR-Daten zeigten dabei erneut Signale einer β -ständigen Hydroxygruppe an C-7 (δ_{H} 3,79 und δ_{C} 74,25). Die zweite zusätzliche Hydroxygruppe konnte am C-11 (δ_{C} 70,69) lokalisiert werden. Die aus den NMR-Daten erhaltenen Strukturen lassen den Schluss zu, dass Dipterocarpol zunächst zu 7β -Hydroxydipterocarpol umgesetzt wird, welches dann weiter zum zweifachhydroxylierten $7\beta,11\alpha$ -Dihydroxydipterocarpol reagiert (s. Abb. 5.27).

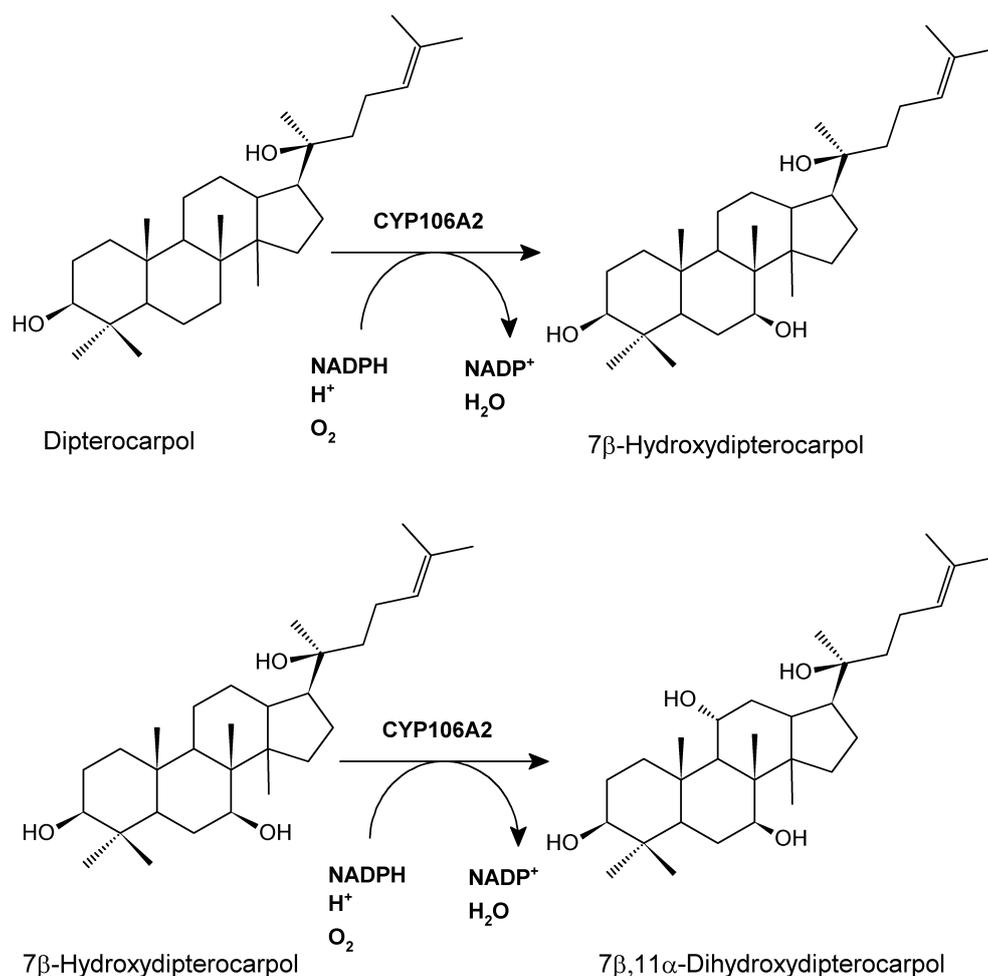


Abbildung 5.27: Schema der Reaktion von Dipterocarpol zu 7β -Hydroxydipterocarpol (7-OH-D) und von 7β -Hydroxydipterocarpol zu $7\beta,11\alpha$ -Dihydroxydipterocarpol.

Es drängt sich die Frage auf, ob die Bildung von $7\beta,11\alpha$ -Dihydroxydipterocarpol erst nach Abdissoziation des 7β -Hydroxydipterocarpol und erneuter Anlagerung erfolgt oder ob das Substrat im aktiven Zentrum gedreht wird, so dass nacheinander beide Positionen über dem Häm

platziert werden. Ein monohydroxyliertes 11α -Hydroxydipterocarpol konnte in dieser Arbeit nicht isoliert werden, aber es wurden Produkte detektiert, die zwischen dem einfach- und zweifachhydroxylierten Produkten eluierten. Um der Antwort auf diese Frage einen Schritt näher zu kommen, wurden mit beiden Produkten Differenzspektren mit CYP106A2 aufgezeichnet, um eine Bindung im aktiven Zentrum erstens nachzuweisen und zweitens über die etwaigen Bindungskonstanten Auskunft über die Affinität zum Enzym zu erhalten. Die Spektren wurden mit $10\ \mu\text{M}$ CYP106A2 in $50\ \text{mM}$ Kaliumphosphatpuffer aufgenommen. Das erste Reaktionsprodukt, 7β -OH-D, induziert im CYP106A2 keinen Spin-Shift. Im Spektrum ist lediglich die Abnahme der Soret-Bande bei $417\ \text{nm}$ zu beobachten, die sich durch die Verdünnung der Probe durch die Substratzugabe erklären lässt. Anders sieht es dagegen in Anwesenheit von $7\beta,11\alpha$ -D aus. Das zweifachhydroxylierte Produkt induziert bei Zugabe von $7,5$ bzw. $20\ \mu\text{M}$ einen HS-Shift. Bei weiterer Zugabe von $7\beta,11\alpha$ -D zeigt sich allerdings auch eine Steigerung der Absorption bei $420\ \text{nm}$, es ergibt sich demnach kein Typ I-Spektrum, sondern ein Mischspektrum aus Typ I und Typ II. Weil sich aus dem Mischspektrum nicht ohne Weiteres auf die Affinität schließen lässt, wurde auf eine weitere Titration verzichtet.

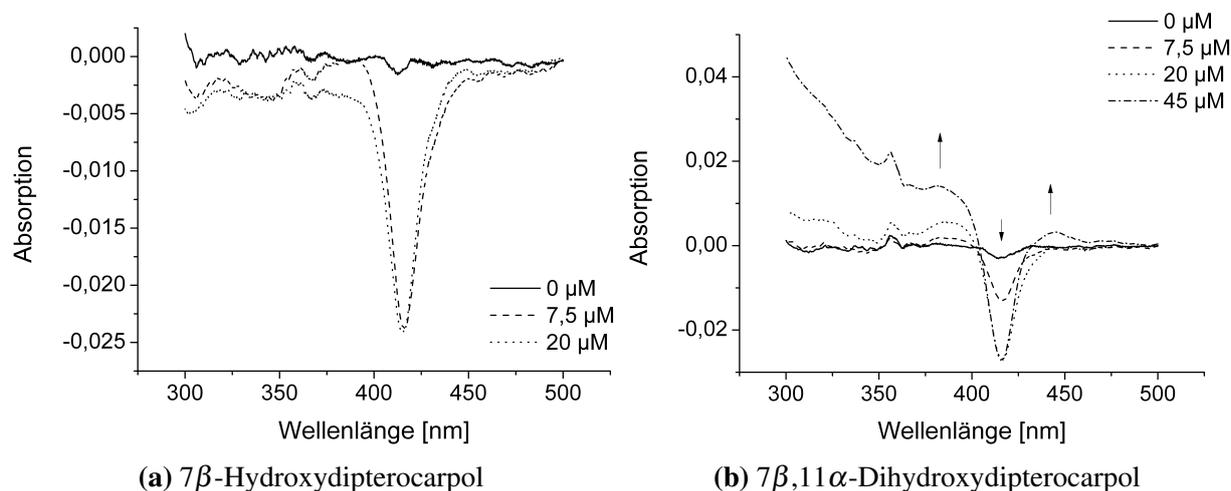


Abbildung 5.28: Differenzspektren von CYP106A2 nach Zugabe von 0, 7,5 und $20\ \mu\text{M}$ 7β -Hydroxydipterocarpol (gelöst in DMSO). Die Spektren wurden von 300 - 500 nm bei Raumtemperatur mit $10\ \mu\text{M}$ Enzym in $50\ \text{mM}$ KPP aufgenommen.

Da mittels Differenzspektroskopie keine Aussage über das Bindeverhalten von 7β -Hydroxydipterocarpol gemacht werden konnte, daher wurden die Dipterocarpolprodukte sowohl im *in vitro* rekonstituierten System als auch *in vivo* auf Reaktion mit CYP106A2 getestet. Das monohydroxylierte 7β -Produkt wurde nach 30 min bei 30 °C (100 μ M Substrat mit 0,5 μ M CYP106A2) zu ca. 50 % zu $7\beta,11\alpha$ -D umgesetzt, welches selbst anscheinend kein Substrat des CYP106A2 darstellt. Es konnte kein Produkt aus dieser Reaktion festgestellt werden. Diese Umsetzungen wurden von Fr. Eva Luxemburger am Helmholtzinstitut für Infektionsforschung freundlicherweise auch mittels LC-MS analysiert und es konnten nach der *in vitro* Reaktion keine weiteren (drei oder mehrfach) hydroxylierten Reaktionsprodukte nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurde daher untersucht, ob die bei der *in vivo* Reaktion auftretenden Produkte aus der Reaktion mit anderen Enzymen des *B. megaterium* stammen.

Interessanterweise wurden beide Produkte vom wt *B. megaterium* Stamm zu weiteren polaren Produkten umgesetzt (s. Abb. 5.30), während nach Interaktion mit dem ko-Stamm zwar ebenfalls Nebenprodukte aus dem Stoffwechsel der Bakterien isoliert wurden, aber keine Produkte, die eindeutig auf eine Reaktion der Dipterocarpolprodukte mit den Bakterien zurückgeführt werden konnten. 7β -OH-D reagierte mit den ATCC13368-Zellen zu drei Produkten $R_f(\text{He/EE } 4/5)$ $P_1 = 0,43$ ($7\beta,11\alpha$ -OH-DIPT), $R_f(\text{He/EE } 4/5)$ $P_2 = 0,32$, $P_3 = 0,19$. $7\beta,11\alpha$ -OH-DIPT reagierte zu zwei Produkten $R_f(\text{He/EE } 4/5)$ $P_1 = 0,32$ und $P_2 = 0,174$. Es ist davon auszugehen, dass die detektierten Reaktionsprodukte Derivate von $7\beta,11\alpha$ -OH-D darstellen, da sie in den Umsätzen von 7β -OH-D und $7\beta,11\alpha$ -OH-D vorhanden sind. Es konnte nicht geklärt werden, warum diese Reaktionsprodukte nur nach Reaktion mit dem ATCC13368-Stamm erscheinen, nicht aber nach Reaktion mit dem CYP106A2-defizienten ko-Stamm, obwohl keine Reaktivität von CYP106A2 gegenüber den Produkten *in vitro* nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 5.29).

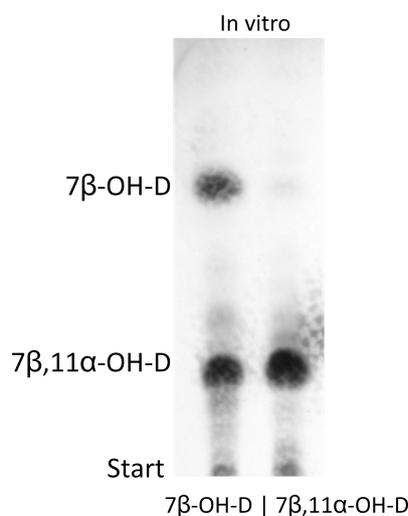


Abbildung 5.29: DC-Chromatogramm der Umsetzungen der Dipterocarpolprodukte *in vitro*. Als mobile Phase wurde ein Lösemittelgemisch von He/EE (je 50 % (v/v)) verwendet. 7β -Hydroxydipterocarpol reagierte mit dem *in vitro* rekonstituiertem CYP106A2 Enzymsystem (0,5 μ M CYP106A2, 10 μ M Adx, 5 μ M AdR, 50 mM HEPES pH 7,4, 30 °C, 30 min) zu $7\beta,11\alpha$ -Dihydroxydipterocarpol (linke Spalte), während das zweifachhydroxylierte Produkt *in vitro* nicht umgesetzt wurde (rechte Spalte).

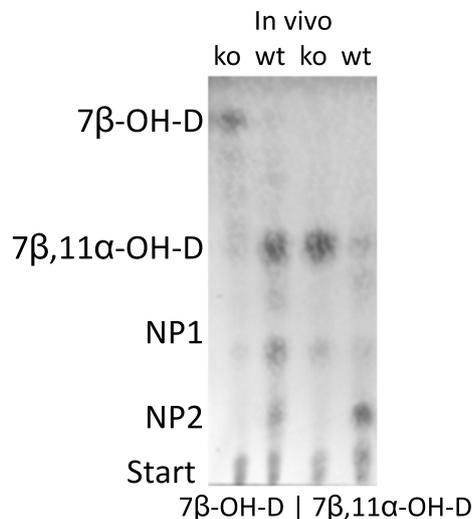


Abbildung 5.30: DC-Chromatogramm der Umsetzung der Dipterocarpolprodukte mit 1,5 ml einer frischen *B. megaterium* ATCC13368 16 h-Kultur. Je 200 μ M Produkt wurden für 60 min bei 30 °C und 1000 upm mit den Zellen inkubiert. Die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l Ethylacetat gestoppt und extrahiert. Als mobile Phase diente Lösemittelgemisch von He/EE 4/5 (v/v). *In vivo* reagierten beide Produkte mit dem wt-Stamm zu mehreren unbekanntem Reaktionsprodukten. Auch in den Proben nach Inkubation mit dem ko-Stamm sind unbekannte Produkte, teilweise mit gleichen Retentionsstrecken wie die des wt-Stammes vorhanden.

5.2.3 Steroide: Pregnenolon und DHEA

Die Umsetzung von Pregnenolon und DHEA mit *B. megaterium* im Komplexmedium konnte nicht mittels HPLC analysiert werden. Wie oben bereits erwähnt, verfügen beide nicht über ein delokalisiertes π -Elektronensystem, absorbieren daher nicht bei 240 nm oder 254 nm. Die Reaktion mit der Cholesteroxidase kann zur Sichtbarmachung von DHEA und Pregnenolon, nicht aber für die der Reaktionsprodukte eingesetzt werden. Steroide und Terpenoide können auch bei 210 nm detektiert werden, allerdings überlagerte Absorption der Mediumrückstände die Messung zu stark. Die Umstellung zu gradient-Grade-Lösemittel brachte hier keinen Erfolg. Daher wurden die Umsätze mittels DC untersucht.

B. megaterium ATCC13368 setzte Pregnenolon in ein Haupt- und ein Nebenprodukt (R_f (EE) = 0,40 und 0,23) um. Nach Inkubation mit dem ko-Stamm konnte keine Produktbildung detektiert werden. Das Hauptprodukt der Reaktion konnte in ausreichender Menge und Reinheit für eine NMR hergestellt und mit dieser als 7β -Hydroxypregnenolon identifiziert werden (s. Anhang). Pregnenolon reagiert demnach wahrscheinlich ohne Ausbildung eines Zwischenproduktes mit CYP106A2 zu 7β -Hydroxypregnenolon (s. Abb. 5.32). Das zweite Reaktionsprodukt konnte nicht in ausreichender Menge und Reinheit für eine NMR gewonnen werden. Es ist aber mit hoher Wahrscheinlichkeit das 7α -Stereoisomer, in Analogie zur Umsetzung von DHEA mit CYP106A2 (s.u.). Nach Umsetzung von 130 mg Pregnenolon in 1 l Kultur konnten nach Reinigung über eine Kieselgelsäule 8 mg 7β -Hydroxypregnenolon isoliert werden. Da die Ausbeute an 7β -Hydroxypregnenolon aus dem *in vivo* Umsatz gerade ausreichend war für eine NMR und zudem das zweite Reaktionsprodukt nicht identifiziert werden konnte, wurde an dieser Stelle auf weitere Untersuchungen hinsichtlich der Reaktion verzichtet.

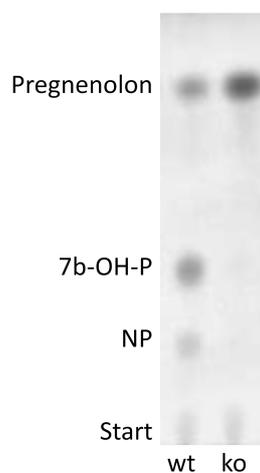


Abbildung 5.31: DC-Chromatogramm der *in vivo* Umsetzung von Pregnenolon mit *B. megaterium* AT-CC13368. 100 μ M Substrat wurden mit 50 ml einer frischen 16 h Kultur *B. megaterium* bei 30 °C inkubiert. Die Kulturen wurden zu 500 μ l nach 4 h beprobt, die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l Ethylacetat gestoppt und extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase wurde das Residuum in 30 μ l Ethylacetat gelöst und 2 μ l auf DC-Platten aufgebracht. Die Trennung erfolgte auf Silicagel-60 DC-Aluplatten mit reinem Ethylacetat als mobiler Phase. Substrat und Reaktionsprodukte wurden durch Färbung mit einem Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz sichtbar gemacht.

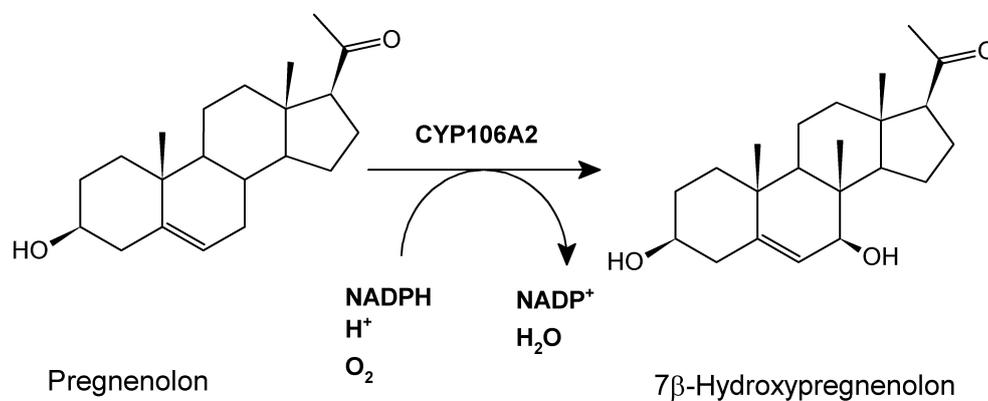


Abbildung 5.32: Schema der Reaktion von Pregnenolon mit CYP106A2 zu 7- β -Hydroxypregnenolon

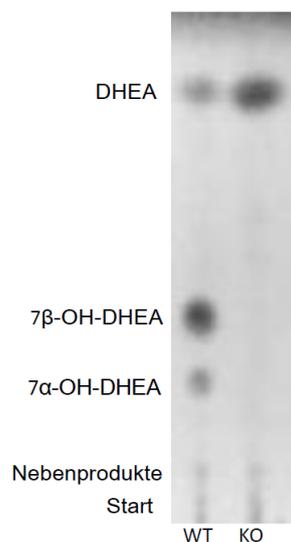


Abbildung 5.33: DC-Chromatogramm der *in vivo* Umsetzung von DHEA mit *B. megaterium* ATCC13368. 100 μ M Substrat wurden mit 50 ml einer frischen 16 h Kultur *B. megaterium* bei 30 °C inkubiert. Die Kulturen wurden zu 500 μ l nach 4 h beprobt, die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l Ethylacetat gestoppt und extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase wurde das Residuum in 30 μ l Ethylacetat gelöst und 2 μ l auf DC-Platten aufgebracht. Die Trennung erfolgte auf Silicagel-60 DC-Aluplatten mit reinem Ethylacetat als mobiler Phase. Substrat und Reaktionsprodukte wurden durch Färbung mit einem Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz sichtbar gemacht.

Die Umsetzung von DHEA mit *B. megaterium* ATCC13368 wt-Stamm resultierte in der Bildung von einem Haupt- und einem Nebenprodukt (R_f (EE) = 0,41 und 0,29). Auch für die Reaktion von DHEA mit den Bakterien wurde durch Verwendung des ko-Stammes gezeigt, dass die gebildeten Produkte aus der Reaktion mit CYP106A2 hervorgehen, da sie nur nach Reaktion mit den wt-Zellen auftreten (s. Abb. 5.33). Die Nebenprodukte, die direkt am Start auftreten, sind mit großer Wahrscheinlichkeit Nebenprodukte aus dem Stoffwechsel der Zellen, da sie in fast allen *in vivo* Proben auftreten. Beide Reaktionsprodukte konnten über eine Kieselgelsäule gereinigt und mittels NMR identifiziert werden. Produkt 1 (R_f (EE) = 0,41) ist das monohydroxylierte 7 β -OH-DHEA und Produkt 2 (R_f (EE) = 0,29) sein alpha-ständiges Stereoisomer 7 α -OH-DHEA. Nach Umsetzung von 115 mg DHEA in 1 l *B. megaterium*-Kultur konnten 43 mg 7 β -OH-DHEA und 4 mg 7 α -DHEA gewonnen werden.

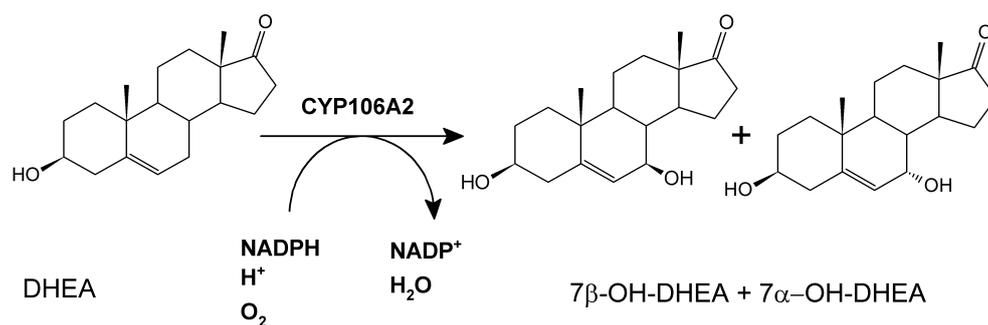


Abbildung 5.34: Schema der Reaktion von DHEA mit CYP106A2 zu 7-β-Hydroxydehydroepiandrosteron und 7α-Hydroxydehydroepiandrosteron

5.3 Charakterisierung der Umsätze von Dipterocarpol und DHEA

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Ganzzellbiokatalyse von Dipterocarpol und DHEA hinsichtlich ihres biotechnologischen bzw. pharmazeutischen Potentials untersucht werden. Dipterocarpol ist aus pharmazeutischer Sicht aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu den bioaktiven Inhaltsstoffen der Ginsengpflanzen (*Panax ginseng* C.A.Mey und *Panax notoginseng*), den sogenannten Ginsenosiden (Ginsenoside Rg1 und Rb1) interessant. Dipterocarpol ist ein Hauptbestandteil des Dammarharzes, vorkommend in allen Mitgliedern der Familie der *Dipterocarpaceae*, womit es um ein Vielfaches häufiger und gleichsam billiger ist als die Triterpenoide des Ginseng. Besonders interessant ist das zweifach hydroxylierte $7\beta,11\alpha$ -OH-D, welches bisher noch nicht beschrieben wurde. Dass es sich hierbei um eine neue Substanz handelt, macht $7\beta,11\alpha$ -OH-D für pharmakologische Untersuchungen überaus attraktiv. 7β -OH-DHEA und 7α -OH-DHEA werden in der Literatur bezüglich ihrer Rolle als Neurosteroid, vor allem hinsichtlich immunmodulatorischer Wirkung diskutiert [94]. Daher ist die biotechnologische Herstellung dieser Substanzen ein lohnenswerter Prozess, der im Folgenden eingehender untersucht wurde.

5.3.1 Dipterocarpol

5.3.1.1 Michaelis-Menten-Kinetik der *in vitro* Reaktion Zur Charakterisierung der Hydroxylierung von Dipterocarpol durch CYP106A2 wurde zunächst versucht, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} sowie die Michaeliskonstante K_M *in vitro* zu ermitteln. Unter Annahme einer *steady state*-Situation ($t = 2$ min, Umsatzrate max. 20 %) wurden die apparenten kinetischen Parameter mittels Endpunkt-Enzymkinetik-Messungen ermittelt. Dazu wurde die Produktbildung mittels Dünnschichtchromatographie analysiert, die erhaltenen Spotintensitäten gegen die eingesetzte Dipterocarpolkonzentration aufgetragen und die kinetischen Konstanten durch hyperbolische Regression errechnet. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Dipterocarpol in wässrigen Lösungen und der Sensitivität des *in vitro* Enzymsystems gegenüber polaren, organischen Lösungsmitteln wie Ethanol oder DMSO (max. 3 %) wurden maximal $400 \mu\text{M}$

Dipterocarpol zur Reaktion gegeben. Dadurch gelang es nicht, eine Substratsättigung der Reaktion zu erreichen. Die dargestellten kinetischen Parameter sind daher nur Näherungswerte der tatsächlichen Reaktion. Um eine genaue Aussage über die Reaktionsgeschwindigkeiten treffen zu können, sind eingehendere Studien nötig. Die Reaktionsgeschwindigkeit und die Michaelis-Konstante konnten für die Gesamtreaktion nicht bestimmt werden, die apparente maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{\max}^{app} beträgt 347 ± 97 nmol/nmolP450/min. Lediglich für die Reaktion von Dipterocarpol zum zweifachhydroxylierten $7\beta,11\alpha$ -Dihydroxydipterocarpol konnte eine Sättigung der Enzymreaktion erreicht werden. CYP106A2 hydroxyliert Dipterocarpol zu $7\beta,11\alpha$ -Dihydroxydipterocarpol mit einer apparenten maximalen Geschwindigkeit von v_{\max}^{app} von 18 ± 1 nmol/nmolP450/min. Der hohe K_M Wert für die Gesamtreaktion könnte als Hinweis auf eine niedrige Substrataffinität fehlgedeutet werden, im Falle einer mehrstufigen Enzymreaktion ist der K_M -Wert allerdings kein direktes Maß mehr für die Substrataffinität. Es konnte nicht geklärt werden, wie K_M bzw. v_{\max} Werte sich für jede Reaktion verhalten, da die Reaktion über das 7β -Zwischenprodukt zur dihydroxylierten Spezies außerordentlich schnell verläuft. Zudem ist die Natur der Nebenprodukte nicht bekannt. Höchstwahrscheinlich ist eines der Nebenprodukte das 11α -OH-D, welches ebenso wie das 7β -OH-D mit CYP106A2 zu $7\beta,11\alpha$ -OH-D reagiert. Die Reaktion von Dipterocarpol mit CYP106A2 ist damit mit einer einfachen Enzymkinetik nicht einwandfrei zu beschreiben. Zukünftig wird es erforderlich sein, die gebildeten Zwischenprodukte zu isolieren und identifizieren. Die Ermittlung der kinetischen Parameter für jede der stattfindenden Einzelreaktionen wird erst eine genaue Auskunft über die Umsetzungsgeschwindigkeiten und Affinitäten der Zwischenprodukte liefern.

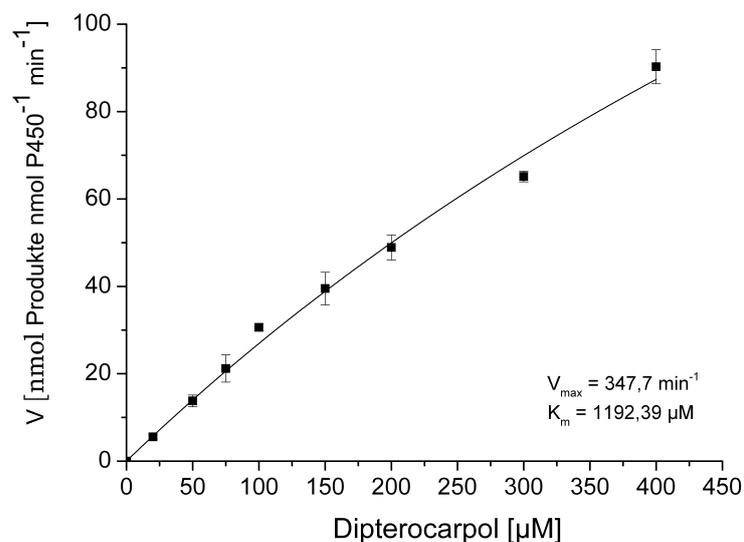


Abbildung 5.35: Michaelis-Menten Kinetik der Reaktion von Dipteroicarpol mit CYP106A2 im *in vitro* rekonstituierten System (AdR 0,5 μM, Adx 5 μM, CYP 0,25 μM, HEPES 50 mM pH 7,4 supplementiert mit 0,05 % Tween20). Die Reaktionsansätze wurden mit Dipteroicarpol (0 bis 400 μM in ethanolische Lösung (3 % v/v) versetzt, die Reaktion mit 30 °C warmen NADPH (500 μM) gestartet und nach 2 min mit 250 μl Ethylacetat gestoppt und zweimal extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, getrocknet und mittels DC analysiert. Die relativen Spotintensitäten wurden mit dem Programm ImageLab errechnet und gegen die eingesetzte Dipteroicarpolkonzentration aufgetragen. Die Errechnung der Michaeliskonstanten erfolgte durch hyperbolische Regression des resultierenden Plots mit OriginPro8.6

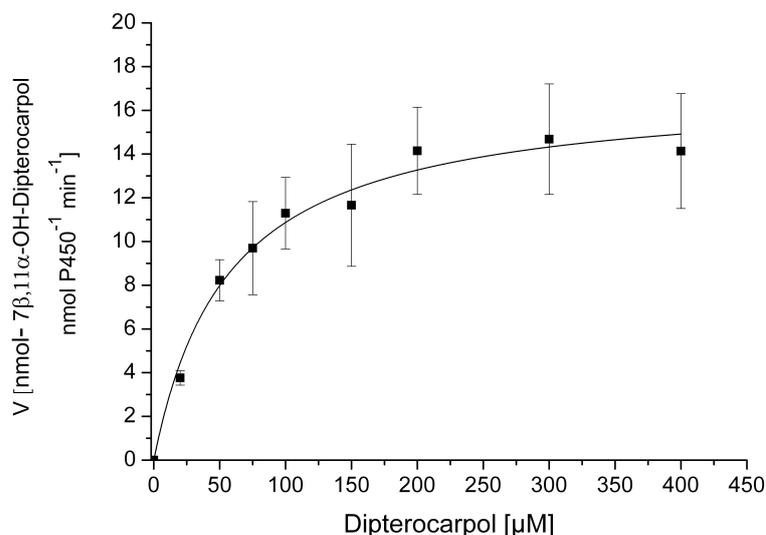


Abbildung 5.36: Michaelis-Menten Kinetik der Bildung von $7\beta,11\alpha$ -D aus Dipterocarpol durch CYP106A2 im *in vitro* rekonstituierten System (AdR $0,5 \mu\text{M}$, Adx $5 \mu\text{M}$, CYP $0,25 \mu\text{M}$, HEPES 50 mM pH $7,4$ supplementiert mit $0,05 \%$ Tween20). Die Reaktionsansätze wurden mit Dipterocarpol 3% v/v ethanolische Lösung (0 bis $400 \mu\text{M}$) versetzt, die Reaktion mit $30 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen NADPH ($500 \mu\text{M}$) gestartet, nach 2 min mit $250 \mu\text{l}$ Ethylacetat gestoppt und zweimal extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, getrocknet und mittels DC analysiert. Die rel. Spotintensitäten wurden mit dem Programm ImageLab errechnet und gegen die eingesetzte Dipterocarpolkonzentration aufgetragen. Die Errechnung der Michaeliskonstanten erfolgte durch hyperbolische Regression des resultierenden Plots mit OriginPro8.6

5.3.1.2 Ganzzellumsatz von Dipterocarpol Zunächst wurde die Umsetzung von $200 \mu\text{M}$ Dipterocarpol in 50 ml frischer *B. megaterium* Übernachtskultur über einen Zeitraum von 24 h verfolgt. Die Kultur wurde dazu in unterschiedlichen Abständen beprobt ($0, 2, 4, 8, 12, 24 \text{ h}$) mit Ethylacetat extrahiert und die Umsetzung mittels DC untersucht (s. Abb. 5.38). Nach 24 h verstoffwechselten die *B. megaterium* Zellen $200 \mu\text{M}$ Dipterocarpol zu 84% , davon waren 36% das monohydroxylierte 7β -OH-D und 41% $7\beta,11\alpha$ -OH-D und 33% nicht-identifizierte Nebenprodukte (s. Abb. 5.38). Interessanterweise konnte auch nach längerer Kultivierungsdauer nicht mehr Dipterocarpol umgesetzt werden. Die Biokonversion stoppte bei $83,5 \%$, 100% Umsatz wurden nicht erreicht. Daher beträgt die (theoretische) Ausbeute für 7β -OH-D $36,7 \%$ mit einer Selektivität der Reaktion σ von $0,44$. Die Ausbeute von $7\beta,11\alpha$ -OH-D beträgt $40,9 \%$ mit einer Selektivität σ von $0,49$ (s. Tab. 5.48).

Tabelle 5.37: Maximale Ausbeute von 7β -OH-D und $7\beta,11\alpha$ -OH-D nach der Umsetzung von Diptero-
carpol durch *B. megaterium* ATCC13368 mit einer Umsatzrate χ von 83,5 % in 24 h.

| Produkt | Ausbeute (η_P) | Selektivität σ |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 7β -OH-D | 36,7 % | 0,44 |
| $7\beta,11\alpha$ -OH-D | 40,9 % | 0,49 |

Insgesamt konnten aus 150 mg Diptero-
carpol nach Reinigung über Kieselgel-60 10 mg 7β -
OH-D und 2 mg $7\beta,11\alpha$ -OH-D erhalten werden. Die Ausbeute beträgt damit 6,66 % für das
monohydroxylierte und 1,33 % für das zweifachhydroxylierte Reaktionsprodukt.

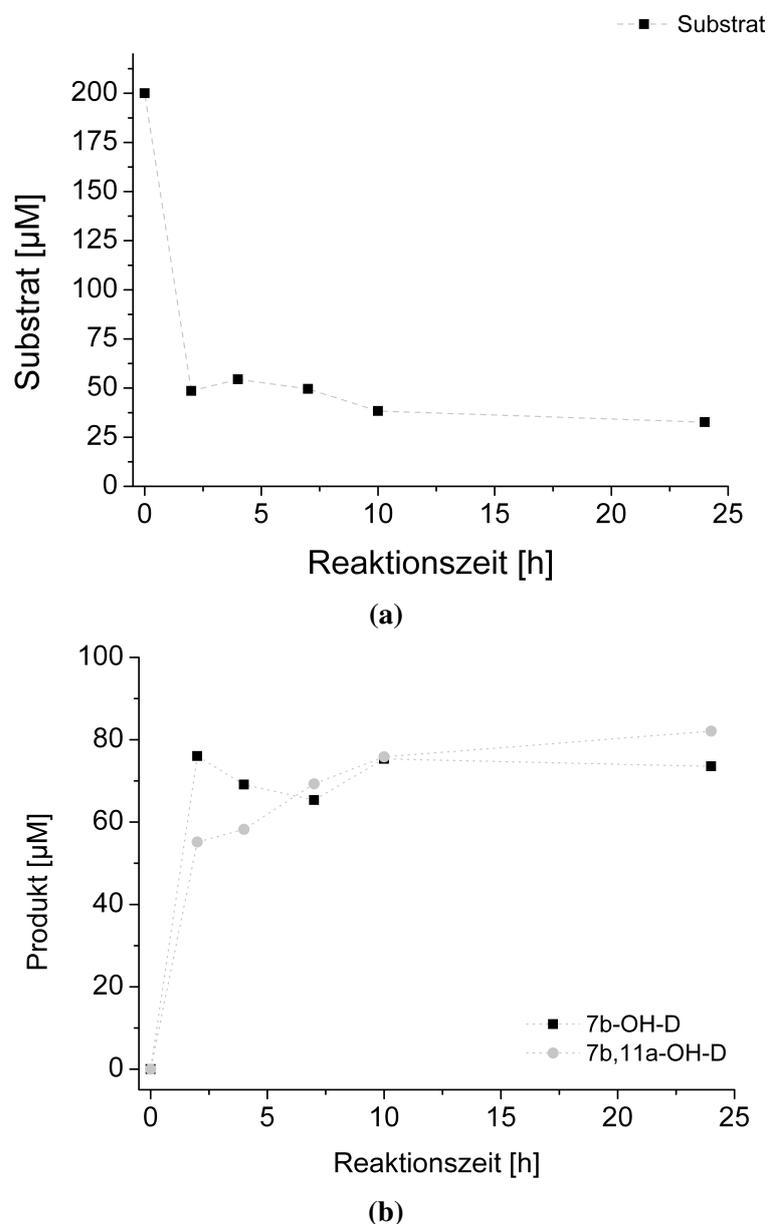


Abbildung 5.38: Substratverbrauch (a) bzw. Produktbildung (b) nach Umsetzung von 200 μM Dipterocarpol mit *B. megaterium* ATCC13368 Zellen in soytonhaltigem Komplexmedium. Die Umsetzungen erfolgten bei 30 °C, 150 upm. Dipterocarpol wurde in 5 ml Ethanol gelöst und zum Zeitpunkt t_0 zugegeben. Die Beprobung erfolgte nach 0, 1, 2, 4 und 24 h zu je 500 μl . Die Proben wurden extrahiert, evaporiert und schließlich mittels DC analysiert.

Der Einfluss des Dipterocarpolumsatzes auf das Wachstum von *B. megaterium* wurde durch Aufnahme einer Wachstumskurve in Anwesenheit von 250 μM Dipterocarpol (2,5 ml ethanol-

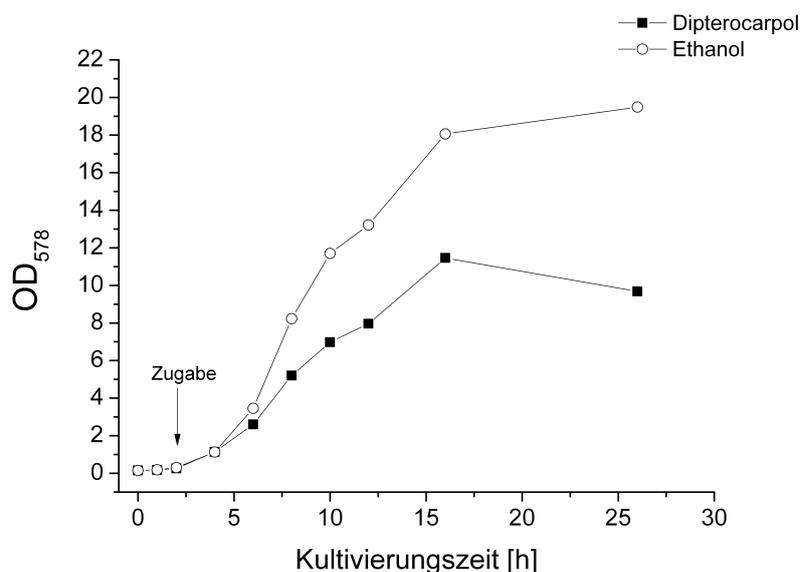


Abbildung 5.39: Wachstumskurve von *B. megaterium* ATCC13368 in Komplexmedium (1x KPP pH 7,4) bei 30 °C in 50 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 150 upm. Gezeigt sind die erhaltenen Kurven nach Zugabe von 5 ml Ethanol (leere Kästchen) und 250 µM Dipterocarpol gelöst in 5 ml Ethanol (gefüllte Kästchen) am Ende der initialen *Lag*-Phase ($t = 4$ h). Das Wachstum der Zellen wurde über 24 h durch Beprobung und Messen der OD₅₇₈ verfolgt.

sche Lösung) untersucht. Die Zugabe des Substrates erfolgte nach 4 h Inkubation bei 30 °C (Ende der anfänglichen *Lag*-Phase). Als Kontrolle wurde eine Kultur mit derselben Vorkultur beimpft und nach 4 h mit dem Lösungsmittel Ethanol, ebenfalls 2,5 ml, versetzt. Nach ca. 16 h traten beide Kulturen in die stationäre Phase ein, wobei die Ethanol-Kultur eine OD₅₇₈ von 19,49 erreichte, während die mit Dipterocarpol versetzte Kultur nur eine OD₅₇₈ von 9,7 erreichte (s. Abb. 5.39). Ob Dipterocarpol toxisch auf die Zellen wirkt, wurde von Fr. Anastasia Zinschenko im Rahmen ihres Vertiefungspraktikums untersucht. Dazu wurden die Kulturen nach 16 h Inkubation geerntet und mit steigenden Konzentrationen Dipterocarpol und gleichsam steigenden Mengen Ethanol versetzt und über einen Zeitraum von 4 bis 8 Stunden inkubiert. Anschließend wurden Verdünnungen von 1:100 bzw. 1:1000 mit Medium hergestellt und auf NB-Agarplatten ausgesät. Die Zahl der nach 24 h Bebrütung bei 37 °C auf den Platten entstandenen Kolonien wurde mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Es konnte dabei keine toxische Wirkung des Substrats auf die Zellen festgestellt werden.

5.3.2 DHEA

5.3.2.1 Michaelis-Menten Kinetik der *in vitro* Reaktion Zur Charakterisierung der Hydroxylierung von DHEA durch CYP106A2 wurde zunächst die Reaktionsgeschwindigkeit sowie die Michaeliskonstante *in vitro* ermittelt. Unter Annahme einer steady state-Situation ($t = 2$ min, Umsatzrate max. 20 %) wurden die kinetischen Parameter mittels Endpunkt-Enzymkinetik Messungen bestimmt. CYP106A2 setzte DHEA mit einer Geschwindigkeit v_{\max} von 151 ± 20 nmol/nmolP450/min um. Die Michaelis-Konstante der Reaktion betrug $265 \pm 62 \mu\text{M}$ (s. Abb.5.40). Damit ist die Geschwindigkeit der Reaktion vergleichbar mit der, die auch bei der Umsetzung von 3-oxo- Δ -4-Steroiden, beispielsweise 17α -Methyltestosteron ($v_{\max} = 209$ nmol/nmolP450/min), erreicht wird [78].

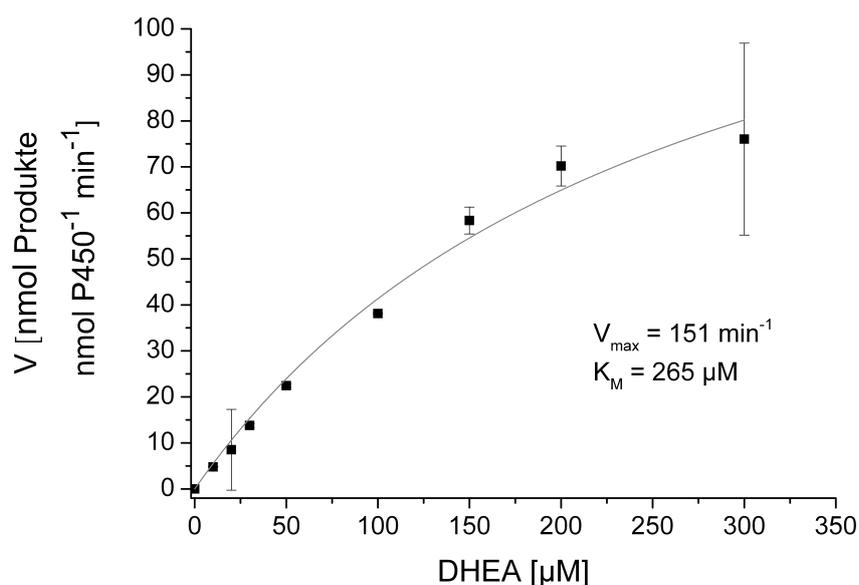


Abbildung 5.40: Enzymkinetik der Reaktion von DHEA mit CYP106A2 *in vitro*. Das Enzymystem wurde mit AdR $0,5 \mu\text{M}$, Adx $5 \mu\text{M}$ und CYP $0,25$ rekonstituiert und die Reaktion in μM , HEPES 50 mM pH $7,4$ supplementiert mit $0,05$ % Tween20 durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden mit DHEA (0 bis $300 \mu\text{M}$ in ethanolische Lösung (3 % (v/v))) versetzt, die Reaktion mit 30 °C warmen NADPH ($500 \mu\text{M}$) gestartet und nach 2 min mit $250 \mu\text{l}$ Ethylacetat gestoppt und zweimal extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, bis zur Trockne in der SpeedVac evaporiert und mittels HPLC analysiert. Die Produktbildung wurde über die Peakfläche in Relation zur Substratabnahme ermittelt. Die Reaktionsgeschwindigkeit und die Michaelis-Konstante wurden durch hyperbolische Regression der erhaltenen Plots mit OriginPro8.6. berechnet.

5.3.2.2 Ganzzellumsatz von DHEA Bei der Hydroxylierung von DHEA durch *B. megaterium* ATCC13368 wurden die höchsten Umsatzraten erreicht. 200 μM DHEA waren bereits nach weniger als 8 h vollständig in hydroxylierte Reaktionsprodukte überführt worden. Damit ergaben sich für die Herstellung von $7\beta\text{-OH-DHEA}$ die höchsten in der hier vorliegenden Arbeit festgestellten maximalen Ausbeuten. Im präparativen DHEA-Umsatz wurden nach Reinigung über Kieselgel-60 aus 115 mg DHEA 43 mg $7\beta\text{-OH-DHEA}$ und 4 mg $7\alpha\text{-OH-DHEA}$ erhalten.

Tabelle 5.41: Maximale Ausbeute von $7\beta\text{-OH-DHEA}$ und $7\alpha\text{-OH-DHEA}$ nach der Umsetzung von DHEA durch *B. megaterium* ATCC13368 mit einer Umsatzrate χ von 100 % in 3 h.

| Produkt | max. Ausbeute (η_{P}) | Selektivität σ |
|--------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| $7\beta\text{-OH-DHEA}$ | 80 % | 0,8 |
| $7\alpha\text{-OH-DHEA}$ | 20 % | 0,2 |

Zur näheren Charakterisierung wurde der DHEA-Umsatz zeit- und konzentrationsabhängig untersucht. In je 50 ml Kultur wurden 50, 75, 100, 200, 300 und 400 μM DHEA zugegeben und die Umsetzung mittels DC über einen Zeitraum von 18 min untersucht. Erstaunlicherweise konnten selbst 400 μM DHEA innerhalb von 180 min vollständig umgesetzt werden (s. Abb. 5.42).

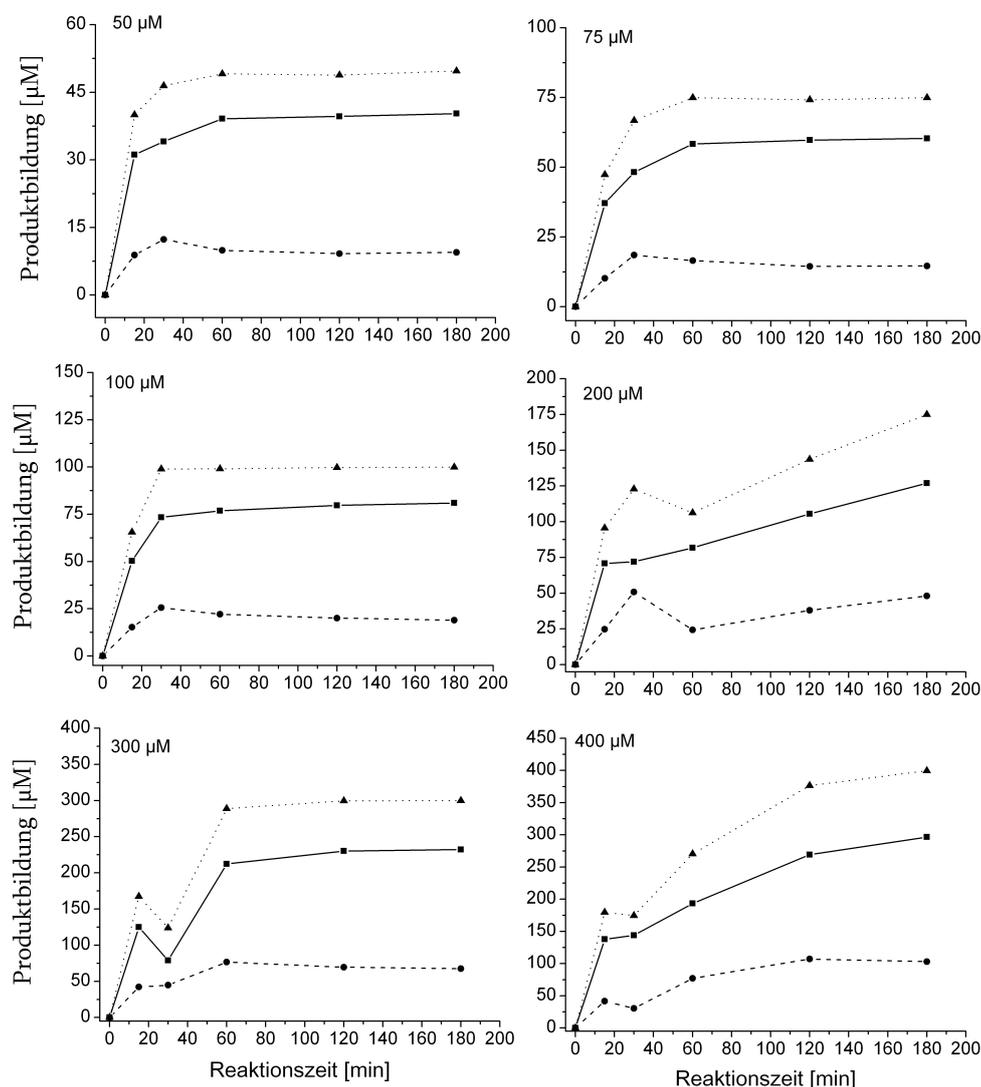


Abbildung 5.42: Zeit- und konzentrationsabhängige Bildung der DHEA-Reaktionsprodukte mit *B. megaterium* ATCC13368. Dargestellt sind die erhaltenen Konzentrationen der Einzelprodukte (Quadrate = 7β -OH-DHEA, Kreise = 7α -OH-DHEA) sowie die Gesamtproduktbildung (Dreiecke) in $\mu\text{mol/l}$. Die Umsetzungen von 50 - 400 μM erfolgten jeweils in 50 ml frischer 16 h Kultur bei 30 °C und 150 upm für 180 min. Die Kulturen wurden in verschiedenen Abständen (0, 15, 30, 60, 120, 180 min) zu 500 μl beprobt, extrahiert und mittels DC analysiert. Die relative Produktbildung wurde über die erhaltenen Spontintensitäten berechnet und gegen die Reaktionszeit aufgetragen.

Die Umsetzungen mit 400 μM DHEA wurden anschließend in einem unabhängigen Experiment noch dreimal wiederholt, um die Annahme, dass die Umsetzung in weniger als 3 Stunden vollständig abläuft, zu bestätigen. Die Reaktionen wurden unter den oben genannten Bedingungen durchgeführt. Nach DC-Analyse der Umsetzungen zeigte sich, dass 400 μM DHEA durch-

schnittlich innerhalb von 120 min zu 100 % umgesetzt werden. Damit ergibt sich für die Umsetzung von DHEA mit *B. megaterium* ATCC13368 eine Umsatzrate von 38 mg/l/h. Ausgehend von einem gleichbleibenden Produktverhältnis wären das umgerechnet ca. 7,6 mg/l/h 7 α -OH-DHEA und 30,4 mg/l/h 7 β -OH-DHEA.

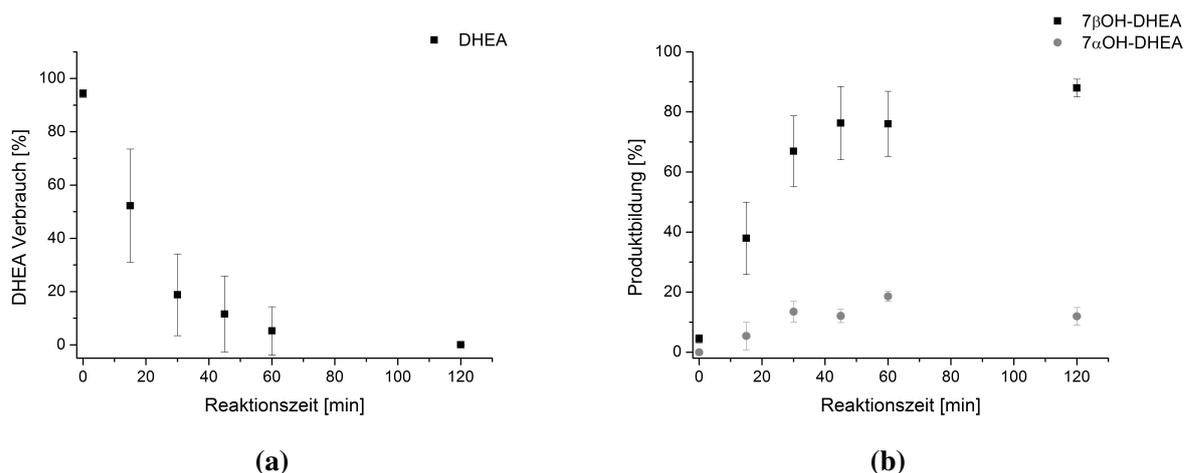


Abbildung 5.43: Prozentualer Substratverbrauch (a) bzw. prozentuale Produktbildung (b) nach Umsetzung von 400 μ M DHEA mit *B. megaterium* ATCC13368 in 50 ml frischer 16 h Kultur. Die Umsetzungen erfolgten bei 30 °C, 150 upm in Komplexmedium. DHEA wurde in 5 ml Ethanol gelöst zugegeben. Die Beprobung erfolgte nach 0, 15, 30, 60 und 120 min zu je 500 μ l. Die Proben wurden extrahiert, evaporiert und schließlich mittels DC analysiert.

Zur Herstellung ausreichender Mengen der Reaktionsprodukte für eine NMR und weitere Analysen wurden deshalb 150 mg DHEA in 1 l Kultur analog zu Dipteroicarpol umgesetzt, wobei die Reaktionszeit in diesem Falle 8 h betrug. Nach säulenchromatographischer Trennung wurden 43 mg 7 β -OH-DHEA und 4 mg 7 α -OH-DHEA isoliert. Die Auswirkung der DHEA-Umsetzung auf das Wachstum der *B. megaterium* Zellen wurde analog zur Dipteroicarpolumsetzung durch Aufnahme einer Wachstumskurve untersucht. Auch hier erfolgte die Substratzugabe (250 μ M) 4 Stunden nach Beimpfen der Kultur. Nach 24 h erreichte die Kultur mit DHEA ca. die Hälfte der OD₅₇₈ (10,7) der substratfreien Kultur (19,5).

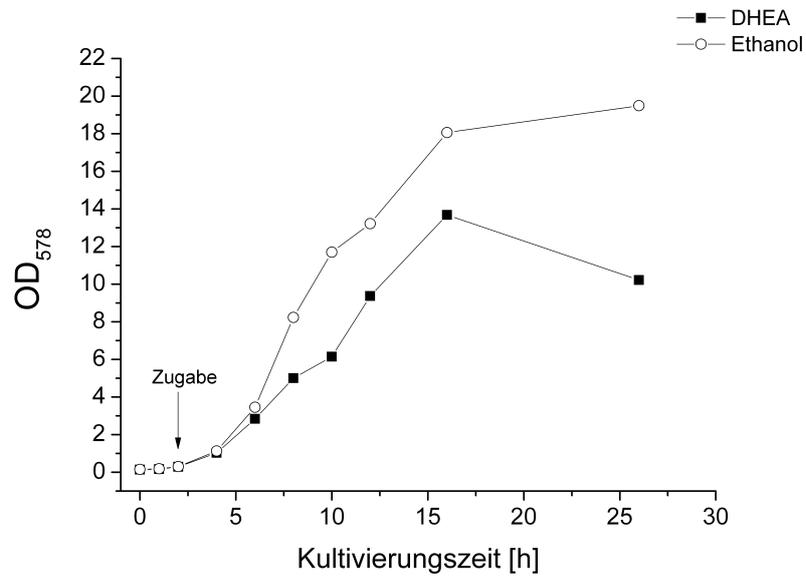


Abbildung 5.44: Wachstumskurve von *B. megaterium* in 50 ml Komplexmedium bei 30 °C und 150 upm in Schikanekolben in Gegenwart von 2,5 ml Ethanol bzw. 200 µ DHEA in 2,5 ml Ethanol

5.4 Optimierung der Ganzzellbiokatalyse von DHEA und Dipterocarpol

5.4.0.3 Substratfütterungs-Umsätze Bei der Umsetzung von Dipterocarpol in präparativem Maßstab konnten aus 150 mg Dipterocarpol nach säulenchromatographischer Reinigung 10 mg 7β -OH-D und 0,8 mg $7\beta,11\alpha$ -OH-D erhalten werden. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde in einem weiteren präparativen Umsatz das Substrat Dipterocarpol der Kultur schrittweise zugefüttert (engl.: *Feed*). Dabei wurden 300 mg Dipterocarpol (in 50 ml Ethanol) mit Abständen von jeweils einer Stunde, in Schritten zu je 135 μ M portionsweise zugesetzt. Aus diesem Umsatz konnten 46 mg 7β -OH-D und 33 mg $7\beta,11\alpha$ -OH-D nach der Reinigung über eine Kieselgelsäule erhalten werden. Damit gelang es, die Ausbeute der Dipterocarpolprodukte um den Faktor 4,6 für das monohydroxylierte und um den Faktor 16,5 für das dihydroxylierte Produkt zu steigern. Die absolute Ausbeute (Gewogen nach Reinigung über Kieselgel) bleibt aber auch im Fütterungsumsatz mit 15 % und 11 % noch verhältnismäßig gering.

Tabelle 5.45: Nach Umsetzung von Dipterocarpol mit *B. megaterium* erhaltenen absoluten Ausbeuten von 7β -OH-D und $7\beta,11\alpha$ -OH-D im Satz- (Batch) und Fütterungs-Umsatz (Feed). Die Reaktionen wurden jeweils in 1 l Kultur (je 250ml in 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikane) in soytonhaltigem Komplexmedium bei 30 °C und 150 upm durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug jeweils 24 h.

| Produkt | 150 mg (Batch) | 300 mg (Feed) |
|-------------------------|----------------|---------------|
| 7β -OH-D | 10 mg (6,66 %) | 46 mg (15 %) |
| $7\beta,11\alpha$ -OH-D | 2 mg (1,33 %) | 33 mg (11 %) |

Um die Umsetzung von DHEA mit *B. megaterium* zu steigern, wurde DHEA analog zu Dipterocarpol der Kultur kontinuierlich zugefüttert. Da gezeigt werden konnte, dass 400 μ M von den Zellen innerhalb von 180 min vollständig in hydroxylierte Produkte überführt werden können, wurden die Portionsgrößen auf 400 μ M und die Abstände auf 180 min festgesetzt. Nach 180 min waren, wie erwartet, die ersten 400 μ M vollständig verbraucht. Auch die nächsten 400 μ M DHEA wurden nach 180 min vollständig in die respektiven hydroxylierten DHEA-Produkte überführt. Insgesamt konnten so innerhalb von 16 h 1,6 mM DHEA verstoffwechselt werden. Die

letzten 400 μM wurden allerdings nicht mehr vollständig in Produkte überführt.

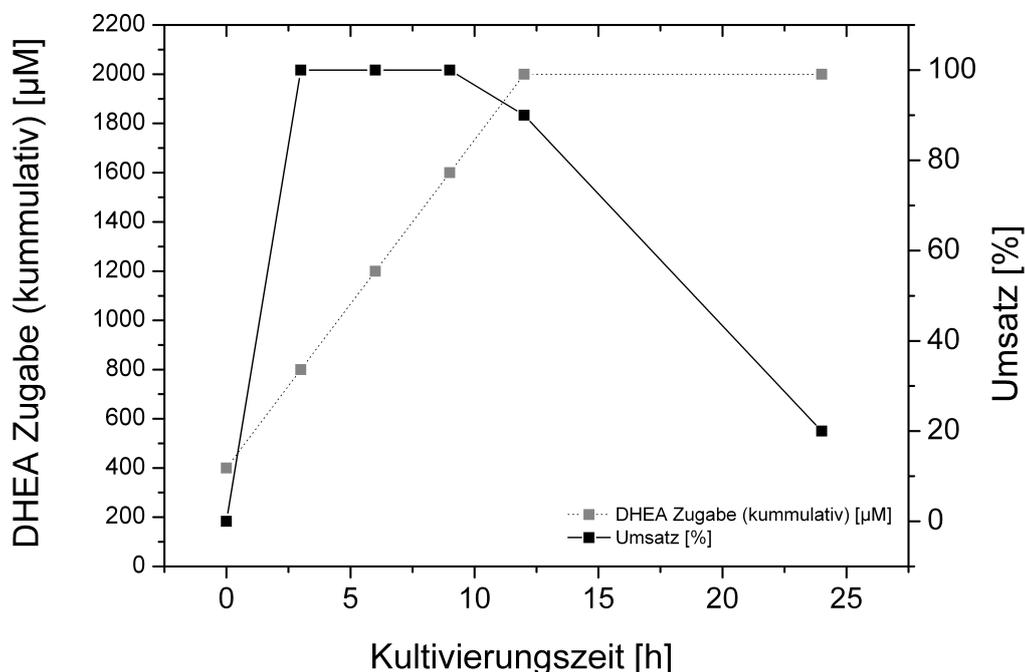


Abbildung 5.46: Biotransformation von DHEA mit *B. megaterium* ATCC13368 in 50 ml Erlenmeyer-Schikanekolben bei 30 °C und 150 upm. Die Zugabe von DHEA erfolgte schrittweise zu je 400 μl im Abstand von 3 h (*lineare* Fütterung (Feed)). Die Kulturen wurden vor und nach jeder Substratzugabe zu 500 μl beprobt, extrahiert und mittels DC analysiert. Dargestellt sind die DHEA-Zugabe, die bis zu maximal 2000 μM ($t = 16$ h) erfolgte (leere Kästchen) und der entsprechende prozentuale DHEA-Umsatz (leere Kästchen) über die Kultivierungszeit.

Tabelle 5.47: Nach Umsetzung von DHEA mit *B. megaterium* erhaltenen Produktmengen von 7 β -OH-DHEA und 7 α -OH-DHEA im Satz- (Batch) und Fütterungs-Umsatz (Feed). Die nach Reinigung der Produkte erhaltenen Ausbeuten sind in Klammern angegeben. Die DHEA-Feed-Umsetzungen wurden nicht extrahiert und gereinigt, deshalb sind die absoluten Ausbeuten hier nicht angegeben. Die Umsatzdauer betrug 8 h (Batch) und 24 h (Feed).

| Produkt | 115 mg (Batch) | 460 mg (Feed) |
|---------------------|----------------------|---------------|
| 7 β -OH-DHEA | 92 mg (46 mg (46 %)) | 368 mg |
| 7 α -OH-DHEA | 23 mg (4 mg (17 %)) | 92 mg |

Es stellt sich die Frage, ob die letzten 400 μM nicht mehr umgesetzt wurden, weil die sich akkumulierenden Produkte die Reaktion inhibieren oder toxisch auf die Zellen wirken. Daher

wurden in einem parallelen Ansatz die *B. megaterium* Zellen ohne Zugabe von DHEA in Komplexmedium bei 30 °C für 16 h inkubiert und anschließend über einen Zeitraum von 24 h beprobt. Und die Aktivität, gemessen als Produktbildung mit definierter Menge und Zeit in % im Vergleich zur 16 h Kultur (Aktivität = 1) dargestellt. Durchschnittlich wurde die höchste Aktivität der Zellen mit 24 h alten Kulturen erreicht ($1,26 \pm 0,036$). Nach 48 h betrug die relative Aktivität der *B. megaterium* Kultur noch ca. 85 % der Anfangsaktivität (16 h). Die längere Kultivierungsdauer ist demnach kein Grund für den Abfall in der DHEA-Hydroxylierungsaktivität der Zellen. Es ist demnach anzunehmen, dass die Akkumulation der Hydroxylierungsprodukte schließlich die Reaktion hemmen. Diese Inhibition kann direkt über eine Endprodukthemmung des CYP106A2 erfolgen oder indirekt über die Beeinflussung von Stoffwechselwegen, die die Katalyse indirekt beeinflussen, wie etwa den Pentosephosphatweg, vermittelt werden. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen wäre eine kontinuierliche Abtrennung der Reaktionsprodukte, beispielsweise durch Zwei-Phasen-Biokonversionen. Dabei dient eine nicht-wassermischbare Phase (meist organisches Lösemittel) als Substrat- und Produkt-Reservoir, das es eine kontinuierliche Substratzufuhr und Produktabtrennung erlaubt. Hierbei sind viele Parameter zu beachten, wie etwa die Löslichkeit des Substrates bzw. der Produkte, die Polarität des verwendeten Lösemittels etc [95].

Tabelle 5.48: Aktivität der *B. megaterium* Zellen. Dargestellt sind die relativen Aktivitäten bezogen auf die Aktivität zum Zeitpunkt t_0 (16 h Kultur). Die Aktivität wurde durch Umsetzung von 200 μM Substrat mit 500 μl Kultur in 1,5 ml Eppendorfgefäßen bei 30 °C für 30 min bestimmt

| Kultivierungsdauer | 16 h | 20 h | 24 h | 48 h |
|--------------------|------|------------------|-----------------|-----------------|
| Rel. Aktivität | 1 | $1,06 \pm 0,036$ | $1,36 \pm 0,42$ | $0,85 \pm 0,22$ |

5.4.0.4 Umsätze mit ruhenden Zellen Durch Verwendung so genannter *ruhender Zellen*, im Unterschied zu *wachsenden Zellen*, kann die P450-Reaktion unabhängig vom Zellwachstum untersucht werden [74, 84]. Zudem werden bei Verwendung von ruhenden Zellen weniger störende Stoffwechselprodukte angereichert. Daher wurden die Umsetzungen von Dipterocarpol bzw.

DHEA mit ruhenden Zellen untersucht. Die Umsetzung von Dipterocarpol mit ruhenden Zellen verlief ähnlich der in wachsenden Zellen. Nach 24 h waren von 200 μM Substrat 82,9 % (165 μM) verbraucht. Wachsende Zellen verstoffwechselten in 24 h fast diesselbe Menge, nämlich 83,67 % (167 μM). Dagegen konnte durch Verwendung von ruhenden Zellen 400 μM DHEA deutlich schneller als mit wachsenden Zellen umgesetzt werden. 400 μM DHEA wurden von ruhenden ATCC13368-Zellen innerhalb 60 min vollständig umgesetzt, im Vergleich dazu brauchten die wachsenden Zellen beinahe die dreifache Zeit, um die gleiche Menge DHEA vollständig in die respektiven Reaktionsprodukte umzuwandeln.

Im Falle der DHEA-Umsetzung hat die Umstellung von Komplexmedium zu Kaliumphosphatpuffer eine Steigerung der Umsatzrate um das dreifache bewirkt. Möglicherweise hat das Entfernen der Kultivierungsbrühe zur Folge, dass der Stoffwechsel der *B. megaterium* Zellen vollständig in Richtung Biokatalyse des Substrates verschoben wurde. Die limitierenden Faktoren der Dipterocarpol-Reaktion konnten so allerdings nicht behoben werden. An dieser Stelle bleibt unklar, welcher der eigentliche geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Reaktion ist. Möglicherweise wird Dipterocarpol nur unzureichend von den Zellen aufgenommen, so dass ein Rest Substrat im Medium verbleibt. Studien hinsichtlich der Substratverfügbarkeit und der Einsatz permeabilisierender Substanzen könnten einen weiteren Ansatz hinsichtlich einer Optimierung der Reaktion bieten.

Tabelle 5.49: Vergleich der Umsetzungen von DHEA und Dipterocarpol mit wachsenden bzw. ruhenden Zellen. Für Dipterocarpol wurden jeweils 200 μM , für DHEA jeweils 400 μM verwendet. Dargestellt sind jeweils die Substratumsetzungen nach 1 und 24 h.

| | Dipterocarpol | | DHEA | |
|--------|-------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| | Umsatz χ | | | |
| | wachsende Zellen | ruhende Zellen | wachsende Zellen | ruhende Zellen |
| t 1 h | 151 μM | 138,71 μM | 270 μM | 400 μM |
| t 24 h | 167 μM | 165 μM | 400 μM | n.d. |

5.4.0.5 Vergleich mit dem Expressionsstamm MS941-CAA In der Arbeit von Fr. Dr. Bleif wurde ein tricistronischer Vektor zur rekombinanten Expression von CYP106A2 und einer Elektronentransferkette entwickelt. Sie konnte zeigen, dass durch die Überexpression des heterologen P450-Systems bestehend aus CYP106A2, AdR (bovin) und Adx₁₋₁₀₈ (bovin) die Umsatzrate von Terpensäuren und von 17 α -Methyltestosteron deutlich gesteigert wird. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, mit diesem Stamm (MS941-CAA) die Umsetzung von Dipterocarpol bzw. DHEA ebenfalls gesteigert werden kann. Untransformierte MS941-Zellen wurden als Kontrolle verwendet, um zu testen, ob die endogenen Cytochrome dieses Stammes DHEA bzw. Dipterocarpol ebenfalls umsetzen. Zum besseren Vergleich wurden beide Stämme 24 h kultiviert, wobei die Expression der Proteine im CAA-Stamm wie beschrieben durch Xylose induziert wurde. Diese Umsetzungen wurden mit ruhenden Zellen durchgeführt, weil die Umsatzrate von DHEA mit diesen höher und die von Dipterocarpol nicht schlechter war, als mit ruhenden Zellen. Die MS941-CAA-Zellen setzten Dipterocarpol nicht in höherem Maße um als die ATCC13368, auch hier konnten 200 μM nicht vollständig in hydroxylierte Produkte überführt werden. Der *B. megaterium* MS941_CAA-Stamm setzte DHEA (400 μM) genauso schnell um wie der wt-Stamm ATCC13368. 400 μM wurden mit ruhenden Zellen jeweils nach 1 h verbraucht (3-fach Bestimmung). Der Expressionsstamm setzte DHEA durchschnittlich zu $89 \pm 3 \%$ in 7 β -OH-DHEA

um, während nur etwa 10 % 7α -OH-DHEA gebildet wurden. Damit konnte zwar die Umsatzrate nicht gesteigert werden, die Selektivität der Reaktion der 7β -Hydroxylierung ($\sigma = 0,89$) wurde jedoch im Vergleich zum Umsatz mit den wt-Zellen ($\sigma = 0,8$) verbessert.

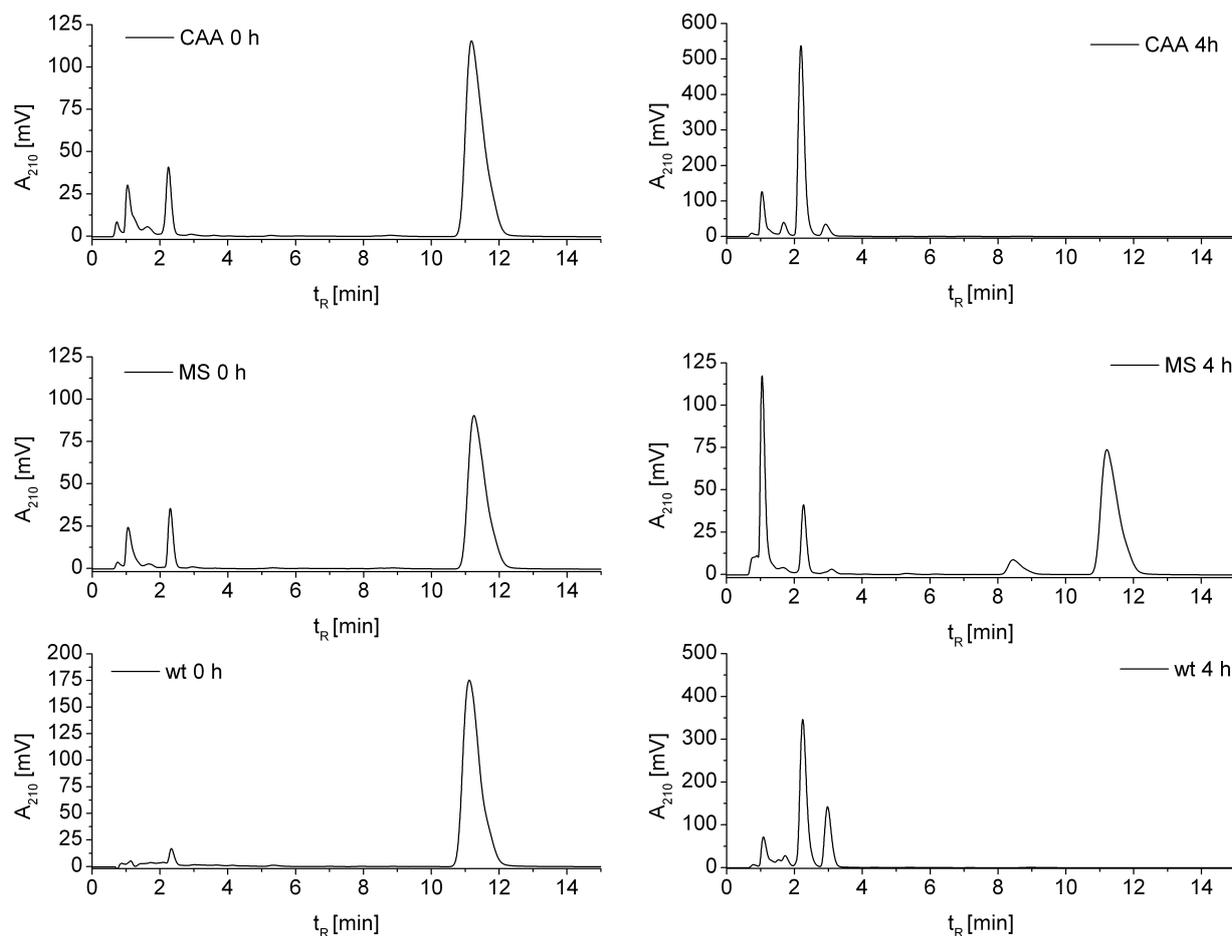


Abbildung 5.50: HPLC-Chromatogramme der Umsetzung von DHEA in *B. meg* MS941 transformiert mit Expressionsplasmid für CYP106A2, AdR und Adx pSMF2.1-CAA (CAA), untransformierten MS941-Zellen und dem CYP106A2 Wirtsstamm ATCC13368. Die Umsätze wurden jeweils mit Zellen aus 50 ml frischer Übernachtskultur (24 h Expression), gewaschen und resuspendiert in 50 ml KPP pH 7,4 (ruhende Zellen). Nach 0 und 4 h wurden je 500 μ l Probe entnommen, extrahiert und mittels HPLC analysiert. Nach isokratischer Trennung mit 40 % ACN in Wasser eluierten das 7β -OH-DHEA nach 2,3 das 7α -OH-DHEA nach 2,9 min von der Säule.

5.5 Zytotoxizitätstest

Um einen Einblick in mögliche zytotoxische Wirkungen von Dipterocarpol bzw. seinen Reaktionsprodukten zu bekommen, wurde mit zwei Säugerzelllinien, COS-1 und HeLa XTT-Zytotoxizitätstests durchgeführt [86]. Die Zellen wurden dazu jeweils 24 h mit dem Testagenz behandelt. Als Kontrollen wurden unbehandelte und nur mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Zellen mitgeführt. Alle Tests wurden in mindestens dreifacher Ausführung gemacht. Die zur Zellkultur verwendeten Dipterocarpolprodukte wurden zweimal mittels Säulenchromatographie mit Kieselgel-60 gereinigt und die Sauberkeit mittels DC bestimmt (UV und Anisaldehydbad). Dipterocarpol zeigte keinen Einfluss auf die Überlebensrate der COS-1 Zellen, nach 24 h Behandlung mit 100 μM Dipterocarpol lag die relative Überlebensrate (vergleichen mit unbehandelten Zellen) der Zellen bei 102,1 %. Die relative Überlebensrate der mit dem zweifachhydroxylierten $7\beta,11\alpha\text{-(OH)-D}$ behandelten Zellen, lag nach 24 stündiger Behandlung mit 100 μM bei 62,9 %, es wurde keine 100 %-ige Zytotoxizität festgestellt. Dagegen betrug die relative Überlebensrate der Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit dem monohydroxylierten $7\beta\text{-OH-D}$ nur noch 12,8 %. Von dem monohydroxylierten Produkt wurden daher serielle Verdünnungen hergestellt und bei Einsatz von 200 μM eine 100 %-ige Zytotoxizität beobachtet. Die halblethale Dosis (IC_{50}) von $7\beta\text{-OH-D}$ für COS-1 Zellen betrug $62 \pm 2 \mu\text{M}$ (s. Abb. 5.51).

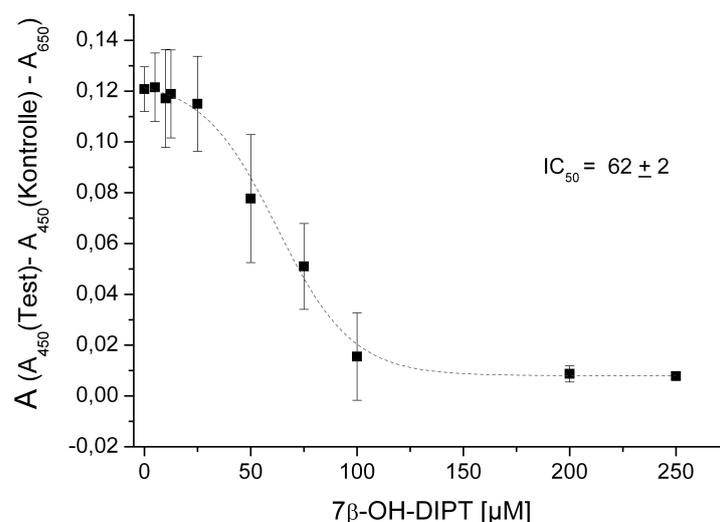


Abbildung 5.51: Zytotoxizitätstest mit COS-1-Zellen zur Bestimmung der halblethalen Dosis von 7β-OH-D. 10.000 Zellen pro Vertiefung wurden in 96-well Mikrotiterplatten ausgesät und 24 h bei 37 °C, 95 % rel. Luftfeuchte und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0 - 250 μM 7β-OH-D versetzt (DMSO jeweils 1 % (v/v)) und 24 h behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen bei 1500 g zentrifugiert, das Medium entfernt und 2 mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das XTT Reagenz zugesetzt (Gesamtkonzentration 20 % (v/v)) und die Zellen erneut 4 h bebrütet. Die Platten wurden dann im Tecan-Saphire II Platereader ausgelesen und die Absorption als Maß für die Viabilität zu $A = (A_{450}(\text{Test}) - A_{450}(\text{Kontrolle})) - A_{690}(\text{Test})$ berechnet. Die erhaltenen Absorptionen wurden grafisch gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen und der IC₅₀-Wert durch sigmoidale Regression (OriginPro8.6) mit der Boltzmann-Gleichung bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mind. 3 Messungen.

Ähnlich verhielt es sich mit den HeLa-Zellen. Auch hier konnte keine 100 %-ige zytotoxische Wirkung von Dipterocarpol oder dem zweifach hydroxylierten Produkt auf die Zellen nachgewiesen werden. Nach 24-stündiger Behandlung mit 100 μM Dipterocarpol lag die relative Überlebensrate der HeLa-Zellen bei 65 %, verglichen mit den unbehandelten Zellen. Das Behandeln der Zellen mit 100 μM 7β,11α-Dihydroxydipterocarpol resultierte nach 24 h in einer relativen Überlebensrate der Zellen von 52 %. Dagegen überlebten nur 2,49 % der Zellen die Behandlung mit 100 μM 7β-Hydroxydipterocarpol. Deshalb wurden auch für die HeLa-Zellen die halblethale Dosis von 7β-Hydroxydipterocarpol bestimmt. Dazu wurden erneut serielle Verdünnungen hergestellt. Die halblethale Dosis (IC₅₀) von 7β-OH-D für HeLa Zellen betrug $19,05 \pm 0,628 \mu\text{M}$ (s. Abb. 5.52).

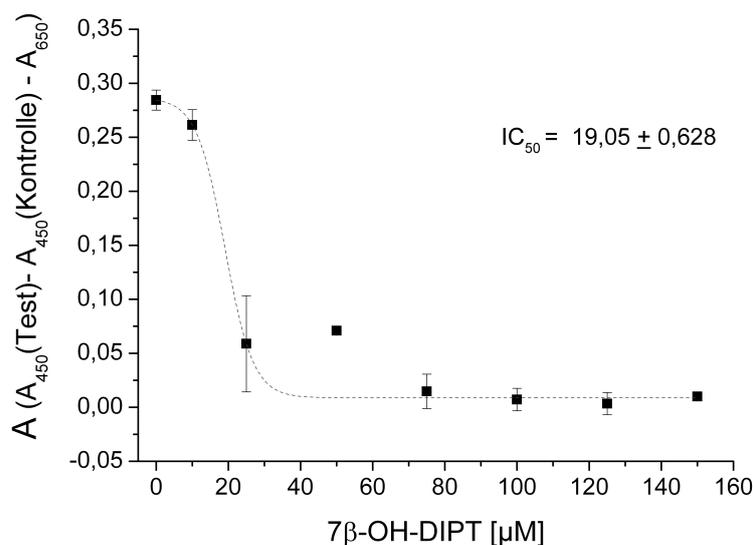


Abbildung 5.52: Zytotoxizitätstest mit HeLa Zellen zur Bestimmung der halblethalen Dosis von 7β-OH-D. 10.000 Zellen pro Vertiefung in 96-well Mikrotiterplatten ausgesät und 24 h bei 37 °C, 95 % rel. Luftfeuchte und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0 - 250 μM 7β-OH-D versetzt (DMSO jeweils 1 % (v/v)) und 24 h behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen bei 1500 g zentrifugiert, das Medium entfernt und 2 mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das XTT Reagenz zugesetzt (Gesamtkonzentration 20 % (v/v)) und die Zellen erneut 4 h bebrütet. Die Platten wurden dann im Tecan-Saphire II Platereader ausgelesen und die Absorption als Maß für die Viabilität zu $A = (A_{450}(\text{Test}) - A_{450}(\text{Kontrolle}) - A_{650}(\text{Test}))$ berechnet. Die erhaltenen Absorptionen wurden grafisch gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen und der IC₅₀-Wert durch sigmoide Regression (OriginPro8.6) mit der Boltzmann-Gleichung bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mind. 3 Messungen.

6 Diskussion

Naturstoffe besitzen eine unermessliche strukturelle Vielfalt, weshalb sie in der Arzneimittelforschung eine wichtige Rolle spielen [12]. Oftmals eignen sich Naturstoffe allerdings nicht für den direkten Einsatz als Medikament, weil ihre Wirkungen zu gering, ihre Nebenwirkungen zu hoch oder ihre Bioverfügbarkeit nicht ausreichend ist. Hinzu kommt, dass Naturstoffe oft teuer und schwer zu erhalten sind, da ihre Konzentration von der Menge, dem Alter und der Konstitution des Organismus aus dem sie stammen abhängt [17]. In der modernen Arzneimittelentwicklung gewinnen enzymatische Katalysen, zur Herstellung hochpreisiger Naturstoffe aus billigen Vorläufermolekülen oder der Derivatisierung von Leitstrukturen zur Verbesserung ihrer Bioaktivitäten, daher zunehmend an Bedeutung. Die Cytochrom P450 Multienzymfamilie hat sich für die selektive Funktionalisierung von Naturstoffen als besonders vielseitiges Werkzeug erwiesen. Einerseits sind Vertreter dieser Familie an den meisten Biosynthesewegen komplexer Naturstoffe beteiligt, andererseits bewerkstelligen sie 75 % des Phase I-Metabolismus der Leber. Dadurch können sie sowohl zur Synthese von Arzneimitteln, als auch zur Herstellung humaner Metabolite, die besonders zur Risikobewertung gebraucht werden, eingesetzt werden.

Das Hauptziel der hier vorliegenden Arbeit war die Hydroxylierung bioaktiver Naturstoffe mit CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* ATCC13368 zur Herstellung und Charakterisierung pharmazeutisch interessanter Derivate. Um diese Aufgabe zu lösen, wurde zunächst ein Screeningsystem zur Identifikation neuer Substrate für Cytochrom P450 Enzyme entwickelt, das auf einer einfachen Absorptionsmessung beruht und auf beliebige Substanzbibliotheken, unabhängig von der Struktur der Substanzen, angewendet werden kann. Mit dieser Methode konnten zwölf potentielle Substrate aus einer 502 Substanzen umfassenden Naturstoffbibliothek selektiert werden. Zusammen mit einer strukturbasierten Substratsuche konnte das Substratspektrum von CYP106A2 schließlich um sieben neue Substanzen erweitert werden. Zu ihrer Identifikation wurden ausreichende Mengen der Produkte durch Ganzzellumsatz in *B. megaterium* ATCC13368 herge-

stellt und die genaue Hydroxylierungsposition durch NMR-Analysen ermittelt. CYP106A2 wurde somit erstmalig als 7β -Hydroxylase für 3-hydroxy- Δ -Steroide (DHEA und Pregnenolon) und Dammaran-Triterpenoide charakterisiert. Zudem konnte mit $7\beta,11\alpha$ -Dihydroxydipterocarpol eine neuartige Substanz hergestellt werden, die bisher nicht beschrieben wurde. Der CYP106A2-abhängige Ganzzellumsatz wurde unter biotechnologischen Gesichtspunkten eingehender untersucht und optimiert, wodurch die Umsatzraten bzw. Produktausbeuten der Reaktionen mit DHEA bzw. Dipterocarpol deutlich gesteigert werden konnten. Erste Analysen hinsichtlich potentieller Wirkungsweisen der hergestellten Reaktionsprodukte wurden durch *in vitro* Zytotoxizitätsmessungen an zwei Säugerzelllinien durchgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse und die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollen im Folgenden diskutiert und ein Ausblick auf ihre mögliche biotechnologische Bedeutung gegeben werden.

6.1 Identifizierung neuer Substrate für CYP106A2

Im ersten Teil der Arbeit stand die Entwicklung eines Screeningsystems zur Identifizierung neuer Substrate für CYP106A2 im Mittelpunkt. Naturstoffbibliotheken können prinzipiell mit verschiedenen analytischen Verfahren untersucht werden. LC-MS-, MS-MS- oder GC-MS- Verfahren sind zum Aufspüren hydroxylierter Reaktionsprodukte prinzipiell gut geeignet. Umspannt die Substanzbibliothek, wie im Falle der hier verwendeten Biomol-Naturstoffbibliothek, ein breites Spektrum von Molekülmassen (von unter 100 bis über 1000 g/mol), so sind massenspektrometrische Analysen im Screeningmaßstab allerdings nicht mehr mit ausreichender Sensitivität einsetzbar. Zum Einen, weil einzelne Massen nicht mehr einwandfrei erfaßt werden können, zum anderen können oxidierte hochmolekulare Substanzen mit klassischen Methoden schlecht ionisiert werden. Zudem stellt die chromatographische Trennung von Substanzen, die sich in ihrer Lipophilie stark unterscheiden, eine besondere Herausforderung dar, insbesondere, wenn die angestrebte Analysezeit nicht mehr als fünf Minuten beträgt. Weitere Nachteile, die gegen den Einsatz chromatographischer Methoden sprechen, sind die aufwendige Probenvorbereitung und

vergleichsweise lange Analysezeiten mit ca. fünf Minuten pro Probe bei einer HPLC-Analyse, entgegen einer Messzeit von fünf Minuten für eine Absorptionsmessung einer kompletten 96-well-Platte im Plattenlesegerät. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zwei spektralfotometrische Analysemethoden in 96-well Mikrotiterplatten auf ihr Potential zum Screenen einer komplexen Naturstoffbibliothek mit einem P450 untersucht.

6.1.1 NADPH-Verbrauch als Screeningmethode

NADPH wird bei der P450 katalysierten Reaktion in stöchiometrischen Mengen verbraucht (s. Abb. 3.5). Da NADPH im Gegensatz zu seiner oxidierten Form NADP^+ ein spezifisches Absorptionsmaximum bei 340 nm besitzt, lässt sich die Abnahme von NADPH in einer Lösung leicht fotometrisch verfolgen. Das Absorptionsmaximum liegt mit 340 nm zudem im nahen UV-Bereich. Dadurch lässt sich die Messung problemlos in kostengünstigen Polystyrol-Mikrotiterplatten durchführen, was durch Messung der Absorption in Abhängigkeit von der NADPH-Konzentration belegt werden konnte (s. Abb. 5.1).

Die Idee, die NADPH-Abnahme zur Untersuchung der P450 Enzymreaktion zu verwenden, ist nicht neu. Allerdings stellt ihre Anwendung als Screeningmethode eine besondere Herausforderung dar, da Elektronen an verschiedenen Stellen „abfließen“ können, was die Gleichsetzung von NADPH-Abnahme und Produktzunahme erschwert. Hanukoglu et al. stellten bereits 1993 fest, dass auf dem Weg von NADPH zu CYP11A1 über AdR und Adx Elektronen abfließen. Sie konnten zeigen, dass die AdR selbst bereits in der Lage ist, Sauerstoff zu so genannten ROS (reactive oxygen species) zu oxidieren, wobei die Oxidationsrate sehr gering ist. Das AdR-Adx-System zeigte dagegen eine deutlich höhere Oxidationsrate ($V_{\max} = 3,5 \mu\text{M e}^-/\text{min}$) als AdR allein und das vollständige System aus AdR-Adx-P450_{sc} wies die höchste Leckage im Elektronenfluss auf ($V_{\max} = 7,8 \mu\text{M e}^-/\text{min}$) [96]. Die Autooxidation von NADPH in Lösungen könnte die Messung ebenfalls stören. Zhang et al. zeigten aber, dass diese im untersuchten Zeitraum, selbst in Anwesenheit von Zelllysaten, nahe null ist [97]. Durch Messung des NADPH-Verbrauches oh-

ne Zugabe von Substrat zum rekonstituierten Enzymsystem sollte der Einfluss der „Elektronen-Leckagen“ untersucht werden. Die NADPH-Abnahme ohne Enzymreaktion (ohne Substratzugabe) betrug in diesem Ansatz nach 30 Minuten rund 40 %. Zuletzt können noch die eingangs beschriebenen Entkopplungsreaktionen eine Rolle spielen (s. Abschnitt 3.2.2), diese sind jedoch von der Natur des Substrats abhängig und müssen gegebenenfalls im Einzelfall untersucht werden.

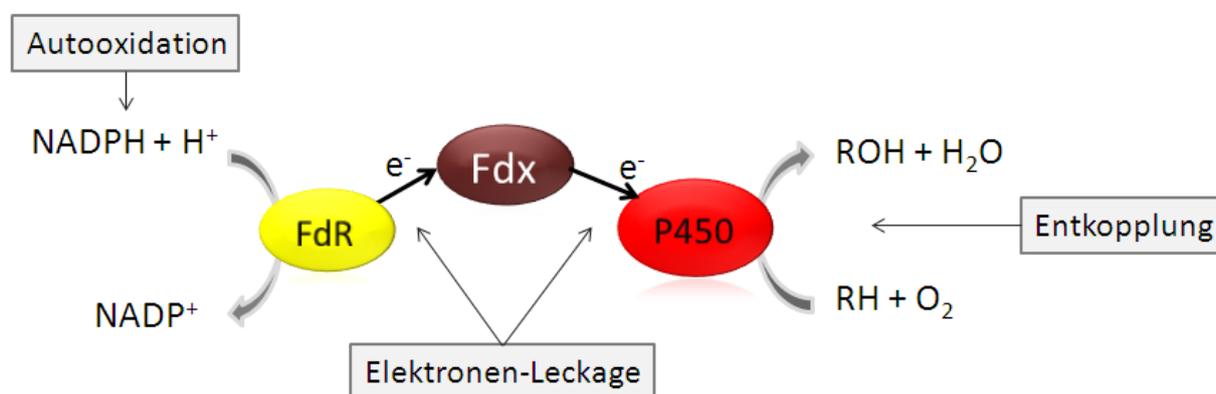


Abbildung 6.1: P450-Enzymsystem der bakteriellen Klasse I: Mögliche Stellen an denen NADPH unabhängig von der Produktbildung verbraucht werden kann: Autooxidation des NADPH, Elektronen-Leckage bei der Übertragung via FdR und Fdx, Entkopplung der P450 Reaktion unter Bildung von H₂O und Verbrauch zweier Moleküle NADPH.

Die Anwendbarkeit des NADPH-Verbrauchs als Screeningmethode für die vorliegende Naturstoffbibliothek sollte durch ein Test-Screening geprüft werden. Es konnte gezeigt werden, dass, die NADPH Abnahme, wie erwartet, in Anwesenheit des Substrates 11-Desoxycorticosteron deutlich gegenüber den Kontrollen beschleunigt ist. In diesem Versuch diente DHEA als Negativkontrolle, da es bereits von Berg in den 1970er Jahren negativ auf Aktivität mit CYP106A2 getestet worden war und darüber hinaus postuliert wurde, dass lediglich 3-oxo- Δ -4-Steroide nicht aber 3-hydroxy- Δ -5-Steroide von CYP106A2 umgesetzt werden [61, 62, 60]. Jedoch ergab der Versuch, dass der NADPH-Verbrauch von CYP106A2 durch Zugabe von DHEA stark ansteigt (s. Abb. 5.5). Zunächst wurde angenommen, dass die Bindung von DHEA letztlich zu einer Entkopplung führt. Im weiteren Verlauf konnte jedoch die Bildung von CYP106A2 abhängigen DHEA-

Hydroxylierungsprodukten *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Die Hauptprodukte der Reaktion wurden als 7β -Hydroxy- und 7α -Hydroxydehydroepiandrosteron identifiziert. Damit konnte die von Berg einst aufgestellte Hypothese, dass 3-hydroxy- Δ -5-Steroide keine Substrate von CYP106A2 darstellen, eindeutig widerlegt werden.

Zum Screening der Biomol-Naturstoffbibliothek erwies sich die Messung des NADPH-Verbrauchs allerdings als ungeeignet. Reproduzierbare Ergebnisse wurden nur bei Einsatz von hohen Substratkonzentrationen ($300 \mu\text{M}$) erzielt und daher für nicht praktikabel befunden. Diese Problematik wurde bereits in der Vergangenheit aufgezeigt und konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht behoben werden. Beispielsweise verwendeten Tsotsou et al. den NADPH-Verbrauch ebenfalls zur Identifizierung neuer Substrate und schlossen auch seine Anwendung im Hochdurchsatzverfahren nicht aus [98]. Obgleich sie das selbständige CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* verwendeten, welches sich durch für P450-Enzyme außergewöhnlich hohe Umsatzgeschwindigkeiten und eine starke Kopplung auszeichnet [99] und somit lediglich eine Hintergrundabnahme von zwei und fünf Prozent beobachteten, wurden in diesen Arbeiten ebenfalls recht hohe Substratkonzentrationen (zwischen 200 und $20000 \mu\text{M}$) eingesetzt, um das Screening durchführen zu können [98, 100].

6.1.2 Differenzspektroskopie als Screeningmethode

Zur Alternative wurde die Differenzspektroskopie als Screeningmethode untersucht. Bei den meisten P450-Enzymen führt die Bindung eines Substrates dazu, dass der HS-Anteil des Enzyms erhöht wird. Der LS zu HS Übergang geht mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 417 zu 380 - 390 nm einher, die sich am besten durch Aufnahme von Differenzspektren messen lässt. Ein großer Vorteil der Differenzspektroskopie zur Identifikation neuer Substrate ist, dass sie gegenüber klassischen analytischen Methoden einfacher in ihrer Durchführung ist. Man benötigt lediglich gereinigtes Enzym und die zu testende Substanz. Man ist weder auf die Elektronentransferpartner noch auf den teuren Kofaktor NADPH oder eine aufwendige Analytik

angewiesen, um die Bindung einer Substanz im aktiven Zentrum nachzuweisen. Problematisch kann es sein, wenn das entsprechende P450 zu geringe Expressionsraten aufweist, da verhältnismäßig große Mengen Enzym verbraucht werden. Zur Ermittlung der optimalen Screeningparameter wurden verschiedene Konzentrationen P450 gegen verschiedene Substratkonzentrationen getestet. Die besten Ergebnisse wurden schließlich mit 5 μM CYP106A2 und 5 μM Testsubstanz erreicht (s. Abb. 5.7). Umgerechnet werden für das Screening der Biomol-Naturstoffbibliothek demnach mindestens rund 620 nmol Enzym benötigt. Mit CYP106A2 können in *E. coli* Ausbeuten bis zu 1000 nmol/l Kultur erreicht werden [68]. Der vielleicht entscheidendste Vorteil der Differenzspektroskopie als Screeningmethode ist, dass sich das Dissoziationsgleichgewicht sobald es sich eingestellt hat bei gleichbleibenden Temperatur- und Druckverhältnissen nicht mehr ändert. Im Gegensatz zur NADPH-Messung wird kein Verbrauch dargestellt, der möglichst zu Beginn der Enzymreaktion aufgezeichnet werden muss, sondern es werden Endpunktmessungen durchgeführt, die eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ermöglichen.

Zu Beginn der Arbeit waren nur wenige Typ I-Substrate von CYP106A2 bekannt. Die meisten durch CYP106A2 umgesetzten Verbindungen sind C19- bzw. C21-Steroide (Androstendion, Progesteron, 11-Desoxycorticosteron, Testosteron etc.), die anscheinend nicht in der Lage sind, das Wasser als sechsten Liganden des Häm-Eisens zu verdrängen. Bleif zeigte in ihrer Diplomarbeit 2007, dass neben dem bis dato einzigen HS-Substrat Cholestenon auch Di- und Triterpenoide wie die Dihydrochinonpimarsäure, die 11-Ketoboswelliasäure und die Acetylketoboswelliasäure in der Lage sind, einen HS-Shift zu induzieren [77]. Die Identifizierung der Dihydrochinonpimarsäure als HS-Substrat gelang dabei ebenfalls durch Anwendung der Differenzspektroskopie im Screeningmaßstab. Anschließend identifizierte Bleif weiterhin die Betulinsäure, Oleanolsäure, Ursolsäure und Glycyrrhetinsäure als HS-Substrate des Enzyms [78]. Interessanterweise wies sie auch einen HS-Shift mit dem C19-Steroid 19-Hydroxy-4-androsten-3,17-dion nach. In dieser Arbeit konnte bei den Voruntersuchungen zum Screening festgestellt werden, dass auch 11-Desoxycorticosteron einen Teil des CYP106A2 den HS-Zustand überführt. Unter Screeningbe-

dingungen wurde ein HS-Anteil von 10 % in Anwesenheit von 11-Desoxycorticosteron gemessen.

Das Screenen der Biomol-Naturstoffbibliothek mittels Differenzspektroskopie ergab zwölf Treffer (s. Abb. 5.9, 6.2). Unter diesen befanden sich vier bereits als Substrate bekannte Tri-terpensäuren; Oleanolsäure, Ursolsäure, Glycyrrhetinsäure und Betulinsäure sowie weitere acht Substanzen, die bisher nicht als Liganden des CYP106A2 beschrieben wurden; Noscaphin, Alpha-apo-oxytetracyclin, Panaxadiol, Sarsasapogenin, Betulin, Dipterocarpol, Rhamnetin und Geraldol. Diese Treffer konnten durch Kontrollmessungen im Zweistrahlphotometer bestätigt werden (s. Abb. 5.10).

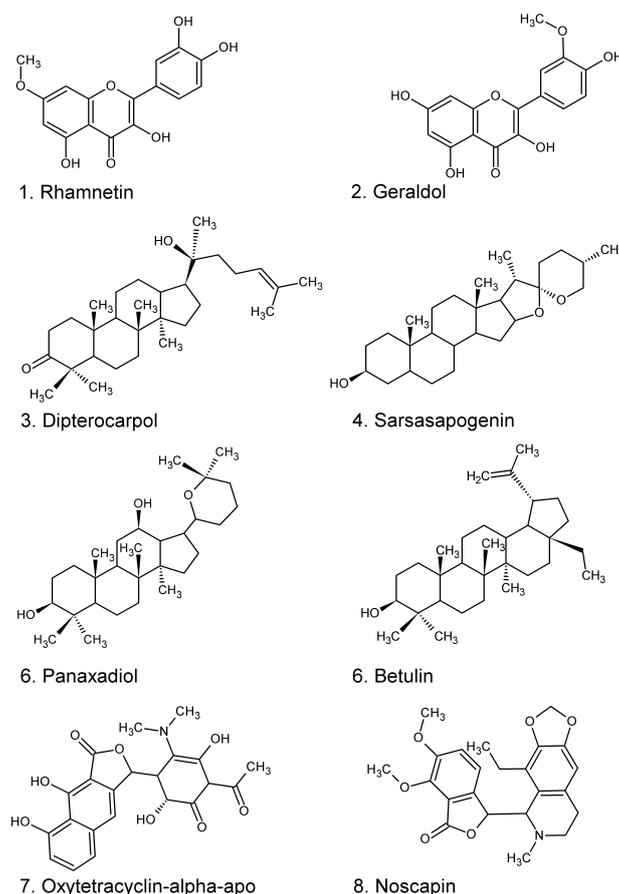


Abbildung 6.2: Strukturen der aus dem Screening der Naturstoffbibliothek hervorgegangenen Treffer.

Insgesamt stellte sich die etablierte Methode der Differenzspektroskopie als robuste und sen-

sitive Screeningmethode zur Identifizierung potentieller Cytochrom-P450-Substrate aus einer strukturell diversen Naturstoffbibliothek dar. Sie konnte auch bereits erfolgreich mit anderen P450 Enzymen unserer Arbeitsgruppe verwendet werden [101]. Durch das Screening wurden erstmalig Substanzen identifiziert, die bei CYP106A2 einen HS-Shift induzieren und nicht zu den Triterpenoiden oder Steroiden gehören. Wie etwa das Alkaloid Noscapin; ein Morphinderivat, welches als Hustenmittel eingesetzt wird und Alpha-apo-oxytetracyclin; ein Abbauprodukt des in der Schweinemast verwendeten Oxytetracyclins [102, 103, 104, 105, 106]. Zudem die beiden Isoflavonoide Rhamnetin und Geraldol, die zu den Pflanzenfarbstoffen gehören, denen generell antioxidative und antiinflammatorische Wirkungen zugesprochen werden [107]. Leider konnte keine dieser Verbindungen von CYP106A2 in hydroxylierte Produkte überführt werden. Im Rahmen des bekannten Substratspektrums von CYP106A2 - Di-, Triterpenoide und Steroide- wurden vier neue Substanzen, die einen HS-Shift induzieren, gefunden; Betulin, Dipterocarpol, Sarsasapogenin und Panaxadiol. Panaxadiol und Sarsasapogenin konnten nicht in hydroxylierte Produkte überführt werden. Betulin reagierte mit CYP106A2 zu einem, Dipterocarpol zu fünf Reaktionsprodukten, von denen die beiden Hauptprodukte mittels NMR als 7β -OH-D und $7\beta,11\alpha$ -OH-D identifiziert werden konnten. Es drängt sich die Frage auf, warum einige Substanzen, obwohl sie im aktiven Zentrum von CYP106A2 binden und einen HS-Shift induzieren, nicht durch CYP106A2 hydroxyliert wurden. Eine mögliche Erklärung könnten Redoxpotentialuntersuchungen liefern. Die Bindung einer Substanz im aktiven Zentrum an sich reicht zur Katalyse durch P450s nicht aus. Es bedarf in jedem Falle der Übertragung zweier Elektronen auf das Häm-Eisen, damit ein Sauerstoffatom in das Substrat eingebaut werden kann. In der Regel geht der Spin-Crossover von LS nach HS mit einer Erhöhung des Redoxpotentials von P450 Enzymen um bis zu 300 mV einher. Damit wird die Reduktion durch die CPR oder das Fdx erleichtert und die Elektronen können von NAD(P)H auf das Enzym *fließen*. Colas et al. zeigten mittels zyklischer Voltametrie, dass die Bindung von Cholestenon das apparente Redoxpotential von CYP106A2 $E^{0'}$ von -128 mV auf -94 mV erhöht. Jedoch beträgt das apparente Redoxpotential nach Bin-

ung von 11-Desoxycorticosteron $E^{0'} -124$ mV, bleibt also nahezu unverändert. Dennoch ist 11-Desoxycorticosteron ein gutes Substrat von CYP106A2. Es ist daher nicht anzunehmen, dass das Redoxpotential der entscheidende Faktor ist.

Eine andere Erklärung ist, dass diese Substanzen, obgleich sie im aktiven Zentrum nahe dem Häm-Eisen positioniert werden, diesem keinen Angriffspunkt für eine Hydroxylierung bieten. Bisher ist keine Hydroxylierung einer Doppelbindung durch CYP106A2 beschrieben. Betrachtet man die nicht umgesetzten Substanzen aus dem Screening unter dieser Prämisse, so fällt auf, dass die beiden Flavonoide Rhamnetin und Geraldol keine Position besitzen, die durch CYP106A2 hydroxyliert werden könnte, da alle Positionen durch Doppelbindungen besetzt sind. Ähnlich ist die Situation bei Alpha-apo-oxytetracyclin und Noscadin, auch hier ist die Elektronendichte in den Ringen sehr hoch. Die Stellen, die von keiner Doppelbindung flankiert werden, tragen stark elektronenziehende Gruppen. Für Noscadin ergibt sich eine mögliche Stelle, die hydroxyliert werden könnte, diese ist aber wahrscheinlich nicht nahe genug über dem Häm platziert. Anders sieht es bei Panaxadiol und Sarsasapogenin aus, hier ist vermutlich das Fehlen einer Ketogruppe verantwortlich dafür, dass diese Substanzen nicht nahe genug über dem Häm positioniert werden und deshalb keine Katalyse stattfindet. In Ermangelung einer Kristallstruktur ist es aber derzeit nicht möglich diese Annahmen durch bioinformatische Methoden zu belegen.

6.1.3 Rationale Substratsuche

Dem Screening der Naturstoffbibliothek wurde eine rationale Substratsuche nachgestellt, um mögliche, strukturell ähnliche Substrate, die keinen HS-Shift induzieren, aufzuspüren. Dazu wurde lediglich eine kleine Auswahl an Substanzen getroffen, die direkt im *in vitro* rekonstituierten System mit CYP106A2 untersucht wurden. Ausgewählt wurden steroidale Substanzen und Triterpene, welche sich von den bereits identifizierten Substraten durch verschiedene Hydroxylierungspositionen bzw. lediglich in den Resten unterscheiden, die nach bisherigem Kenntnisstand keinen Einfluss auf die Reaktivität des Enzyms nehmen. Darunter fallen insbesondere die Substituenten

am D-Ring. Betrachtet man Testosteron, Progesteron und Dipterocarpol, so tragen diese am D-Ring unterschiedlich lange Substituenten mit unterschiedlicher Lipophilie. Die Seitenkette von Dipterocarpol ist mit acht C-Atomen verhältnismäßig lang und mit nur einer Hydroxylgruppe an Position 20 auch stark lipophil. Während Progesteron eine kurze und wesentlich polarere Acetylgruppe und Testosteron lediglich eine Ketogruppe am D-Ring an Position 17 besitzt. Die in fast allen Steroiden vorkommende Methylgruppe an C-18 ist in Dipterocarpol nicht vorhanden. Zusätzliche Ringe (E, F) scheinen die Umsetzung bzw. die Bindung ebenfalls nicht zu behindern. Lediglich heterozyklische Substituenten mit hohen Elektronendichten (s. Gitoxigenin, Bufalin) bzw. stickstoffhaltige Substituenten (Solanidin, Solasodin) scheinen sich negativ auszuwirken. Die von Bleif beschriebenen pentazyklischen Triterpensäuren besitzen im Gegensatz zu den Steroiden alle einen zusätzlichen E-Ring. Sarsasapogenin besteht gar aus sechs Ringen (A-F) und wird dennoch im aktiven Zentrum gebunden, auch wenn eine Hydroxylierung dieser Substanz bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Durch die rationale Substratsuche gelang die Identifizierung weiterer Substrate für CYP106A2 nämlich Pregnenolon, Prednison, Dexamethason und Digitoxigenin.

6.1.4 Zusammenfassung Substratsuche

Insgesamt gelang es durch Kombination von Screening und rationaler Suche sieben neue Substrate für CYP106A2 zu erschließen. Damit sind nun insgesamt 28 Substrate für CYP106A2 beschrieben, von denen 12 einen HS-Shift induzieren (s. Tab. 7.9). Die gefundenen Substrate besitzen einen steroidal- oder triterpenoiden Grundkörper, wie es für die meisten bekannten CYP106A2-Substrate der Fall ist. Abbildung 6.3 zeigt die aus allen bisher bekannten Substraten abgeleitete Minimalstruktur, die für eine erfolgreiche Katalyse erforderlich zu sein scheint. In Abbildung 6.4 sind einige ausgewählte Substrate aufgeführt; Testosteron (1), DHEA (2), Pregnenolon (3), 11-Keto- β -Boswelliasäure (4), Dipterocarpol (5) und Abietinsäure (6). Diesen sind strukturell ähnliche Moleküle gegenübergestellt, die nicht mit CYP106A2 zu hydroxylierten

Produkten reagieren; Nootkaton (7), Coumarin (8), Estron (9), Estradiol (10), Cholesterol (11), Sarsasapogenin (12), Panaxadiol (13). Möglicherweise sind Mono-, Sesquiterpene und Coumarine zu klein, um nahe genug über dem Häm positioniert zu werden, so dass keine Hydroxylierung stattfinden kann. Die Tatsache, dass Estron und Estradiol, im Gegensatz zu ihren Vorläufern, nicht umgesetzt werden, deutet darauf hin, dass die Elektronendichte im A-Ring einen negativen Einfluss auf die Reaktion haben könnte. Ihnen fehlt aber auch die β -ständige C-19 Methylgruppe am C-9. Hochinteressant ist, dass obwohl sich Cholestenon und Cholesterol nur im Oxidationszustand des Sauerstoffatoms an C-3 und der Stellung der Doppelbindung unterscheiden, Cholestenon sowohl einen HS-Shift induziert und zugleich als Substrat fungiert, während für Cholesterol bisher weder eine Bindung, noch ein HS-Shift oder ein aus der Reaktion mit CYP106A2 stammendes Hydroxylierungsprodukt nachgewiesen werden konnte. Betrachtet man die bisher beschriebenen Substrate für CYP106A2, so sticht die Tatsache hervor, dass alle, wenngleich an unterschiedlicher Position, eine Ketogruppe tragen. Möglicherweise ist die Interaktion einer Ketogruppe mit einem Wasserstoffbrückenbindungsdonor im aktiven Zentrum, wie beispielsweise Threonin oder Glutaminsäure für die Katalyse entscheidend. So konnte Bleif 2012 anhand von Dockinganalysen zeigen, dass das Threonin T89 mit der 17β -OH-Gruppe des Substrates 17-Methyltestosteron potentiell über eine Wasserstoffbrückenbindung interagiert, während das Glutamat E78 mit der C-3 Ketogruppe ebenfalls über eine Wasserstoffbrückenbindung wechselwirkt. Fehlt diese Ketofunktion, so kann dies mit einer Instabilisierung der Bindung im aktiven Zentrum einhergehen, die den Verlust der Hydroxylierungsaktivität erklärt.

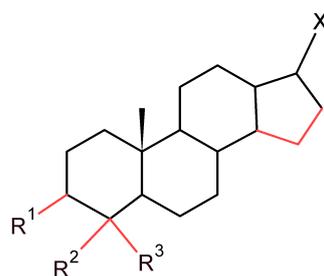


Abbildung 6.3: Aus den bisher bekannten CYP106A2-Substraten ableitbare Grundstruktur. Die Substituenten am D-Ring (X) können unterschiedliche Größe und Hydrophobizität besitzen, lediglich heterozyklische Reste mit hoher Elektronendichte scheinen die Reaktivität negativ zu beeinflussen. Die variablen Regionen sind in rot dargestellt. R₁ = -H, -OH, -COOH, =O, -CHO; R₂ = -H, -CH₃, -COOH; R₃ = -H, -CH₃, -COOH

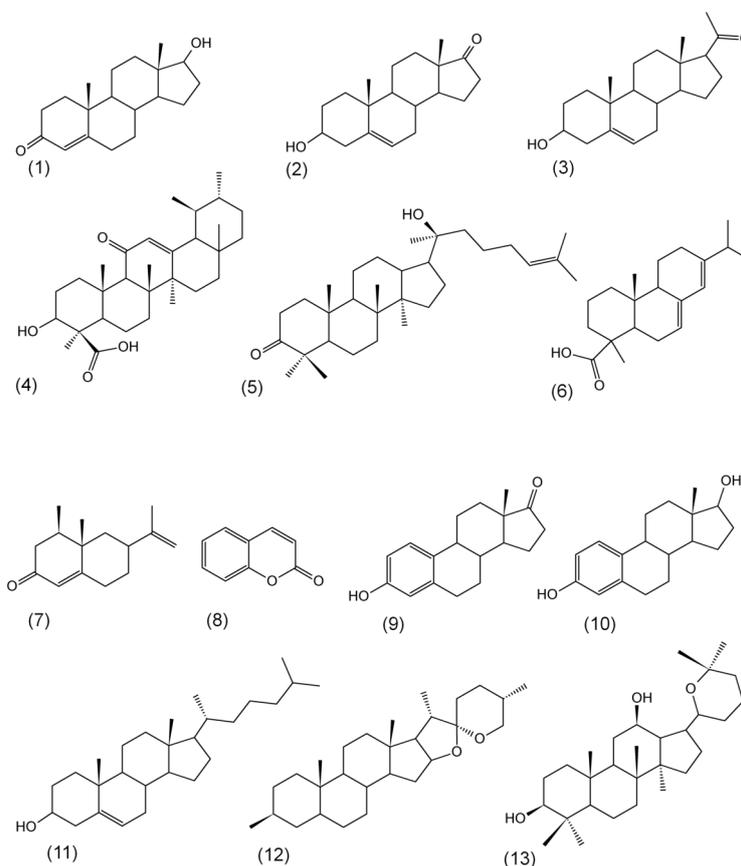


Abbildung 6.4: Einige Ausgewählte Substrate von CYP106A2. Auffallend ist, dass alle, obgleich an unterschiedlicher Position, eine Ketogruppe tragen. Testosteron (1), DHEA (2), Pregnenolon (3), 11-Keto-β-Boswelliasäure (4), Dipterocarpol (5), Abietinsäure (6). Im Vergleich sind exemplarisch einige Substanzen aufgeführt, die bisher nicht durch CYP106A2 in hydroxylierte Produkte überführt werden konnten; Nootkaton (7), Coumarin (8), Estron (9), Estradiol (10), Cholesterol (11), Sarsasapogenin (12), Panaxadiol (13).

6.2 Produktcharakterisierung und Biokatalyse

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die Reaktionsprodukte der neu identifizierten Substrate identifiziert und die Reaktion auf ihr biotechnologisches beziehungsweise pharmazeutisches Potential untersucht werden. Zur präparativen Herstellung der Reaktionsprodukte wurden Ganzzellbiokatalysen durchgeführt. Verwendet wurde dazu der CYP106A2-Wirtsstamm *Bacillus megaterium* ATCC1336. Bereits in den 50er Jahren konnte dieser Stamm zur Umsetzung von Progesteron eingesetzt werden [59]. Nachfolgende Arbeiten von Berg et. al zeigten, dass die Expression von CYP106A2 erst nach Eintritt der Kultur in die stationäre Phase beginnt und nach ca. 10-stündiger Kultivierungsdauer ihr Maximum erreicht. Rauschenbach klonierte Jahre später das Gen für CYP106A2 und stellte einen Knockout-Stamm CYP106A2 her, der nicht mehr in der Lage ist, das Enzym zu synthetisieren. In unserer Arbeitsgruppe gelang erst kürzlich die erfolgreiche Umsetzung der Diterpensäure Abietinsäure mit *B. megaterium* ATCC13368. Bleif und Kleser zeigten in ihren Arbeiten, dass das grampositive *B. megaterium* lipophile und hochoxidierte Substanzen mittlerer Polarität, wie etwa Triterpensäuren und Sulfonylharnstoffe, besser aufzunehmen scheint als das gramnegative *E. coli* [80, 108]. Bleif konnte in ihren Arbeiten auch zeigen, dass das Steroid 17α -Methyltestosteron von *B. megaterium* ATCC13368 wesentlich schneller als von *E. coli*-Zellen umgesetzt wird. *B. megaterium* vermochte $500\ \mu\text{M}$ 17α -Methyltestosteron in 24 h vollständig zu metabolisieren, während nach Reaktion mit CYP106A2 in *E. coli* nur 45 % Umsatz innerhalb von 48 h erreicht wurden [78]. Mutmaßlich gelingt es oxidierten Triterpenoiden besser in die Zelle einzudringen, wenn keine äußere Membran vorhanden ist. Es könnten aber auch Transporter, wie etwa ABC-Transporter, die niedermolekularen Verbindungen verhältnismäßig unselektiv Einlass in die Zelle gewähren, eine Rolle spielen. So konnte kürzlich die Umsetzung von Limonen, aber auch längerer Kohlenwasserstoffe wie Octanol und Dodecanol, um ein Vielfaches durch die Überexpression des Membranproteins AlkL in *E. coli* bewerkstelligt werden. Dieses Protein, das in der äußeren Membran verankert wird, erleichtert vermutlich den Transport der Substrate in die Zelle [109]. Vergleichbare Ergebnisse könnten auch in *B. megateri-*

um durch Identifizierung und Überexpression eines Membrantransporters durchgeführt werden, so dass die Verfügbarkeit der Substrate letztlich die Umsetzung im Biokatalysator nicht mehr limitiert. In dieser Arbeit wurden aus oben genannten Gründen ausschließlich *B. megaterium* Zellen für die Ganzzellbiokatalysen verwendet.

6.2.1 Identifizierung der Reaktionsprodukte

Prednison, Digitoxigenin, Betulin, Dipterocarpol, DHEA und Pregnenolon reagierten mit *B. megaterium* ATCC13368 zu potentiell hydroxylierten Reaktionsprodukten (s. Abschnitt 3.3). Die Produktmengen von Prednison, Digitoxigenin und Betulin waren für eine NMR-Analyse nicht ausreichend. Das liegt vor allem in der starken Nebenproduktbildung begründet, die zumindest teilweise aus ihren Reaktionen mit weiteren Enzymen der Bacillus-Zellen - neben CYP106A2 - entstammen. Wahrscheinlich reagiert Betulin mit einer Dehydrogenase und wird von dieser an Position C-3 oxidiert. Diese Vermutung liegt nahe, weil Kouzi et al. diese Reaktion bereits für die Betulinsäure nachweisen konnten, die von ATCC13368 zu Betulonsäure oxidiert wird [90]. Da eine eindeutige Abtrennung der CYP106A2-abhängigen Reaktionsprodukte nicht möglich war, zudem die Produktmengen zur Bestimmung der Hydroxylierungsposition nicht ausreichten, wurden diese Substrate in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Pregnenolon ist ein Vorläufermolekül der Steroidhormone. Pregnenolon wird in Säugerzellen aus Cholesterol durch die Abspaltung der Isopropylseitenkette durch das Enzym CYP11A1 gebildet. Diese Reaktion stellt den initialen Schritt der Steroidhormonbiosynthese dar. Zudem wird Pregnenolon zu den Neurosteroiden gezählt und derzeit in Hinsicht auf eine Behandlung der Schizophrenie erforscht [110]. Die *in vivo* Umsetzung von Pregnenolon mit CYP106A2 führte zu zwei Reaktionsprodukten, von denen eines (R_F (HE/EE 1/1) = 0,19) als 7β -Hydroxypregnenolon identifiziert wurde. Das zweite Reaktionsprodukt konnte nicht in ausreichender Menge und Reinheit für eine NMR-Analyse gewonnen werden, ist aber mutmaßlich das α -Stereoisomer, in Analogie zu den DHEA-Produkten. Sieben-oxygenierte Steroide und Sterole sind in der Natur weit

verbreitet und vor allem in Säugern, Vögeln, Fischen und Pflanzen zu finden. Die hepatische 7α -Hydroxylierung von Cholesterol stellt beispielsweise den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Gallensäuresynthese dar [111]. Lange war die gängige wissenschaftliche Meinung, dass Hydroxylierungen an der Position 7 lediglich zur Ausscheidung der Steroide dienen. Dann wurden 7-Hydroxylierungen zunehmend auch in extra-hepatischen Geweben beschrieben, woraus man schloss, dass 7-hydroxylierte Steroide vielleicht nicht nur reine Abbauprodukte darstellen. Eines der interessantesten Gewebe, dem eine 7-Hydroxylase-Funktion nachgewiesen werden kann, ist das Gehirn [112]. Doostzadeh et al. wiesen 1996 die 7β -Hydroxylierung von Pregnenolon mit rekombinant in Hefe exprimiertem CYP1A2 sowie nach Interaktion mit Mikrosomen aus Mäusehirnen nach [113].

Der in der vorliegenden Arbeit Pregnenolonumsatz war ausreichend für NMR-Analysen, lag aber hinter den Umsatzraten von Dipterocarpol und vor allem DHEA weit zurück. Weiterführende Arbeiten sollten daher die Optimierung der Pregnenolonumsetzung mit *B. megaterium* beinhalten. Ansatzpunkte hierzu, die im Folgenden für DHEA und Dipterocarpol untersucht wurden, sind die Nutzung des von Bleif konstruierten Expressionsstammes und die Erfolge, die durch die Umsetzung mit ruhenden Zellen und die Fütterungsumsätze erzielt werden konnten (s. u.).

Dehydroepiandrosteron (DHEA) et al. wurde von *B. megaterium* ebenfalls in ein Haupt- und ein Nebenprodukt (R_f (EE) = 0,41 bzw 0,29) überführt, die als die beiden Stereoisomere 7β -OH-DHEA und 7α -OH-DHEA identifiziert werden konnten (s. Abschnitt 5.2.3). 7α -OH-DHEA ist eines der Hauptstoffwechselprodukte von DHEA in der Leber und extrahepatischen Geweben, insbesondere im Gehirn. Die 7α -Hydroxylierung im Gehirn und in der Leberwerde von CYP7B1 katalysiert. Fehlregulationen in der Expression dieses Enzyms werden mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson in Zusammenhang gebracht. Bisher ist im Menschen kein Enzym bekannt, welches die 7β -Hydroxylierung von DHEA katalysiert. Es konnte aber gezeigt werden, dass die 11β -Hydroxysteroiddehydrogenase

Typ I (11 β HSD1) die Umlagerung von 7 α zu 7 β -OH-DHEA über das 7 α -Oxo-Intermediat vermittelt [114, 115]. Die 7-Hydroxy-DHEA-Derivate werden in dem Zusammenhang als kompetitive Inhibitoren der 11 β HSD1 diskutiert. Möglicherweise wird neben dem Gleichgewicht von Cortison und Cortisol auch das von 7 α - und 7 β -OH-DHEA über die Aktivität der 11 β -HSD1 reguliert. Hennebert et al. untersuchten 2007 die Expression von CYP7B1 und 11 β HSD1 und die Bildung von 7 β - und 7 α -OH-DHEA in der Haut. Es gelang ihnen zu zeigen, dass beide Stereoisomere sowohl Substrate als auch kompetitive Inhibitoren des Enzyms darstellen, wobei 7 β -OH-DHEA mit einem K_i von $0,244 \pm 0,005 \mu\text{M}$ eine ca. fünfmal stärkere inhibitorische Wirkung als das α -Stereoisomer aufweist [116]. Die normalen zellulären Spiegel von 7-hydroxylierten DHEA-Spezies sind etwa dreimal geringer als die von Cortisol bzw. Cortison. Daher spielen die beschriebenen Effekte unter normalen physiologischen Bedingungen zunächst keine Rolle. Erst im Falle einer Entzündung kommen sie durch die Interleukin 1 β induzierte Erhöhung der 7 α -OH-DHEA-Konzentration, infolge einer vermehrten CYP7B1-Expression, zum Tragen [117]. Eine mögliche praktische Anwendung zeigten Pelissier et al., die 2006 bei Ratten nachwiesen, dass die Gabe von DHEA bzw. 7 α -OH-DHEA die Ausbildung von Dextranatriumsulfat induzierter Colitis hemmt, indem die durch oxidativen Stress bewirkte Schädigung von Proteinen und die Peroxidation von Fetten nachweislich verringert wird [118].

In der Zwischenzeit sind über die immunmodulatorischen Wirkungen hinaus unterschiedliche potentielle physiologische Bedeutungen 7-hydroxylierter Pregnenolon- und DHEA-Spezies beschrieben. Beispielweise wiesen Bicikova et al. 2011 verringerte 7 α -OH-DHEA-Mengen und erhöhte Autoantikörpermengen gegen die Thyroid-Peroxidase in Patienten nach, die an Schizophrenie leiden [119]. Duskova et al. beschrieben im gleichen Jahr, dass die Konzentrationen der 7-hydroxylierten Steroidspezies (DHEA, Pregnenolon) im Gegensatz zu ihren respektiven Vorläufern bei Frauen im Verlauf der Menstruation schwanken und in der lutealen Phase, in der Frauen vermehrt zu Stimmungsschwankungen neigen, signifikant verringert sind [120]. Sedlackova veröffentlichten 2012 eine Studie, die Hinweise darauf liefert, dass die Fettleibigkeit bei Jungen

mit einer Erhöhung der 7α -OH-DHEA Konzentration einhergeht. Die Studie liefert allerdings keine Aussage, ob die Fettleibigkeit den Anstieg der 7α -OH-DHEA Konzentration verursacht oder die hohe 7α -OH-DHEA Konzentration Fettleibigkeit begünstigt. Keine Änderung der 7α -OH-DHEA Konzentration konnte bei fettleibigen Mädchen festgestellt werden [121].

Die Umsetzung von **Dipterocarpol** resultierte in der Bildung von zwei Hauptprodukten (R_f 0,6; 0,214) und vier Nebenprodukten (R_f 0,4; 0,38; 0,142 und 0,00285) (s. Abschnitt 5.2.2). Die beiden Hauptprodukte konnten mittels NMR als 7β -Hydroxydipterocarpol und $7\beta,11\alpha$ -Dihydroxydipterocarpol identifiziert werden. Bei der Reaktion wurden noch drei weitere Nebenprodukte gebildet (33 % der Gesamtreaktion), die jedoch nicht in ausreichender Menge und Reinheit für eine NMR-Analyse gewonnen werden konnten. Zwei der Nebenprodukte (R_f (He/EE 50/50) 0,4 bzw. 0,38) eluierten auf der DC zwischen dem monohydroxylierten 7β -OH-D und dem dihydroxylierten $7\beta,11\alpha$ -OH-D. Es liegt die Vermutung nahe, dass beides ebenfalls monohydroxylierte Derivate von Dipterocarpol darstellen. Möglicherweise ist eines der beiden Produkte das 11α -OH-D. Denkbar wäre auch, dass analog zur Reaktion von DHEA mit CYP106A2 das 7α -Stereoisomer von 7β -OH-D gebildet wird. Dass keine Reaktion von $7\beta,11\alpha$ -Dihydroxydipterocarpol mit CYP106A2 *in vitro* nachgewiesen werden konnte, ist ein Hinweis darauf, dass die polareren Nebenprodukte mit R_f -Werten von 0,142 und niedriger aus der Reaktion mit anderen *Bacillus*-Enzymen als CYP106A2 hervorgehen. Alternativ könnte die andersgeartete Umgebung innerhalb der Zelle (Ionenstärke, pH) zusammen mit den homologen Redoxpartnern von CYP106A2, dem Megaredoxin und der Megaredoxinreduktase, die Bildung mehrfachhydroxylierter Spezies begünstigen.

Dipterocarpol ist ein tetracyclisches Dammaran (auch bezeichnet als Hydroxydammarenone II), welches zu den Haupttriterpenoiden in Dammar (Harz verschiedener Vertreter der *Dipterocarpaceae*) bzw. Mastixharz (Harz von *Pistacia lenticus* und *Pistacia terebinthus* gehört [122, 123, 124]. Interessant ist Dipterocarpol vor allem aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu den bioaktiven Stoffen des Ginseng der Gattung *Panax* (*Panax Ginseng* C.A. Meyer, *Panax*

notoginseng). Diese werden unter dem Begriff Ginsenoside zusammengefaßt und sind hauptsächlich Dammarantriterpenoide, die größtenteils in der Wurzel und in den Blättern der Pflanze in unterschiedlich stark glykosylierter Form vorliegen. Dipterocarpol unterscheidet sich von den Vorläufermolekülen dieser Ginsenoside, Protopanaxadiol und Protopanaxatriol, lediglich darin, dass diese beiden Substanzen zusätzliche Hydroxygruppen tragen sowie in der Stellung der 25-OH-Gruppe (s. Abb. 6.5 [125]).

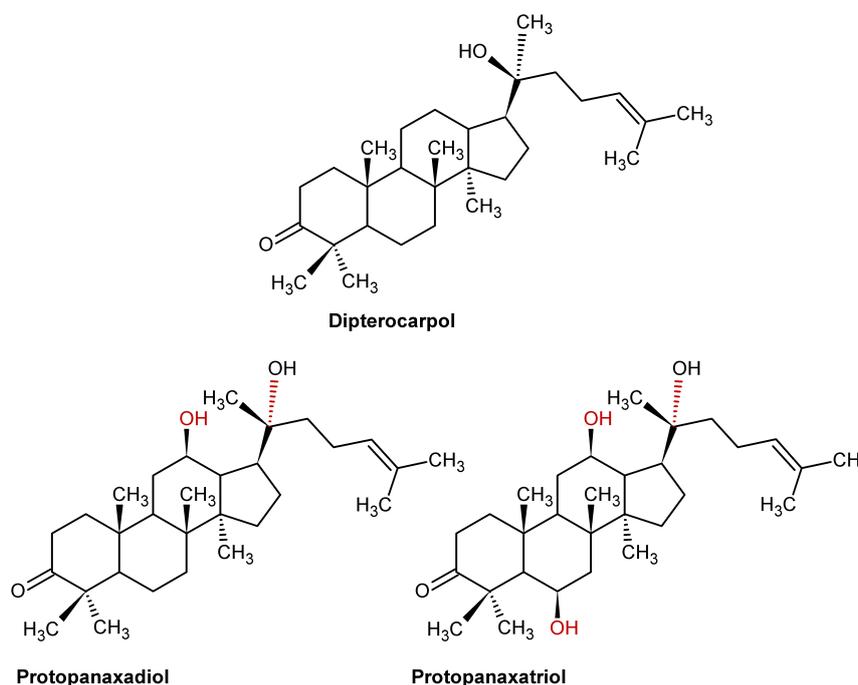


Abbildung 6.5: Strukturen von Dipterocarpol und den Ginsenosidvorläufermolekülen Protopanaxadiol und Protopanaxatriol

Für die Ginsenoside sind antioxidative, antivirale und antitumorale Eigenschaften beschrieben. Darüber hinaus spricht man ihnen einen positiven Einfluss auf das kardiovaskuläre, endokrine und das Immunsystem zu [126, 127]. Die unterschiedlichen Wirkungsweisen werden durch die verschiedenen physikochemischen Eigenschaften der Ginsenoside vermittelt [6]. Es gibt verschiedene Gründe, warum die Ginsenoside trotz ihres Potentials nicht zu Medikamenten weiterentwickelt wurden. Einer ist sicherlich, dass sie nur in geringen Mengen isoliert werden können und ihre industrielle Vermarktung nicht wirtschaftlich ist. Im Gegensatz zu den Ginsenosiden

kann Dipterocarpol aus vielen Mitgliedern der Dipterocarpaceae-Familie gewonnen werden und ist vergleichsweise günstig als Reinsubstanz käuflich zu erwerben. Die vorgestellte Einführung O-funktioneller Gruppen an Position 7 bzw. 7 und 11 geht möglicherweise einher mit einer Änderung der Bioaktivität, bewirkt durch die Änderungen der physikochemischen Eigenschaften des Moleküls.

Die Charakterisierung bioaktiver Eigenschaften ist komplex. Eine Kenngröße bei der Charakterisierung von Substanzen mit pharmazeutischem Potential, ist die toxische Wirkung auf Zellen in Kultur (Zytotoxizität), die vor allem bei der Entwicklung von Krebsmedikamenten eine relevante Eigenschaft darstellt. Um ein Bild über mögliche zytotoxische Wirkungen der Dipterocarpolreaktionsprodukte zu erhalten, wurden HeLa- und COS-1-Zellen mit Dipterocarpol, 7β -Hydroxydipterocarpol und $7\beta,11\alpha$ -Dihydroxydipterocarpol behandelt. Das monohydroxylierte 7β -Hydroxydipterocarpol wirkte dosisabhängig zytotoxisch auf die beiden getesteten Zelllinien, während die anderen beiden Substanzen keinen entscheidenden Einfluss auf die Zellviabilität nahmen. Eine 100 %ige Hemmung der Zellviabilität wurde nach Behandlung der HeLa-Zellen mit $100\ \mu\text{M}$ bzw. der COS-1-Zellen nach Behandlung mit $200\ \mu\text{M}$ 7β -Hydroxydipterocarpol erreicht. Verglichen mit dem Dipterocarpol strukturell nah verwandten Ginsenosidvorläufermolekül Panaxadiol, welches mit einem IC_{50} -Wert von $1,2\ \mu\text{M}$ zytotoxisch auf HeLa-Zellen wirkt, ist die zytotoxische Wirkung von 7β -Hydroxydipterocarpol auf HeLa-Zellen mit einem IC_{50} -Wert von $19,2\ \mu\text{M}$ moderat. Die halblethale Dosis 7β -Hydroxydipterocarpol betrug bei den COS-1 Zellen $60\ \mu\text{M}$, damit vertrugen die COS-1-Zellen etwa die dreifache Dosis an 7β -Hydroxydipterocarpol verglichen mit den HeLa-Zellen [88]. Vergleichsdaten strukturell ähnlicher Dammarane und ihrer Wirkung auf COS-1-Zellen liegen nicht vor. Der Wirkungsbereich auf HeLa-Zellen entspricht dem anderer Dammarantriterpenoide, wie das $3,30(\text{S}),24(\text{S})$ -Trihydroxydammar-25-enol (IC_{50} $30\ \mu\text{M}$) [128].

Das bisher in der Literatur nicht beschriebene, zweifachhydroxylierte $7\beta,11\alpha$ -Dihydroxydipterocarpol wirkte nicht toxisch auf die beiden getesteten Zelllinien. Jedoch ist die Stellung

der Hydroxygruppen chemisch interessant, da keine Beschreibung der Substanz in der Literatur gefunden wurde [3]. Eingehendere Untersuchungen bezüglich der Bioaktivität dieser Substanz sind daher durchaus lohnenswert, da spezifische cytotoxische Wirkungen nicht ausgeschlossen werden können. Zudem können fernab von toxischen Einflüssen andere pharmazeutisch relevante Bioaktivitäten dieser Substanz nicht ausgeschlossen werden.

6.3 Optimierung der Ganzzellbiokatalyse

Die Umsatzrate und die davon abhängige Ausbeute eines Biokatalyseprozesses sind von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst. Unter anderem spielt die Stabilität des Biokatalysators selbst, seine Aktivität, seine Toleranz gegenüber organischen Lösemitteln eine große Rolle. Des Weiteren können die Bioverfügbarkeit und die Abhängigkeit von Kofaktoren die Enzymkatalyse limitieren. Bei rekombinanten Systemen ist die Expressionsleistung ein weiterer entscheidender Faktor. Der Expressionsstatus der Zellen ist abhängig von ihrem physiologischen Zustand, welcher wiederum von der Wachstumsphase und den Kultivierungsbedingungen beeinflusst wird. Vor allem üben die zur Verfügung stehenden Kohlenstoff- und Stickstoffquellen einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinexpression aus. Es können sich abhängig von den Kultivierungsbedingungen die unterschiedlichsten Stoffwechselprodukte, darunter auch solche, die die P450-Reaktionen hemmen, anreichern [129]. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Bildung von Indol aus Tryptophan durch *E. coli*. Die hohen Indolkonzentrationen, die bei der Kultivierung von *E. coli* in tryptophanhaltigem Komplexmedium erreicht werden, können die P450-Reaktion vollständig zum Erliegen bringen [85].

Mit *B. megaterium* ATCC13368 konnten aus 150 mg Dipterocarpol 10 mg 7 β -Hydroxy- und 2 mg 7 β ,11 α -Dihydroxydipterocarpol hergestellt werden. Die Umsetzung von Dipterocarpol wurde über 24 h verfolgt. Dabei wurde beobachtet, dass die Zellen nicht in der Lage sind, 200 μ M Dipterocarpol vollständig in hydroxylierte Produkte zu überführen. Eine mögliche Erklärung könnte die Hemmung der Enzymreaktion durch die gebildeten Produkte selbst darstellen. Zumindest für die beiden Hauptprodukte konnte dies allerdings ausgeschlossen werden.

Neben einer direkten Inhibierung der Enzymreaktion kann die Enzymreaktion auch indirekt, durch toxische Wirkung von Dipterocarpol oder seiner Produkte auf die Zellen, gehemmt werden. Um die Auswirkung der Dipterocarpolumsetzung auf den physiologischen Zustand der Zellen zu untersuchen, wurde eine Wachstumskurve aufgenommen. Nach Zugabe von 200 μ M Dipterocarpol erreichten die Zellen nach 24 h eine OD₅₇₈ von 9,7, wuchsen somit gerade halb so dicht wie

eine Vergleichskultur ohne Dipterocarpol ($OD_{578} = 19,49$). Dieser Effekt ist nicht ungewöhnlich und konnte auch für die anderen in dieser Arbeit untersuchten Substrate beobachtet werden (s. Abb. 6.6). Eine toxische Wirkung auf die Zellen wurde von Frau Anastasia Zinschenko im Rahmen ihres Vertiefungspraktikums untersucht, wobei keine messbare toxische Wirkung von Dipterocarpol auf die Bakterienzellen festgestellt werden konnte.

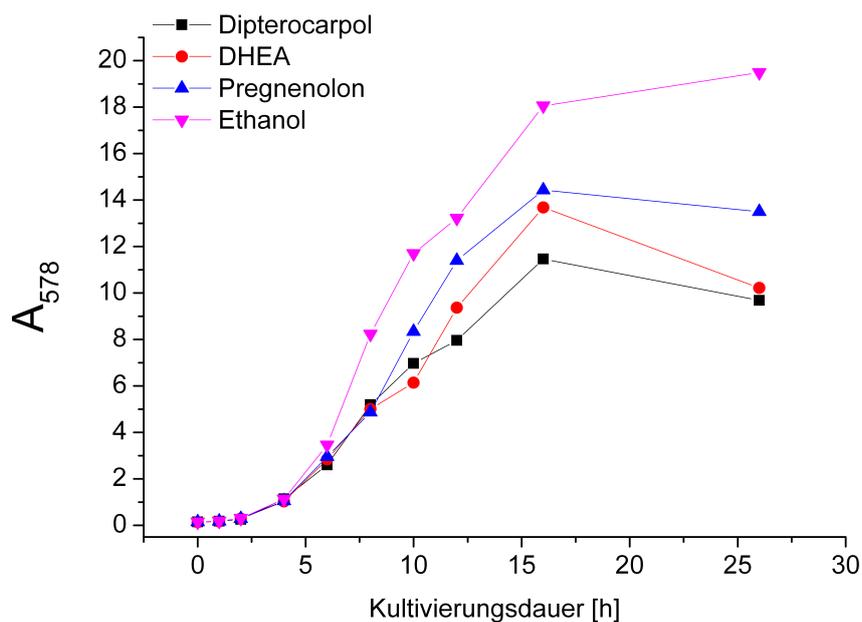


Abbildung 6.6: Wachstumskurven von *B. megaterium* ATCC13368 kultiviert in Soyton-Komplexmedium bei 150 rpm und 30 °C in Erlenmeyerkolben mit Schikanen

Um limitierende Faktoren aus dem Metabolismus der *B. megaterium* Zellen auf die Dipterocarpolumsetzung auszuschließen, wurden die Biotransformationen auch mit ruhenden Zellen durchgeführt. Zur Herstellung ruhender Zellen werden die Bakterien zunächst in Komplex- oder definierten Vollmedien kultiviert und anschließend in ein Puffersystem überführt. Diese Zellen sind dann metabolisch noch aktiv, teilen sich aber nicht mehr, weshalb man von ruhenden Zellen spricht. Die Verwendung von ruhenden Zellen hat den Vorteil, dass Stoffwechselprodukte, wie das oben genannte Indol, vor der eigentlichen Biotransformation entfernt werden [74, 85]. Zudem erleichtert das Entfernen von Komplexmedien die nachfolgende Prozessierung bzw. Analytik erheblich. Allerdings vermochten ruhende *B. megaterium* Zellen ebenfalls nicht mehr als

167 μM Dipterocarpol in 24 h umzusetzen.

Ein weiterer Versuch zur Steigerung der Dipterocarpolumsetzung war die Verwendung des von Bleif entwickelten rekombinanten Biokatalysators, der die Xylose-induzierte Überexpression von CYP106A2, sowie den heterologen Redoxpartnern AdR und Adx₄₋₁₀₈ in *B. megaterium* MS941 ermöglicht. Es wurde gehofft, dass die Bereitstellung größerer Mengen des Biokatalysators eine vollständige Hydroxylierung von 200 μM Dipterocarpol in 24 h ermöglicht. Jedoch führte die Verwendung des MS941_CAA-Stammes ebenfalls nicht zum gewünschten Ergebnis, da nach 24 h immer noch Reste des Substrates detektiert werden konnten.

Eine Erhöhung der Ausbeute wurde somit weder durch Verwendung von ruhenden Zellen noch durch die Verwendung eines rekombinanten Systems erzielt. Die Ausbeute an 7 β -Hydroxydipterocarpol und 7 β ,11 α -Dihydroxydipterocarpol konnte jedoch durch die schrittweise Substratzugabe erhöht werden (s. Tab. 6.7). Der limitierende Schritt der Dipterocarpolumsetzung ist nicht bekannt. Zur biotechnologischen Anwendung dieser Reaktion könnte die Entwicklung eines Systems zur kontinuierlichen Produktabtrennung in Betracht gezogen werden. Die toxische Wirkung auf die Zellen könnte auch durch die Verwendung von Lysaten umgangen werden. Zehntgruber et al. zeigten bereits, dass lyophilisierte *E. coli*-Lysate ebenfalls effektiv zur Herstellung von hydroxylierten Steroiden eingesetzt werden können [130]. Es ist denkbar, dass diese Methode auch mit *B. megaterium*-Zellen angewendet werden kann.

Tabelle 6.7: Vergleich der Dipterocarpol ausbeuten nach Umsetzung im diskontinuierlichen Satz- (Batch) bzw. Fütterungsumsatzes (Feed). Dargestellt sind die absoluten Ausbeuten nach Extraktion und Reinigung der Reaktionsprodukte über Kieselgel-60.

| Produkt | 150 mg (Batch) | 300 mg (Feed) |
|------------------------------|-----------------|---------------|
| 7 β -OH-D | 10 mg (6,66 %) | 46 mg (15 %) |
| 7 β ,11 α -OH-D | 0,8 mg (1,33 %) | 33 mg (11 %) |

Die Umsetzungen von DHEA mit *B. megaterium* ATCC13368 waren gegenüber der Dipterocarpolumsetzung bedeutend besser (s. Tab. 5.48). Während von Dipterocarpol in 24 h 200 μM

nicht vollständig umgesetzt werden konnten, gelang dies für 400 μM DHEA bereits innerhalb von 180 min. Damit ergibt sich eine theoretische Umsatzrate von 3,2 μM pro Tag. Weil die Umsetzung von Dipterocarpol nach schrittweiser Zufütterung des Substrates die Ausbeute deutlich verbesserte, wurde die Umsetzung von DHEA ebenfalls unter kontinuierlicher Substratzufütterung untersucht. Die Zugabe von DHEA erfolgte in Schritten von 400 μM im Abstand von je 180 min. Die Reaktion stoppte jedoch nach Zugabe von 1,6 mM DHEA (s. Abb. 5.46), wofür es verschiedene Erklärungen gibt. Entweder inhibiert die Anreicherung der DHEA-Produkte in der Kultur die Reaktion oder die Aktivität der Zellen lässt nach längerer Inkubation (24 h) nach. Letzteres ist auszuschließen, da die Aktivität der *B. megaterium* Zellen nach 24 h ihren Höhepunkt erreicht und nach 48 h immer noch rund 80 % beträgt. Auch die Hydroxylierung von DHEA wurde auf eine gesteigerte Umsatzrate unter Verwendung ruhender Zellen sowie des rekombinanten Systems (MS941_CAA) untersucht. Ruhende Zellen vermochten DHEA innerhalb von 60 min vollständig in die beiden 7-hydroxylierten Produkte zu überführen. Anders als bei Dipterocarpol, konnte durch die Trennung von Kultivierung und Umsatz eine Steigerung der Umsetzung um das Dreifache erreicht werden. Daher wurden die Untersuchungen mit dem MS941_CAA-Stamm für DHEA ebenfalls in ruhenden Zellen durchgeführt. Eine weitere Steigerung der Umsatzrate konnte durch die MS941_CAA-Zellen jedoch nicht erreicht werden. Interessanterweise änderte sich allerdings das Produktmuster. Das Hauptprodukt der Reaktion ist immer noch 7 β -OH-DHEA, aber aus der Reaktion mit den rekombinanten MS941_CAA-Zellen geht deutlich weniger 7 α -OH-DHEA-Nebenprodukt hervor. Vergleicht man die Produktverhältnisse, so zeigt sich, dass nach *in vitro* Reaktion beinahe äquimolare Mengen der beiden Stereoisomere gebildet werden. Der Wirtsstamm *B. megaterium* ATCC13368 bildet dagegen 80 % und der rekombinante MS941_CAA-Stamm sogar 90 % 7 β -OH-DHEA (s. Abb. 6.8). Bisher ist die Ursache dieser Beobachtung völlig unklar. Eine Änderung der Selektivität in Abhängigkeit von der Wahl des reduzierenden Agens wurde 1979 von Berg et al. beschrieben. Sie konnten feststellen, dass nach Verwendung von Natriumiodat (NaIO_4) als Elektronenlieferant, CYP106A2 Progesteron zu 15 α und

15 β -Hydroxyprogesteron im Verhältnis von 4,6 zu 5,8 nmol Produkt/nmol P450/min (Quotient = 1,3) hydroxyliert. Die Erhöhung der Natriumiodatkonzentration änderete das Verhältnis nicht. Das Produktverhältnis änderte sich jedoch bei Verwendung von Iodobenzen (C₆H₅IO) deutlich, in dieser Reaktion wurden 4,7 nmol/nmol P450 /min 15 α -OH-Progesteron und 14,2 nmol/nmol P450/min 15 β -OH-Progesteron erhalten [61]. Auch Bleif konnte eine Änderung der Stereoselektivität bei der Umsetzung mit dem MS941-CAA-Stamm im Vergleich zum ATCC13368-Stamm beobachten [80]. Bisher ist es allerdings nicht möglich, dieses Phänomen zu erklären.

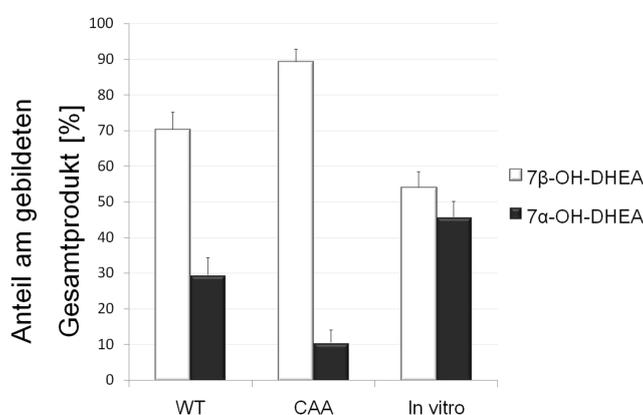


Abbildung 6.8: Produktmuster der DHEA Umsetzung mit CYP106A2 im *in vitro* rekonstituierten Enzymsystem aus CYP106A2, AdR und Adx₄₋₁₀₈, dem Wirtsstamm des Enzyms *B. megaterium* ATCC13368 und einem rekombinanten Biokatalysesystem in *B. megaterium* MS941 mit Überexpression von CYP106A2, AdR und Adx₄₋₁₀₈

Die Hydroxylierung von Steroiden durch Mikroorganismen ist seit vielen Jahrzehnten bekannt. Auch konnten bereits einigen eine 7-Hydroxylaseaktivität mit DHEA nachgewiesen werden, wobei das 7 β -Produkt fast immer das Nebenprodukt der Reaktion darstellt. Zumeist handelt es sich dabei um filamentöse Pilze. Einige DHEA-hydroxylierende Spezies sind *Exophilala jeanselmei* (var. *lecanii corni* UAMH 8783), *M. recemosus*, *Boryodiploida malorum* CBS 134.50, *Mortierella isabellina* AM212, *Nigrospora* [131]. Sie alle reagieren mit DHEA jedoch unselektiv zu Gemischen aus den 7 α - und 7 β -Stereoisomeren, die oft zusammen mit weiteren Produkten auftreten. Beispielsweise produziert *Mucor racemosus* mit einer Umsatzrate von 0,015 g/l/h die bei-

den Stereoisomere im Verhältnis 3 zu 2 (α zu β). Dagegen vermag *B. megaterium* MS941_CAA 400 μM (= 0,155 g/l) in gerade einer Stunde zu 90 % zu 7 β -OH-DHEA umzusetzen. Die Umsetzung von DHEA mit *B. megaterium* hält damit einem Vergleich mit bisher beschriebenen Systemen durchaus stand. Zukünftig sollte die Weiterentwicklung des Fütterungsumsatzes unter Verwendung ruhender Zellen es ermöglichen, die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit über einen längeren Zeitraum beizubehalten. Eine kontinuierliche Zufuhr einer Kohlenstoffquelle, einhergehend mit einer kontinuierlichen Produktabtrennung, wird höchstwahrscheinlich eine erhebliche Steigerung der Ausbeute bewirken.

Ein entscheidender Schritt in Richtung Anwendung der Biokatalyse von DHEA durch *B. megaterium* wird es sein, den sogenannten „*Downstream Process*“ (DSP), d.h. die Extraktion, Reinigung und Weiterverarbeitung der Reaktionsprodukte, zu verbessern. Ein Teil der Verluste könnte durch Verwendung automatisierter Reinigungsprozeduren vermieden werden. Auch die Art der Trennung, insbesondere ihre Leistung kann durch die Wahl alternativer Säulenmaterialien verbessert werden. Die Trennung der hydroxylierten DHEA-Spezies, die eine vergleichsweise hohe Hydrophilie besitzen, kann durch Umstieg von Normal- auf Umkerphase verbessert werden. Präparative RP-HPLC Verfahren sind für das DSP der Biotransformation von DHEA durch *B. megaterium* zu empfehlen. Zur Verbesserung der Ausbeute durch verbesserte Rückgewinnung der Reaktionsprodukte nach der Ganzzellbiokatalyse haben Utkur et al. superkritisches CO₂ verwendet. In Zweiphasensystemen (aber auch bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion) können sich zwischen der wässrigen Phase, die die Bakterienkultur enthält und der organischen Phase stabile Emulsionen bilden. Superkritisches CO₂ ist in der Lage diese Emulsionen zu destabilisieren, was die Phasentrennung und damit die Extraktionseffizienz deutlich verbesserte [132]. Zukünftig ist es sicherlich sinnvoll, die Verwendung solcher Extraktionshilfen zur Verbesserung der Ausbeute zu untersuchen.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bestärken das Potential von CYP106A2 als vielseitigen Biokatalysator für die Herstellung hochpreisiger Reaktionsprodukte im präpara-

tiven Maßstab. Zudem konnte das hier vorgestellte Screeningsystem in unserer Arbeit bereits erfolgreich mit anderen Cytochrom P450 Enzymen eingesetzt werden. Abschließend kann gesagt werden, dass die gesteckten Ziele der vorliegenden Arbeit vollständig erreicht wurden.

Literatur

- [1] EG 1907/2006. Verordnung (eg) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Chemikalienagentur, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission. *Amtsblatt der Europäischen Union, Berichtigungen*, pages L163/3–L163/280, 2007.
- [2] D. W. Christianson. Unearthing the Roots of the Terpenome. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(2):141–150, 2008.
- [3] R. A. Hill and J. D. Connolly. Triterpenoids. *Natural Product Reports*, 29(7):780–818, 2012.
- [4] H. P. Latscha, H. A. Klein, and G. W. Linti. *Chemie-Basiswissen*. Springer, Berlin, 9. edition, 1988.
- [5] C. I. Keeling and J. Bohlmann. Diterpene Resin Acids in Conifers. *Phytochemistry*, 67(22):2415–2423, 2006.
- [6] L.-W. Qi, C.-Z. Wang, and C.-S. Yuan. American Ginseng: Potential Structure-Function Relationship in Cancer Chemoprevention. *Biochemical Pharmacology*, 80(7):947–954, 2010.
- [7] L.-W. Qi, C.-Z. Wang, and C.-S. Yuan. Ginsenosides from American Ginseng: Chemical and Pharmacological Diversity. *Phytochemistry*, 72(8):689–699, 2011.

- [8] M. Karmazyn, M. Moey, and X. T. Gan. Therapeutic Potential of Ginseng in the Management of Cardiovascular Disorders. *Drugs*, 71(15):1989–2008, 2011.
- [9] K.-Y. Yoo and S.-Y. Park. Terpenoids as Potential anti-Alzheimer’s Disease Therapeutics. *Molecules*, 17(3):3524–3538, 2012.
- [10] J. M. Berg, L. Stryer, and J. L. Tymoczko. *Biochemie*. Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, 6 edition, 2007.
- [11] D. A. Dias, S. Urban, and U. Roessner. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, 2(2):303–336, 2012.
- [12] A. Harvey. Natural Products in Drug Discovery. *Drug Discovery Today*, 13(19-20):894–901, 2008.
- [13] Y.-W. Chin, M. J. Balunas, H. B. Chai, and A. D. Kinghorn. Drug Discovery from Natural Sources. *The AAPS Journal*, 8(2):E239–E253, 2006.
- [14] J. W.-H Li and J. C. Vederas. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science*, 325(5937):161–165, 2009.
- [15] H.-J. Böhm. *Wirkstoffdesign: Der Weg zum Arzneimittel*. Spektrum-Lehrbuch. Spektrum Akad. Verl, Heidelberg u.a, 1996.
- [16] J. G. Mahdi, A. J. Mahdi, and I. D. Bowen. The Historical Analysis of Aspirin Discovery, its Relation to the Willow Tree and Antiproliferative and Anticancer Potential. *Cell Proliferation*, 39(2):147–155, 2006.
- [17] G. M. Rishton. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. *The American Journal of Cardiology*, 101(10A):43D–49D, 2008.

- [18] D. D. Baker, M. Chu, U. Oza, and V. Rajgarhia. The value of Natural Products to Future Pharmaceutical Discovery. *Natural Product Reports*, 24(6):1225, 2007.
- [19] J.-Y. Ortholand and A. Ganesan. Natural Products and Combinatorial Chemistry: Back to the Future. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(3):271–280, 2004.
- [20] D. J. Newman, G. M. Cragg, and K. M. Snader. Natural Products as Sources of New Drugs Over the Period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66(7):1022–1037, 2003.
- [21] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, and K. Robins. Engineering the Third Wave of Biocatalysis. *Nature*, 485(7397):185–194, 2012.
- [22] W. Weber and M. Fussenegger. Emerging Biomedical Applications of Synthetic Biology. *Nature Reviews Genetics*, 2011.
- [23] M. H. Medema, R. Breitling, R. Bovenberg, and E. Takano. Exploiting Plug-and-Play Synthetic Biology for Drug Discovery and Production in Microorganisms. *Nature Reviews*, 9(2):131–137, 2011.
- [24] F. M. Szczebara, C. Chandelier, C. Villeret, A. Masurel, S. Bourot, C. Duport, S. Blanchard, A. Groisillier, E. Testet, P. Costaglioli, G. Cauet, E. Degryse, D. Balbuena, J. Winter, T. Achstetter, R. Spagnoli, D. Pompon, and B Dumas. Total Biosynthesis of Hydrocortisone from a Simple Carbon Source in Yeast. *Nature Biotechnology*, 21(2):143–149, 2003.
- [25] D. Ro, E. M. Paradise, M. Ouellet, K. J. Fisher, K. L. Newman, J. M. Ndungu, K. A. Ho, R. A. Eachus, T. S. Ham, J. Kirby, M. C. Chang, S. T. Withers, Y. Shiba, R. Sarpong, and J. D. Keasling. Production of the Antimalarial Drug Precursor Artemisinic Acid in Engineered Yeast. *Nature*, 440(7086):940–943, 2006.
- [26] M. C. Y. Chang, R. A. Eachus, W. Trieu, D.-K. Ro, and J. D. Keasling. Engineering

- Escherichia coli for Production of Functionalized Terpenoids Using Plant P450s. *Nature Chemical Biology*, 3(5):274–277, 2007.
- [27] P. K. Ajikumar, W.-H Xiao, K. E. J. Tyo, Y. Wang, F. Simeon, E. Leonard, O. Mucha, T. H. Phon, B. Pfeifer, and G. Stephanopoulos. Isoprenoid Pathway Optimization for Taxol Precursor Overproduction in Escherichia coli. *Science*, 330(6000):70–74, 2010.
- [28] R. Bernhardt. Cytochromes P450 as Versatile Biocatalysts. *Journal of Biotechnology*, 124(1):128–145, 2006.
- [29] D. R. Nelson. The cytochrome p450 homepage. *Human Genomics*, 4(1):59–65, 2009.
- [30] G.I Lepsheva and M. R. Waterman. Sterol 14 α -Demethylase Cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all Biological Kingdoms. *Biochimica Biophysica Acta*, 1770(3):467–77, 2007.
- [31] M. Ingelman-Sundberg. Pharmacogenetics of Cytochrome P450 and its Applications in Drug Therapy: the Past, Present and Future. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(4):193–200, 2004.
- [32] T. L. Poulos. Cytochrome P450 Flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23):13121–13122, 2003.
- [33] Thomas L. Poulos. Structural biology of heme monooxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1):337–345, 2005.
- [34] T. C. Pochapsky, S. Kazanis, and M. Dang. Conformational Plasticity and Structure/Function Relationships in Cytochromes P450. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(8):1273–1296, 2010.
- [35] Ortiz de Montellano, P. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*. Kluwer Academic/Plenum Publisher, 3 edition, 2004.

- [36] F. Hannemann, A. Bichet, K. M. Ewen, and R. Bernhardt. Cytochrome P450 Systems–Biological Variations of Electron Transport Chains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770(3):330–344, 2007.
- [37] T. L. Poulos, B. C. Finzel, and A. J. Howard. High-resolution Crystal Structure of Cytochrome P450cam. *Journal of Molecular Biology*, 195(3):687–700, 1987.
- [38] A. Luthra, I. G. Denisov, and S. G. Sligar. Spectroscopic Features of Cytochrome P450 Reaction Intermediates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 507(1):26–35, 2011.
- [39] M. Klingenberg. The Dragging Emergence of the P450 Cytochrome, 2003.
- [40] T. Omura and S. Ryo. A New Cytochrome in Liver Microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 237(4):1375–1376, 1962.
- [41] C. D. Stout. Cytochrome p450 Conformational Diversity. *Structure*, 12(11):1921–1922, 2004.
- [42] B. Chapman. *Transition Metals, Quantitative Kinetics and Applied Organic Chemistry*. Nelson Thornes, Cheltenham, 2001.
- [43] E. A. Deiss. *Untersuchungen von Elektronenstrukturen in Übergangsmetallkomplexen, Dissertation*. Eidgenössische Technische Hochschule Zürich Freiburg, 1980.
- [44] W. A. Herrmann and D. Astruc. *Transition Metall Coordination Chemistry*. Springer, Berlin and New York [etc.], 1992.
- [45] J. Wagler. *Beschreibung der Bindungsverhältnisse in Komplexverbindungen, Dissertation*. Technische Universität Bergakademie Freiburg, 2003.
- [46] S. G. Sligar. Coupling of Spin, Substrate, and Redox Equilibria in Cytochrome p450. *Biochemistry*, 15(24):5399–5406, 1976.

- [47] G. G. Gibson and P. P. Tamburini. Cytochrome P-450 spin state: Inorganic Biochemistry of Haem Iron Ligation and Functional Significance. *Xenobiotica*, 14(1-2):27–47, 1984.
- [48] J. B. Schenkman, H. Remmer, and R. W. Estabrook. Spectral Studies of Drug Interaction with Hepatic Microsomal Cytochrome. *Molecular Pharmacology*, 3(2):113–123, 1967.
- [49] M. Sono, L. A. Andersson, and J. H. Dawson. Sulfur Donor Ligand Binding to Ferric Cytochrome P-450-CAM and Myoglobin. Ultraviolet-Visible Absorption, Magnetic Circular Dichroism, and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopic Investigation of the Complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(14):8308–8320, 1982.
- [50] P. S. Vary, R. Biedendieck, T. Fuerch, F. Meinhardt, M. Rohde, W.-D. Deckwer, and D. Jahn. *Bacillus megaterium* – from Simple Soil Bacterium to Industrial Protein Production Host. *Applied Microbiology Biotechnology*, 76(5):957–967, 2007.
- [51] C. Korneli, R. Biedendieck, F. David, D. Jahn, and C. Wittmann. High Yield Production of Extracellular Recombinant Levansucrase by *Bacillus megaterium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, page epub, 2012.
- [52] T. Fürch, R. Hollmann, C. Wittmann, W. Wang, and W.-D. Deckwer. Comparative Study on Central Metabolic Fluxes of *Bacillus megaterium* Strains in Continuous Culture using ¹³C Labelled Substrates. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30(1):47–59, 2007.
- [53] T. Fürch, C. Wittmann, W. Wang, E. Franco-Lara, D. Jahn, and W.-D. Deckwer. Effect of Different Carbon Sources on Central Metabolic Fluxes and the Recombinant Production of a Hydrolase from *Thermobifida fusca* in *Bacillus megaterium*. *Journal of Biotechnology*, 132(4):385–394, 2007.
- [54] R. Biedendieck, M. Gamer, L. Jaensch, S. Meyer, M. Rohde, W.-D. Deckwer, and D. Jahn. A Sucrose-Inducible Promoter System for the Intra- and Extracellular Protein Production in *Bacillus megaterium*. *Journal of Biotechnology*, 132(4):426–30, 2007.

- [55] R. Biedendieck, M. Malten, H. Barg, B. Bunk, J.-H. Martens, E. Deery, H. Leech, M. J. Warren, and D. Jahn. Metabolic Engineering of Cobalamin (Vitamin B12) Production in *Bacillus megaterium*. *Microbial Biotechnology*, 3(1):24–37, 2010.
- [56] T. Rygus and W. Hillen. Inducible High-Level Expression of Heterologous Genes in *Bacillus megaterium* Using the Regulatory Elements of the Xylose-Utilization Operon. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(5):594–599, 1991.
- [57] A. Scheler, T. Rygus, R. Allmansberger, and W. Hillen. Molecular Cloning, Structure, Promoters and Regulatory Elements for Transcription of the *Bacillus licheniformis* Encoded Regulon for Xylose Utilization. *Archives of Microbiology*, 155(6):526–534, 1991.
- [58] T. Rygus and W. Hillen. Catabolite Repression of the Xyl Operon in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, 174(9):3049–3055, 1992.
- [59] W.J McAleer, T.A Jacob, L.B Turnbull, E.F Schoenewaldt, and T.H Stoudt. Hydroxylation of Progesterone by *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 73(1):127–130, 1958.
- [60] A. Berg, K Carlström, J. Gustafsson, and M. Ingelman-Sundberg. Demonstration of a Cytochrome P-450-dependent Steroid 15 β -Hydroxylase in *Bacillus megaterium*, 1975.
- [61] A. Berg, M. Ingelman-Sundberg, and J. A. Gustafsson. Isolation and Characterization of Cytochrome P-450_{meg}. *Acta Biologica et Medica Germanica*, 38(2-3):333–344, 1979.
- [62] A. Berg. Characterization of the Ferredoxin Component of the Steroid 15 Beta-Hydroxylase System from *Bacillus megaterium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 105(1):303–11, 1982.
- [63] R. Rauschenbach, M. Isernhagen, C. Noeske-Jungblut, W. Boidol, and G. Siewert. Cloning Sequencing and Expression of the Gene for Cytochrome P450_{meg}, the Steroid-15 β -

- Monooxygenase from *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Molecular and General Genetics*, 241(241):170–176, 1993.
- [64] A. Berg and J. J. Rafter. Studies on the Substrate Specificity and Inducibility of Cytochrome P-450_{meg}. *The Biochemical Journal*, 196(3):781–786, 1981.
- [65] M. Lisurek, M.-J. Kang, R. W. Hartmann, and R. Bernhardt. Identification of Monohydroxy Progesterones Produced by CYP106A2 Using Comparative HPLC and Electrospray Ionisation Collision-Induced Dissociation Mass Spectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(2):677–682, 2004.
- [66] M. Lisurek, B. Simgen, I. Antes, and R. Bernhardt. Theoretical and Experimental Evaluation of a CYP106A2 low Homology Model and Production of Mutants with Changed Activity and Selectivity of Hydroxylation. *ChemBiochem*, 9(9):1439–1449, 2008.
- [67] H. Agematu, N. Matsumoto, Y. Fujii, H. Kabumoto, S. Doi, K. Machida, J. Ishikawa, and A. Arisawa. Hydroxylation of Testosterone by Bacterial Cytochromes P450 Using the *Escherichia coli* Expression System. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(1):307–311, 2006.
- [68] B. Simgen, J. Contzen, R. Schwarzer, R. Bernhardt, and C. Jung. Substrate Binding to 15 β -Hydroxylase (CYP106A2) Probed by FT Infrared Spectroscopic Studies of the Iron Ligand CO Stretch Vibration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 269(269):737–742, 2000.
- [69] H. Colas, K. M. Ewen, F. Hannemann, N. Bistolas, U. Wollenberger, R. Bernhardt, and P. Oliveira. Direct and Mediated Electrochemical Response of the Cytochrome P450 106A2 from *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Bioelectrochemistry*, 87:71–77, 2012.
- [70] K. T. Nguyen, C. Virus, N. Günnewich, F. Hannemann, and R. Bernhardt. Changing the

- Regioselectivity of a P450 from C15 to C11 Hydroxylation of Progesterone. *ChemBioChem*, 13(8):1161–1166, 2012.
- [71] G. W. Souness and D. J. Morris. 11α - and 11β -Hydroxyprogesterone, Potent Inhibitors of 11β -Hydroxysteroid Dehydrogenase, Possess Hypertensinogenic Activity in the Rat. *Hypertension*, 27(3):421–425, 1996.
- [72] M. Tristan, L. J. Orozco, A. Steed, A. Ramirez-Morera, and P. Stone. Mifepristone for Uterine Fibroids. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, 8:epub, 2012.
- [73] M. Kang, M. Lisurek, R. Bernhardt, and R. W. Hartmann. Use of High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Collision-Induced Dissociation Mass Spectrometry for Structural Identification of Monohydroxylated Progesterones. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(23):2795–2800, 2004.
- [74] D. Zehentgruber, C.-A. Dragan, M. Bureik, and S. Lütz. Challenges of Steroid Biotransformation with Human Cytochrome P450 Monooxygenase CYP21 Using Resting Cells of Recombinant *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biotechnology*, 146(4):179–185, 2010.
- [75] S. Bleif, F. Hannemann, M. Lisurek, J. P. von Kries, J. Zapp, M. Dietzen, I. Antes, and R. Bernhardt. Identification of CYP106A2 as a Regioselective Allylic Bacterial Diterpene Hydroxylase. *ChemBioChem*, 12(4):576–582, 2011.
- [76] C. Virus, M. Lisurek, B. Simgen, F. Hannemann, and R. Bernhardt. Function and Engineering of the 15β -Hydroxylase CYP106A2. *Biochemical Society Transactions*, 34(Pt 6):1215–1218, 2006.
- [77] Bleif S. *Identifizierung neuer potentieller Substrate von CYP106A2*. Universität des Saarlandes, Diplomarbeit, 2007.

- [78] Bleif S. *Von der Identifizierung neuer Substrate der 15 β -Hydroxylase (CYP106A2) zur Cytochrom P450-Ganzzellkatalyse in Bacillus megaterium, Dissertation.* Universität des Saarlandes, 25.10.2012.
- [79] K. D. Wittchen and F. Meinhardt. Inactivation of the Major Extracellular Protease from Bacillus megaterium DSM319 by Gene Replacement. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42(6):871–877, 1995.
- [80] S. Bleif, F. Hannemann, J. Zapp, D. Hartmann, J. Jauch, and R. Bernhardt. A new Bacillus megaterium Whole-Cell Catalyst for the Hydroxylation of the Pentacyclic Triterpene 11-keto- β -Boswellic acid (KBA) Based on a Recombinant Cytochrome P450 System. *Applied Microbiology and Biotechnology*, pages 1135–1146, 2011.
- [81] F. Hannemann, C. Virus, and R. Bernhardt. Design of an Escherichia coli System for Whole Cell Mediated Steroid Synthesis and Molecular Evolution of Steroid Hydroxylases. *Journal of Biotechnology*, 124(1):172–181, 2006.
- [82] C. Yanish-Perron, J. Viera, and J. Messing. Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strain: Nucleotide Sequences of the M13mpl8 and pUC19 Vectors. *Gene*, 33:103–119, 1985.
- [83] K. D. Wittchen and F. Meinhardt. Inaktivierung der Major Extracellulären Protease von Bacillus megaterium DSM319 durch Gentransfer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42:871–877, 1995.
- [84] Y. Zhang, L. Song, Q. Gao, S. M. Yu, L. Li, and N. F. Gao. The Two-Step Biotransformation of Monosodium Glutamate to GABA by Lactobacillus brevis Growing and Resting Cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(6):1619–1627, 2012.
- [85] M. Ringle, Y. Khatri, J. Zapp, F. Hannemann, and R. Bernhardt. Application of a new

- Versatile Electron Transfer System for Cytochrome P450-based Escherichia coli Whole-Cell Bioconversions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, page epub, 2012.
- [86] N. W. Roehm, G. H. Rodgers, S. M. Hatfield, and A. L. Glasebrook. An Improved Colorimetric Assay for Cell Proliferation and Viability Utilizing the Tetrazolium Salt XTT. *Journal of Immunological Methods*, 142(2):257–265, 1991.
- [87] R Tsai, C. A. Yu, I. C. Gunsalus, J. Peisach, W. Blumberg, W. H. Orme-Johnson, and H. Beinert. Spin-state Changes in cytochromes P-450_{cam} on Binding of Specific Substrates. *Proceedings of the National Academy of Science*, 66(4):1157–1163, 1970.
- [88] D. Schmitz, J. Zapp, and R. Bernhardt. Hydroxylation of the Triterpenoid Dipterocarpol with CYP106A2 from *Bacillus megaterium*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 279(9):1663–1674, 2012.
- [89] P. Chatterjee, S. A. Kouzi, J. M. Pezzuto, and M. T. Hamann. Biontransformation of the Antimelanoma Agent Betulinic Acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9):3850–3855, 2000.
- [90] S. A. Kouzi, P. Chatterjee, J. M. Pezzuto, and M. T. Hamann. Microbial Transformations of the Antimelanoma Agent Betulinic Acid. *Journal of Natural Products*, 63(12):1653–1657, 2000.
- [91] K.-H. Lee. Discovery and Development of Natural Product-Derived Chemotherapeutic Agents Based on a Medicinal Chemistry Approach. *Journal of Natural Products*, 73(3):500–516, 2010.
- [92] S. Alakurtti, P. Bergström, N. Sacerdoti-Sierra, C. L. Jaffe, and J. Yli-Kauhaluoma. Anti-Leishmanial Activity of Betulin Derivatives. *The Journal of Antibiotics*, 63(3):123–126, 2010.

- [93] H. Zhao, S. S. Holmes, G. A. Baker, S. Challa, H. S. Bose, and Z. Song. Ionic Derivatives of Betulinic Acid as Novel HIV-1 Protease Inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(5):715–721, 2012.
- [94] I. Šterzl, R. Hampl, J. Šterzl, J. Votruba, and L. Stárka. 7β -OH-DHEA Counteracts Dexamethasone Induced Suppression of Primary Immune Response in Murine Spleenocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 71(3–4):133–137, 1999.
- [95] H Chmiel. *Bioprozesstechnik*. Spektrum Akademischer Verlag, Springer, 2011.
- [96] I. Hanukoglu, R. Rapoport, L. Weiner, and D. Sklan. Electron Leakage from the Mitochondrial NADPH-Adrenodoxin Reductase-Adrenodoxin-P450_{scc} (Cholesterol Side Chain Cleavage) System. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 305(2):489–498, 1993.
- [97] Z. Zhang, J. Yu, and R. C. Stanton. A Method for Determination of Pyridine Nucleotides Using a Single Extract. *Analytical Biochemistry*, 285(1):163–167, 2000.
- [98] G. E. Tsotsou, A. E. G. Cass, and G. Gilardi. High Throughput Assay for Cytochrome P450 BM3 for Screening Libraries of Substrates and Combinatorial Mutants. *Biosensors & Bioelectronics*, 17(1-2):119–131, 2002.
- [99] C. J. C. Whitehouse, S. G. Bell, and L.-L. Wong. P450BM3 (CYP102A1): Connecting the Dots. *Chemical Society Reviews*, 41(3):1218, 2012.
- [100] G. E. Tsotsou, G. Di Nardo, S. J. Sadeghi, R. Fruttero, L. Lazzarato, M. Bertinaria, and G. Gilardi. A Rapid Screening for Cytochrome P450 Catalysis on New Chemical Entities: Cytochrome P450 BM3 and 1,2,5-Oxadiazole Derivatives. *Journal of Biomolecular Screening*, 2012.
- [101] T. Sagadin. *Untersuchung von CYP105A1 und CYP106A2 zur Erweiterung des Substrat-*

- spektrums und Charakterisierung ausgewählter Prolinmutanten, Diplomarbeit.* Universität des Saarlandes, 2012.
- [102] S. Sirk. *Vergleichende Untersuchungen über die Gehalte an Morphin, Codein, Thebain, Papaverin und Noscapin in verschiedenen Sorten von Papaver somiferum L, Diplomarbeit.* Universität Graz, 1992.
- [103] B. Aufschnaiter. *Untersuchungen im Rahmen der Entwicklung von Noscapin-Pellets, Diplomarbeit.* Universität Wien, 1984.
- [104] B. Halling-Sorensen, A. Lykkeberg, F. Ingerslev, P. Blackwell, and J. Tjornelund. Characterisation of the Abiotic Degradation Pathways of Oxytetracyclines in Soil Interstitial Water Using LC-MS-MS. *Chemosphere*, 50(10):1331–1342, 2003.
- [105] D. Li, M. Yang, J. Hu, L. Ren, Y. Zhang, and K. Li. Determination and Fate of Oxytetracycline and Related Compounds in Oxytetracycline Production Wastewater and the Weceiving River. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(1):80–86, 2008.
- [106] M. L. Loke, S. Jespersen, R. Vreeken, B. Halling-Sorensen, and J. Tjornelund. Determination of Oxytetracycline and its Degradation Products by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Manure-Containing Anaerobic Test Systems. *Journal of Chromatography*, 783(1):11–23, 2003.
- [107] E. JR Middleton, C. Kandaswami, and T. C. Theoharides. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4):673–751, 2000.
- [108] M. Kleser, F. Hannemann, M. Hutter, J. Zapp, and R. Bernhardt. CYP105A1 Mediated 3-Hydroxylation of Glimepiride and Glibenclamide using a Recombinant *Bacillus megaterium* Whole-Cell Catalyst. *Journal of Biotechnology*, 157(3):405–412, 2012.

- [109] S. Cornelissen, M. K. Julsing, J. Volmer, O. Riechert, A. Schmid, and B. Bühler. Whole-Cell-Based CYP153A6-Catalyzed (S)-Limonene Hydroxylation Efficiency Depends on Host Background and Profits from Monoterpene Uptake via AlkL. *Biotechnology and Bioengineering*, page epub, 2012.
- [110] C. E. Marx, D. W. Bradford, R. M. Hamer, J. C. Naylor, T. B. Allen, J. A. Lieberman, J. L. Strauss, and J. D. Kilts. Pregnenolone as a Novel Therapeutic Candidate in Schizophrenia: Emerging Preclinical and Clinical Evidence. *Neuroscience*, 191:78–90, 2011.
- [111] R. Lathe. Steroid and Sterol 7-Hydroxylation: Ancient Pathways. *Steroids*, 67(12):967–977, 2002.
- [112] Y. Akwa, R. F. Morfin, P. Robel, and E. E. Baulieu. Neurosteroid Metabolism. 7 alpha-Hydroxylation of Dehydroepiandrosterone and Pregnenolone by Rat Brain Microsomes. *The Biochemical Journal*, 288 (Pt 3):959–964, 1992.
- [113] J. Doostzadeh, P. Urban, D. Pompon, and R. Morfin. Pregnenolone-7 β -Hydroxylating Activities of Yeast-Expressed Mouse Cytochrome P450-1A1 and Mouse-Tissue Microsomes. *European journal of biochemistry / FEBS*, 242(3):641–647, 1996.
- [114] B. Robinzon, K. K. Michael, S. L. Ripp, S. J. Winters, and R. A. Prough. Glucocorticoids Inhibit Interconversion of 7-hydroxy and 7-oxo Metabolites of Dehydroepiandrosterone: a Role for 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenases? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 412(2):251–258, 2003.
- [115] O. Hennebert, M. Montes, A. Favre-Reguillon, H. Chermette, C. Ferroud, and R. Morfin. Epimerase Activity of the Human 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 on 7-Hydroxylated C19-steroids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 114(1-2):57–63, 2009.

- [116] O. Hennebert, S. Le Mee, C. Pernelle, and R. Morfin. 5 α -Androstane-3 β ,7 α ,17 β -triol and 5 α -Androstane-3 β ,7 β ,17 β -triol as Substrates for the Human 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *Steroids*, 72(13):855–864, 2007.
- [117] O. Hennebert, S. Chalbot, S. Alran, and R. Morfin. Dehydroepiandrosterone 7 α -Hydroxylation in Human Tissues: Possible Interference with Type 1 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-Mediated Processes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 104(3-5):326–333, 2007.
- [118] M.-A. Pelissier, C. Muller, M. Hill, and R. Morfin. Protection Against Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis by Dehydroepiandrosterone and 7 α -Hydroxy-Dehydroepiandrosterone in the Rat. *Steroids*, 71(3):240–248, 2006.
- [119] M. Bicikova, R. Hampl, M. Hill, D. Ripova, P. Mohr, and Z. Putz. Neuro- and Immunomodulatory Steroids and other Biochemical Markers in Drug-Naive Schizophrenia Patients and the Effect of Treatment with Atypical Antipsychotics. *Neuronal Endocrinology Letters*, 32(2):141–147, 2011.
- [120] M. Duskova, K. Simunkova, M. Hill, and L. Starka. 7-hydroxylated Derivatives of Dehydroepiandrosterone as Possibly Related to Menstrual Mood Change in Healthy Women. *Endocrine Regulations*, 45(3):131–137, 2011.
- [121] B. Sedlackova, L. Dusatkova, H. Zamrazilova, P. Matucha, M. Bicikova, and L. Starka. 7-Oxygenated Derivatives of Dehydroepiandrosterone and Obesity. *Prague Medical Report*, 113(2):147–155, 2012.
- [122] A. Quispel, A. Baerheim Svendsen, J. Schripsema, W. J. Baas, C. Erkelens, and J. Lugtenburg. Identification of Dipterocarpol as Isolation Factor for the Induction of Primary

- Isolation of Frankia from Root Nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2(3):107–112, 1989.
- [123] J. S. Mills. 429. The constitution of the Neutral, Tetracyclic Triterpenes of Dammar Resin. *Journal of the Chemical Society*, 0(429):2196–2202, 1956.
- [124] F.-J. Marner, A Freyer, and J. Lex. Triterpenoids from Gum Mastic, the Resin of *Pistacia lentiscus*. *Phytochemistry*, 30(11):3709–3712, 1991.
- [125] J.-Y. Han, H.-S. Hwang, S.-W. Choi, H.-J. Kim, and Y.-E. Choi. Cytochrome P450 CYP716A53v2 Catalyzes the Formation of Protopanaxatriol from Protopanaxadiol During Ginsenoside Biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant & Cell Physiology*, 53(9):1535–1545, 2012.
- [126] Y. Lee, E. C. Glazer, R. F. Wilson, C. D. Stout, and D. B. Goodin. Three Clusters of Conformational States in P450cam Reveal a Multistep Pathway for Closing of the Substrate Access Channel. *Biochemistry*, 50(5):693–703, 2011.
- [127] S. Shibata. Chemistry and Cancer Preventing Activities of Ginseng Saponins and some Related Triterpenoid Comounds. *Journal of Korean Medicinal Science*, 16(16):28–37, 2001.
- [128] K. Wang, C. Sun, X. Wu, and Y. Pan. Novel Bioactive Dammarane Caffeoyle Esters from *Celastrus rosthornianus*. *Planta Medica*, 72(4):370–372, 2006.
- [129] H. Bode, B. Bethe, R. Höfs, and A. Zeeck. Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature’s Chemical Diversity. *ChemBioChem*, 3(7):619–627, 2002.
- [130] D. Zehentgruber, F. Hannemann, S. Bleif, R. Bernhardt, and S. Lütz. Towards Preparative Scale Steroid Hydroxylation with Cytochrome P450 Monooxygenase CYP106A2. *ChemBioChem*, 11(5):713–721, 2010.

-
- [131] M. V. Donova and O. V. Egorova. Microbial Steroid Transformations: Current State and Prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(6):1423–1447, 2012.
- [132] F. O. Utkur, T. Thanh Tran, J. Collins, C. Brandenbusch, G. Sadowski, A. Schmid, and B. Buhler. Integrated Organic-Aqueous Biocatalysis and Product Recovery for Quinaldine Hydroxylation Catalyzed by Living Recombinant *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(7):1049–1059, 2012.

7 Anhang

7.1 NMR-Daten

7 β -Hydroxydipterocarpol: ^1H NMR: (CDCl_3 , 500 MHz), δ 0,90 *s* (3H, 3x H-19); 0,93 *s* (3H, 3x H-18); 0,98 *s* (3H, 3x H-30); 1,03 *s* (3H, 3x H-29); 1,07 *s* (3H, 3x H-28); 1,14 *s* (3H, 3x H-21); 1,22 *m* (H-12a); 1,30 *m* (H-15a); 1,31 *m* (H-9); 1,37 *m* (H-11a); 1,39 *m* (H-1a); 1,46 *m* (H-5); 1,46 *m* (2H, 2x H-22); 1,50 *m* (H-11b); 1,51 *m* (H-16a); 1,59 *m* (H-6a); 1,60 *m* (H, H-6b); 1,61 *m* (H-13); 1,61 *s* (3H, 3x H-27); 1,67 *m* (H-15b); 1,67 *s* (3H, 3x H-26); 1,69 *m* (H-17); 1,77 *m* (H-16b); 1,86 *m* (H-12b); 1,87 *m* (H-1b), 2,04 *m* (2H, 2x H-23); 2,43 *m* (H-2a); 2,46 *m* (H-2b); 3,81 *m* (H-7); 5,10 *tsep* ($J=7$ und 1,5 Hz, H-24). ^{13}C NMR: (CDCl_3 , 125 MHz), δ 9,51 (C-30); 15,94 (C-19); 16,16 (C-18); 17,69 (C-27), 20,98 (C-29); 21,98 (C-11); 22,54 (C-23); 25,22 (C-16); 25,66 (C-21), 25,66 (C-26); 26,72 (C-28), 27,33 (C-12); 28,98 (C-6); 33,93 (C-2); 34,60 (C-15); 36,64 (C-10), 39,44 (C-1); 40,19 (C-22), 43,18 (C-13); 45,89 (C-8); 47,04 (C-4); 48,83 (C-17); 49,55 (C-9), 49,58 (C-14); 52,72 (C-5), 74,52 (C-7), 75,30 (C-20); 125,58 (C-24); 131,72 (C-25); 217,35 (C-3).

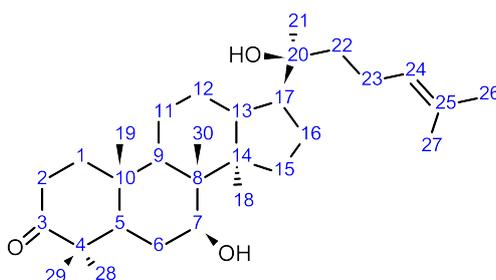


Abbildung 7.1: Aus den NMR-Daten errechnete Strukturformel von 7 β -Hydroxydipterocarpol mit C-Atomnummerierung

7 β -,11 α -Dihydroxydipterocarpol: ^1H NMR: (CDCl_3 , 500 MHz), δ 0,98 *s* (3H, 3x H-18), 1,00 *m* (3H, 3x H-30); 1,04 *s* (3H, 3x H-19); 1,05 *m* (3H, 3x H-29); 1,08 *m* (3H, 3x H-28); 1,15 *s* (3H, 3x H-21); 1,34 *m* (H-15a); 1,39 *m* (H-12a); 1,47 *m* (2H, 2x H-22); 1,48 *m* (H-9); 1,51 *m* (H-16a); 1,59 *m* (H-6a); 1,61 *m* (H-6b); 1,61 *m* (3H, 3x H-27); 1,62 *m* (H-5); 1,62 *m* (H-15b);

1,66 *m* (H-1a); 1,67 *m* (3H, 3x H-26); 1,73 *m* (H-17); 1,78 *m* (H-13); 1,79 *m* (H-16b); 2,04 *m* (2H, 2x H-23); 2,16 *ddd* (J= 12, 5 und 3 Hz, H-12b); 2,37 *ddd* (J= 15, 8,3 und 7 Hz, H-2a); 2,48 *ddd* (J= 15, 9 und 5,7 Hz, H-2b); 2,65 *ddd* (J= 14, 8,3 und 5,7 Hz, H-1b); 3,79 *m* (H-7); 4,01 *ddd* (J= 11, 11 und 5 Hz, H-11); 5,10 *tsep* (J= 7 und 1,5 Hz, H-24). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz), δ 10,32 (C-30); 15,94 (C-18); 16,80 (C-19); 17,72 (C-27); 20,71 (C-29); 22,55 (C-23); 25,55 (C-16); 25,71 (C-26); 25,95 (C-21); 27,54 (C-28); 29,12 (C-6); 34,05 (C-2); 34,45 (C-15); 38,19 (C-10); 2x 39,66 (C-12 und C-22); 41,50 (C-13); 41,59 (C-1); 46,14 (C-8); 47,36 (C-4); 48,74 (C-17); 49,35 (C-14); 52,37 (C-5); 54,60 (C-9); 70,69 (C-11); 74,25 (C-7); 75,17 (C-20); 124,46 (C-24); 131,88 (C-25), 218,09 (C-3).

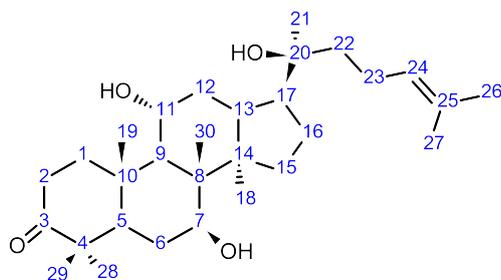


Abbildung 7.2: Aus den NMR-Daten errechnete Strukturformel von $7\beta,11\alpha$ -Dihydroxydipteroicarpol mit C-Atomnummerierung

7β -Hydroxypregnenolon: ^1H NMR: (CDCl_3 , 500 MHz), δ 0,63 *s* (3H, 3 x H-18); 1,03 *s* (3 H, 3 x H-19); 1,06 *m* (H-1a); 1,07 *m* (H-9); 1,27 *m* (H-14); 1,39 *m* (H-12b), 1,40 *m* (H-8); 1,47 *m* (H-11b); 1,50 *m* (H-2b); 1,56 *m* (H-15b); 1,62 *m* (H-11a); 1,70 *m* (H-16b); 1,84 *m* (2x, H-1a, H-2a); 1,92 *m* (H-15a); 2,03 *m* (H-12a); 2,11 *s* (3H, 3x H-21); 2,18 *m* (H-16a); 2,23 *m* (H-4); 2,32 *ddd* (J = 13,5, 5 und 2 Hz, H-7); 2,48 *dd* (J = 9,5 und 9,5 Hz, H-17); 3,53 *m* (H-3); 3,83 *ddd* (J = 8, 2 und 2 Hz, H-7); 5,27 *dd* (J = 2 und 2 Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 13,20 (C-18); 19,14 (C-19); 21,04 (C-11); 23,35 (C-16); 26,68 (C-15); 31,53 (C-2); 31,59 (C-21); 36,58 (C-10); 36,91 (C-1); 38,64 (C-12); 41,09 (C-8); 41,49 (C-4); 44,42 (C-13); 48,12 (C-9); 56,03 (C-14); 63,05 (C-17); 71,36 (C-3); 73,14 (C-7); 125,49 (C-6); 143,49 (C-5); 209,54 (C-20).

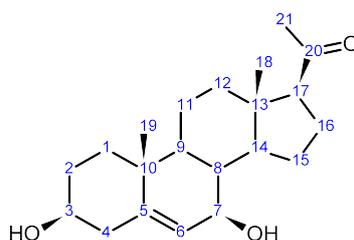


Abbildung 7.3: Aus den NMR-Daten errechnete Struktur von 7β -Hydroxypregnenolon mit C-Atomnummerierung

7β -Hydroxydehydroepiandrosteron: ^1H NMR: (CDCl_3 , 500 MHz), δ 0,88 *s* (3H, 3x H-18); 1,05 (H-1a); *m* 1,06 *s* (3H, 3x-H19); 1,08 *m* (H-9); 1,23 *m* (H-12); 1,42 *m* (H-14); 1,48 *m* (H-11); 1,50 *m* (H-1b); 1,55 *m* (H-8); 1,68 *m* (H-11a); 1,82 *m* (H-12a); 1,83 *m* (H-15b); H 1,84 *m* (H-1a); 1,85 *m* (H-2a); 2,09 *m* (H-16b); 2,22 *m* (H-15a); 2,24 *m* (H-4b); 2,33 *ddd* ($J = 13,5, 5$ und 2, H-4a); 2,45 *m* (H-16a); 3,53 *m* (H-3); 3,93 *ddd* ($J = 8, 2$ und 2, H-7); 5,29 *dd* ($J = 2$ und 2, H-6); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 13,60 (C-18); 19,19 (C-19); 24,21 (C-15); 20,41 (C-11); 31,51 (C-12); 31,51 (C-2); 35,98 (C-16); 36,69 (C-10); 36,90 (C-1); 40,52 (C-8); 41,67 (C-4); 47,78 (C-13); 48,27 (C-9); 51,23 (C-14); 71,27 (C-3); 72,88 (C-7); 125,50 (C-6); 143,75 (C-5); 221,11 (C-17)

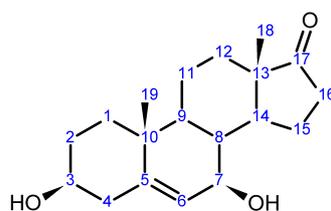


Abbildung 7.4: Aus den NMR-Daten errechnete Strukturformel von 7β -OH-DHEA mit C-Atomnummerierung

7α -Hydroxydehydroepiandrosteron: ^1H NMR: (CDCl_3 , 500 MHz), δ 0,86 *s* (3H, 3x, H-18); 0,99 *s* (3H, 3x H-19); 1,09 *m* (H-1b); 1,25 *m* (H-12b); 1,26 *m* (H-9); 1,48 *m* (H-11b); 1,49 *m* (H-2b); 1,55 *m* (H-15b); 1,64 *m* (H-8); 1,68 *m* (H-11a); 1,77 *m* (H-14); 1,80 *m* (H-12a); 1,83 *m* (H-2a); 1,85 *m* (H-1a); 2,08 *m* (H-15a); 2,12 *m* (H-16b); 2,27 *m* (H-4b); 2,34 *m* (H-4a); 2,45 *m* (H-16a); 3,54 *m* (H-3); 3,94 *dd* ($J = 5$ und 5, H-7); 5,61 *dd* (5 und 2, H-6); ^{13}C NMR (CDCl_3 ,

125 MHz) δ 13,29 (C-18); 18,28 (C-19); 20,09 (C-11); 21,93 (C-15); 31,07 (C-12); 31,30 (C-2); 35,80 (C-16); 36,97 (C-1); 37,22 (C-10); 37,53 (C-8); 41,95 (C-4); 42,62 (C-9); 44,96 (C-14); 47,11 (C-13); 64,28 (C-7); 71,17 (C-3); 123,57 (C-6); 146,57 (C-5); 221,10 (C-17);

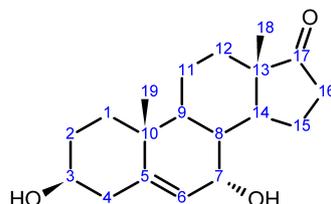


Abbildung 7.5: Aus den NMR-Daten errechnete Strukturformel von 7α -OH-DHEA mit C-Atomnummerierung

7.2 LC-MS Ergebnisse (CNRS, Paris)

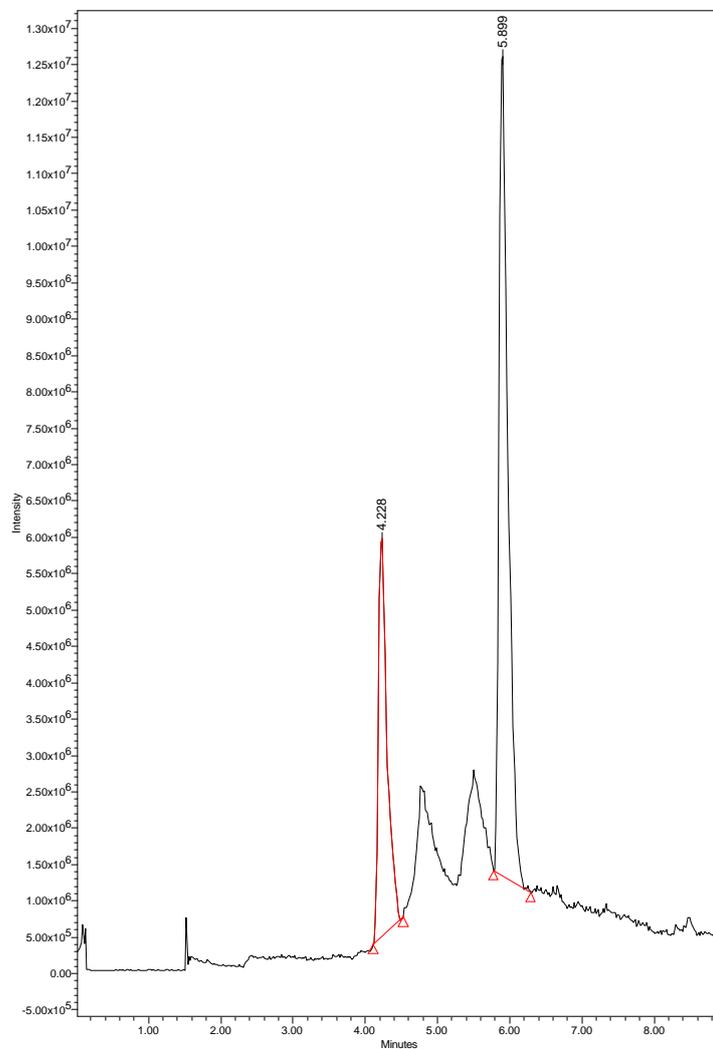


Abbildung 7.6: TIC des Dexamethason *in vitro* Umsatzes

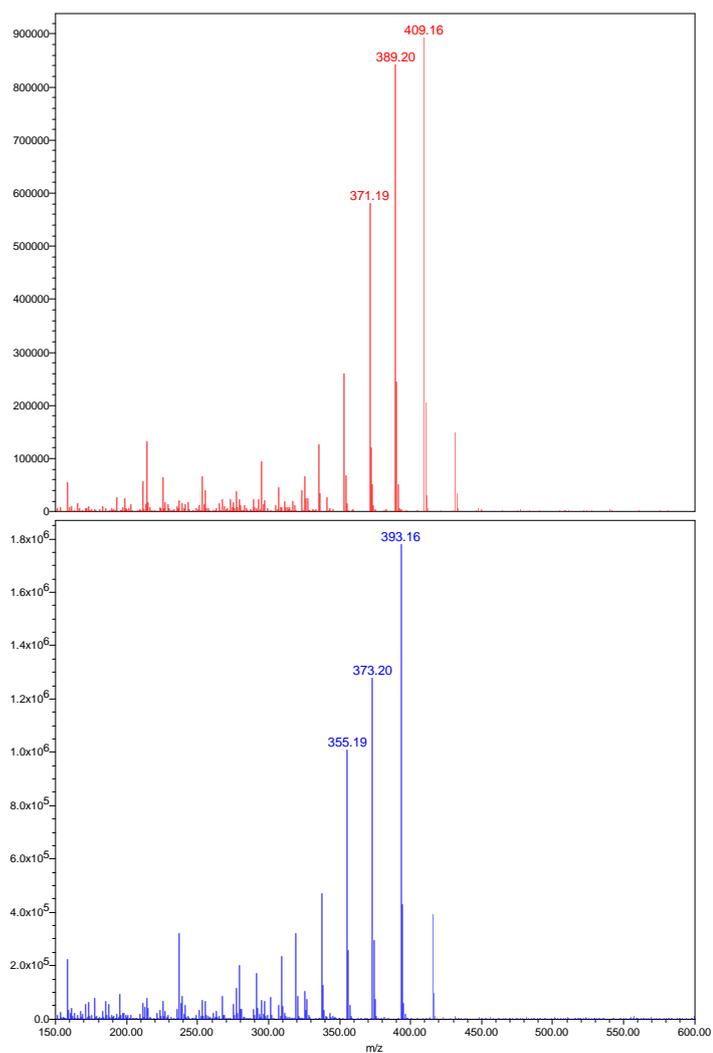


Abbildung 7.7: Aus dem TIC extrahierte Massen des Dexamethasonprodukts (rot) Dexamethaon (blaut)

7.3 Substrate des CYP106A2

Tabelle 7.8: Bekannte CYP106A2 Typ I-Substrate, für die bisher keine Reaktion mit dem Enzym nachgewiesen werden konnte

| Substanz | Referenz |
|---|--------------|
| 19-Hydroxy-4-androsten-3,17-dion | [77] |
| Sarsasapogenin | diese Arbeit |
| Panaxadiol | diese Arbeit |
| Rhamnetin | diese Arbeit |
| Geraldol | diese Arbeit |
| Noscapin | diese Arbeit |
| Alpha-Apo-Oxytetracyclin | diese Arbeit |
| 3-Acetyl-11-Keto- β -Boswelliasäure | [77] |

Tabelle 7.9: Bisher bekannte Substrate von CYP106A2 mit entsprechender Hydroxylierungsposition, sofern bekannt (n.b. = nicht bekannt, Nebenprodukte sind sofern nicht charakterisiert nicht aufgeführt)

| Substrat | Spin-Shift | Hydroxylierungsposition | Referenz |
|-------------------------|------------|-------------------------|----------|
| Deoxycorticosteron | ja | 15 β | [60, 61] |
| 6-Fluoric-16-methyl-DOC | nein | 15 β | [60, 61] |
| Corticosteron | nein | 15 β | [60, 61] |
| Cholestenon | ja | 15 β | [65] |
| Progesteron | nein | 15 β | [65] |
| | | 6 β | [65] |
| | | 9 α | [65] |
| | | 11 α | [65] |

| | | | |
|----------------------------------|------|------------------------|--------------|
| 17 α -Hydroxyprogesteron | nein | 15 β | [60, 61] |
| 20 α -Dihydroprogesteron | nein | 15 β | [60, 61] |
| Androstenedion | ja | 15 β | [60, 61] |
| Testosteron | ja | 15 β | [60, 61] |
| 17 α -Methyltestosteron | nein | 15 β | [78] |
| Abietinsäure | nein | 12 α | [75] |
| | nein | 12 β | |
| 11-Keto- β -boswelliasäure | ja | 15 β | [80] |
| Betulinsäure | ja | n.b. | [77] |
| Oleanonlsäure | ja | n.b. | [77] |
| Ursolsäure | ja | n.b. | [77] |
| Glycyrrhetinsäure | ja | 7 β | [78] |
| Anilin | nein | n.b. | [64] |
| Imipramin | nein | n.b. | [64] |
| 4-Pregnen-20 β -ol-3-on | nein | nb. | [77] |
| Dihydrochinonpimarsäure | ja | n.b. | [77] |
| Ethisteron | nein | n.b. | [77] |
| Digitoxigenin | nein | n.b. | diese Arbeit |
| Prednison | nein | n.b. | diese Arbeit |
| Dexamethason | nein | n.b. | diese Arbeit |
| DHEA | nein | 7 β | diese Arbeit |
| | | 7 α | diese Arbeit |
| Pregnenolon | nein | 7 β | diese Arbeit |
| Dipterocarpol | ja | 7 β | diese Arbeit |
| | | 7 β ,11 α | diese Arbeit |
| Betulin | ja | n.b. | diese Arbeit |

8 Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Schmitz D, Zapp J, Bernhardt R. *Hydroxylation of the triterpenoid dipterocarpol with CYP106A2 from Bacillus megaterium. FEBS J.* 2012 May 279(9):1663-74

Geplante Publikationen:

Schmitz D., Hannemann F., Zapp J., Bernhardt R. *Production of 7-hydroxylated dehydroepiandrosterone and pregnenolone using Bacillus megaterium whole cell catalysis.* Manuskript in Vorbereitung

Schmitz D., Wendt G., Schmitt MJ., Bernhardt. *Influence of 7-hydroxylated steroids on aromatase activity and SH-SY5Y cell viability in vitro.*

Tagungsbeiträge

Schmitz D., Bleif S., Hannemann F., Bernhardt R.: *CYP106A2 - a versatile biocatalyst. 11th international symposium on cytochrome P450 - biodiversity and biotechnology.* Juni 2012 Turin. Kurzvortrag und Posterpräsentation.

Schmitz D., Zapp J., Bernhardt R., *Screening of a natural product library with CYP106A2 from Bacillus megaterium ATCC13368. 17th international conference on cytochrome P450 - biochemistry, biophysics and structure.* Juni 2011 Manchester. Posterpräsentation.