

**Enzymatische Charakterisierung der
humanen Aldosteronsynthase (CYP11B2)
durch *in vitro* Untersuchungen sowie
Homologiemodellierung und Dockingstudien**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von

Anna Hobler

Saarbrücken

April 2013

Tag des Kolloquiums: 22.08.2013

Dekan: Prof. Dr. Volkhard Helms

Berichterstatter: Prof. Dr. Rita Bernhardt
Prof. Dr. Volkhard Helms

Vorsitz: Prof. Dr. Gregor Jung

Akad. Mitarbeiter: Dr. Andreas Neuner

Nur wer sein Ziel kennt, findet den Weg.

Laotse, (6. Jhd. v. Chr.), chin. Philosoph

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VII
Abstract	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Cytochrome P450	1
1.1.1. Entdeckung und Nomenklatur	1
1.1.2. Cytochrom P450-Systeme	2
1.1.3. Katalytischer Reaktionsmechanismus	3
1.1.4. Strukturelle Aspekte der Cytochrome P450	5
1.1.5. Kristallstrukturen und Homologie-Modellierung	7
1.2. Steroidhormonbiosynthese	8
1.3. Das Mineralocorticoid Aldosteron	11
1.3.1. CYP11B2 und die Regulation der Aldosteronbiosynthese	11
1.3.2. Der Mineralocorticoid-Rezeptor	13
1.3.3. Genomische und nicht-genomische Effekte des Aldosterons	14
1.3.4. Störungen der Aldosteronbiosynthese	15
1.3.5. Behandlungsmöglichkeiten und CYP11B2 als Drug Target	17
1.4. Bisherige Arbeiten zur humanen Aldosteronsynthese	18
1.5. Zielstellung dieser Arbeit	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Material	23
2.1.1. Bakterienstämme	23
2.1.2. Plasmide	23
2.1.3. Oligonukleotide	24
2.1.4. Proteine	26
2.1.5. Medien	26
2.1.5.1. Medien für die Anzucht bzw. Regeneration transformierter Zellen	26
2.1.5.2. Kulturmedien für die Expression	26

2.2.	Methoden	27
2.2.1.	Gentechnische Methoden	27
2.2.1.1.	Amplifikation und Klonierung von cDNA	27
2.2.1.2.	Klonierung von humanem Adrenodoxin	28
2.2.1.3.	Klonierung von humaner Adrenodoxin-Reduktase	28
2.2.1.4.	Klonierung eines codon-optimierten Gens für humanes CYP11B2	28
2.2.1.5.	Plasmidpräparation	29
2.2.1.6.	Bestimmung der DNA-Konzentration	29
2.2.1.7.	Ortsgerichtete Mutagenese	29
2.2.1.8.	DNA-Sequenzierung	30
2.2.2.	Mikrobiologische Methoden	30
2.2.2.1.	Präparation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen und Transformation	30
2.2.2.2.	Lagerung von <i>E. coli</i> -Stämmen	30
2.2.2.3.	Expression und Reinigung von humanem CYP11B2	30
2.2.2.4.	Expression und Reinigung von humanem Adrenodoxin	33
2.2.2.5.	Expression und Reinigung von humaner Adrenodoxin-Reduktase	33
2.2.3.	Spektroskopische Methoden	34
2.2.3.1.	Bestimmung der optischen Dichte	34
2.2.3.2.	CO-Differenzspektroskopie	34
2.2.3.3.	Differenzspektroskopie zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten	34
2.2.3.4.	Reduktion von Adx und Fdx2	35
2.2.3.5.	Bestimmung des Redoxpotentials von Adx und Fdx2	35
2.2.4.	Untersuchung der enzymatischen Aktivität	36
2.2.4.1.	CYP11B2-abhängiger <i>in vitro</i> Substratumsatz	36
2.2.4.2.	Fdx2-abhängiger <i>in vitro</i> Substratumsatz	36
2.2.4.3.	Bestimmung der kinetischen Parameter	36
2.2.5.	Analytische Methoden	37
2.2.5.1.	HPLC-Analyse	37
2.2.5.2.	GC-MS Analyse	38
2.2.6.	Bioinformatische Arbeiten	39
2.2.6.1.	Homologie-Modellierung von CYP11B2	39
2.2.6.2.	Molekulares Docking	40
2.2.6.3.	Berechnung der Wasserstoff-Abstraktion	40
3.	Ergebnisse	41
3.1.	Expression von humanem CYP11B2	41
3.1.1.	Optimierung der Expression	41

3.2.	Expression und Reinigung von humanem Adx und humaner AdR	47
3.2.1.	Adrenodoxin	47
3.2.2.	Adrenodoxin-Reduktase	48
3.3.	Elektronentransfer mittels Fdx1 und Fdx2	49
3.4.	Produktidentifizierung der <i>in vitro</i> -Umsätze	54
3.4.1.	HPLC-Analyse	54
3.4.2.	GC/MS-Analyse	56
3.5.	Funktionelle Charakterisierung des CYP11B2	59
3.5.1.	Differenzspektroskopie zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten .	59
3.5.2.	Substratumsätze <i>in vitro</i>	63
3.5.2.1.	Elektronentransfersystem	63
3.5.2.2.	Reaktionspuffer	65
3.5.2.3.	Zeitlicher Verlauf	67
3.5.2.4.	Substratkonzentration	67
3.5.2.5.	Substrat-Lösemittel	69
3.5.2.6.	Bestimmung der kinetischen Parameter	70
3.5.2.7.	Umsatz verschiedener Substrate	71
3.5.2.8.	Einfluss der Reaktions-Intermediate	74
3.5.2.9.	Einfluss verschiedener Inhibitoren	75
3.6.	Bioinformatische Analysen	79
3.6.1.	Homologie-Modellierung	79
3.6.2.	Molekulares Docking	82
3.6.3.	Berechnung der Wasserstoffabstraktionsenthalpie	85
3.7.	Analyse von CYP11B2-Mutanten	86
3.7.1.	Erzeugung der CYP11B2-Mutanten	87
3.7.2.	Substratumsatz	88
3.7.3.	Bestimmung der Dissoziationskonstanten	89
4.	Diskussion	92
4.1.	Expression von CYP11B2 und seiner Redoxpartner	93
4.1.1.	Optimierung der CYP11B2-Expression	93
4.1.2.	Expression und Reinigung der Redoxpartner	95
4.2.	Reaktionsbedingungen im <i>in vitro</i> -System	95
4.3.	Charakterisierung der humanen Aldosteronsynthase	97
4.3.1.	Substratbindung	97
4.3.2.	Einfluss der Redoxpartner Adx und AdR	98
4.3.3.	Die CYP11B2-katalysierte Substratumsetzung	100
4.4.	Homologiemodell und Docking	103

4.5. Potentielle Anwendungsmöglichkeiten des <i>in vitro</i> -Systems	108
4.5.1. Untersuchung potentieller Inhibitoren	108
4.5.2. Funktionelle Analyse von Enzymvarianten	110
4.6. Ausblick	111
Referenzen	115
Appendix	133
A. Expressionsvektoren für <i>E. coli</i>	133
B. Sequenzen	135
B.1. Humane Aldosteronsynthase	135
B.2. Humanes Adrenodoxin	137
B.3. Humane Adrenodoxin-Reduktase	138
C. Alignments	139
D. Publikationen und Konferenzbeiträge	142
Danksagung	143

Abkürzungsverzeichnis

18OH-B	18-Hydroxycorticosteron
18OH-DOC	18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron
19OH-DOC	19-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron
AdR	Adrenodoxin-Reduktase
Adx	Adrenodoxin
ALA	Aminolävulinsäure
Aldo	Aldosteron
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
B	Corticosteron
CMO	Corticosteron-Methyloxidase
CYP11B1	11 β -Hydroxylase
CYP11B2	Aldosteronsynthase
CYP450	Cytochrom P450
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOC	11-Desoxycorticosteron
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GC	Gaschromatographie
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-]-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High performance liquid chromatography</i>)
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>)
int. St.	interner Standard
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kD	Kilodalton
K _D	Dissoziationskonstante
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
M	Molar
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
Ni-NTA	Nickel-Nitrolotriessigsäure
nm	Nanometer

OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SP	Sulfopropyl
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV/Vis	Ultravioletter und visueller Wellenlängenbereich
WT	Wildtyp

Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Zusammenfassung

Die humane Aldosteronsynthase katalysiert die Biosynthese des Aldosterons in der Nebenniere durch sukzessive 11 β - und 18-Hydroxylierung und anschließende 18-Oxidation von 11-Desoxycorticosteron. Aldosteron, das wichtigste Mineralocorticoid im menschlichen Körper, ist an der Regulation des Blutdrucks beteiligt und spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von arteriellem Bluthochdruck, Herzinsuffizienz und myokardialer Fibrose. Diese Tatsache macht das Enzym zu einem interessanten Target für die Entwicklung selektiver Inhibitoren als neue Arzneistoffe.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression des CYP11B2 in *E. coli* optimiert werden, um ausreichende Mengen des Enzyms zur Charakterisierung bereitzustellen. Zudem wurden die humanen Redoxpartner, Adx und AdR, in *E. coli* exprimiert und gereinigt. *In vitro*-Umsätze von 11-Desoxycorticosteron mit CYP11B2 und die Bestimmung der Dissoziationskonstanten zeigten, dass die Stärke der Substratbindung einen entscheidenden Einfluss auf die Produktbildung hat. Zusätzlich wurde der Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf das Produktmuster untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse konnten durch die Erstellung eines Homologie-Modells für CYP11B2 und das Docking der verschiedenen Liganden bestätigt werden. Die Anwendung des in dieser Arbeit etablierten *in vitro*-Systems der humanen Aldosteronsynthase ermöglicht die Charakterisierung potentieller Inhibitoren bezüglich ihrer Wirkung auf den Substratumsatz und die Bestimmung ihre Dissoziationskonstanten.

Abstract

Human aldosterone synthase catalyzes the biosynthesis of aldosterone in the adrenal cortex by successive 11 β - and 18-hydroxylation followed by the subsequent 18-oxidation of 11-deoxycorticosterone. Aldosterone, the major human mineralocorticoid, is involved in the regulation of blood pressure and plays a crucial role in the formation of arterial hypertension, heart failure and myocardial fibrosis. According to this, aldosterone synthase is an important target for developing selective inhibitors as new drugs.

In this work, the expression of CYP11B2 in *E. coli* was optimized to yield sufficient amounts of enzyme for its characterization. Moreover, the human redox partners, Adx and AdR were expressed in *E. coli* and purified to homogeneity. *In vitro*-conversions of 11-deoxycorticosterone by CYP11B2 and the determination of dissociation constants displayed crucial effects on the product formation of the strength of substrate binding. Additionally, influence of several factors on the product pattern has been investigated. The results could be confirmed by docking results of the different ligands into a newly build homology model of CYP11B2. The established *in vitro* system with human aldosterone synthase enables the characterization of potential inhibitors concerning their effects on substrate conversion and the determination of dissociation constants.

1. Einleitung

1.1. Cytochrome P450

Cytochrome P450 stellen eine der ältesten und größten Superfamilien von Enzymen dar, deren Vertreter in allen biologischen Reichen zu finden sind (Degtyarenko und Archakov, 1993). Die Vielfalt ihrer Substrate und die große Diversität der von ihnen katalysierten Reaktionen machen sie seit jeher zu interessanten Untersuchungsobjekten und Werkzeugen der Biowissenschaften.

1.1.1. Entdeckung und Nomenklatur

Mitte der 1950er Jahre beschrieben Klingenberg und Garfinkel unabhängig voneinander die Existenz eines Kohlenstoffmonoxid-bindenden Pigments in den Mikrosomen der Leber von Ratten und Schweinen (Klingenberg, 1958; Garfinkel, 1958). Dieses Pigment zeigte ein ungewöhnliches Absorptionsmaximum bei 450 nm im reduzierten CO-gebundenen Zustand. Omura und Sato identifizierten das Pigment schließlich als Häm-Protein mit einem Eisen-Protoporphyrin IX (Häm *b*) als prosthetischer Gruppe und nannten es "Cytochrom P450" (Pigment (P) mit einem spektralen Absorptionsmaximum bei 450 nm) (Omura und Sato, 1962; Omura und Sato, 1964a; Omura und Sato, 1964b). Im Gegensatz zu anderen Cytochromen, bei denen ein Histidin den axialen Ligand am zentralen Eisen des Häms bildet, wird bei den Cytochromen P450 das charakteristische Absorptionsmaximum durch die Interaktion des Häm-Eisens mit einem Thiolat-Anion eines Cysteins hervorgerufen. Dieses Cystein ist absolut konserviert innerhalb der Familie der Cytochrome P450 (Sono *et al.*, 1996; Omura, 2005).

Wie eingangs erwähnt, bilden Cytochrome P450 eine Superfamilie von Häm-Thiolat-Proteinen, die in diversen Organismen vorkommen, so in Säugetieren, Pflanzen, Pilzen, Fischen, Würmern, Insekten, Bakterien und sogar in Viren. Zurzeit sind 12.456 Cytochrome P450 benannt und in mehr als 1000 Familien eingeordnet. Mehr als 6000 dieser P450 sind bekannt, wurden bisher aber noch nicht näher charakterisiert (<http://drnelson.uthsc.edu/Cyto->

chromeP450.html) (Nelson, 2011). Beim Mensch sind 57 Cytochrome P450 bekannt, die in 18 Familien und 43 Unterfamilien eingeordnet sind (Stark und Guengerich, 2007).

Die enorme Zahl an Cytochromen P450 verlangt nach einer systematischen Nomenklatur, die auf der Sequenzidentität der P450-Gene basiert (Nebert *et al.*, 1987). Dabei werden die Gene und Enzyme zunächst mit der Abkürzung CYP für **C**ytochrom **P**450 kennzeichnet. Daran schließt sich eine arabische Nummer an, die die Genfamilie angibt, sowie ein Großbuchstabe für die Unterfamilie. Die letzte Ziffer gibt schließlich das individuelle Gen an (siehe Abb. 1.1). Die Sequenzidentität beläuft sich dabei auf mehr als 40 % innerhalb einer Familie und mehr als 55 % innerhalb einer Unterfamilie.

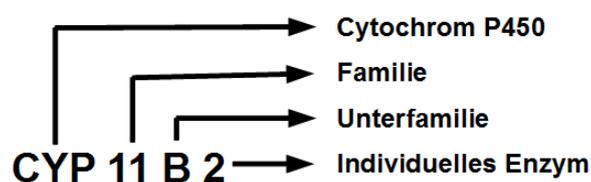
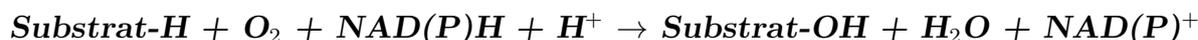


Abb. 1.1.: Nomenklatur der Cytochrome P450 am Beispiel von CYP11B2.

1.1.2. Cytochrom P450-Systeme

Die Cytochrome P450 gehören zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen und werden hier wiederum in die Gruppe der Oxygenasen eingeteilt (E. C. 1.14.-.-), d. h. sie katalysieren die Spaltung von molekularem Sauerstoff, wobei ein Sauerstoffatom in das Substrat inkorporiert und das andere zu Wasser reduziert wird. Da Cytochrome P450 die für diese Reaktion benötigten Elektronen von einem externen Elektronendonator (NAD(P)H) beziehen, werden sie den externen Monooxygenasen zugeordnet (Hayaishi und Nozaki, 1969; Bernhardt, 1996). Allgemein lassen sich P450-katalysierte Reaktion wie folgt darstellen:



Da Cytochrome P450 nicht direkt mit dem primären Elektronendonator interagieren können, der die benötigten Reduktionsäquivalente liefert, sind noch ein oder zwei weitere Proteine für die Übertragung der Elektronen von NAD(P)H auf das Cytochrom erforderlich. Je nach Art ihres Elektronentransportsystems werden die Cytochrome P450 in eine von bisher zehn bekannten Klassen eingeteilt (Hannemann *et al.*, 2007). Alle menschlichen Cytochrome P450 gehören zu einer der beiden Hauptklassen: die bakteriell-mitochondrialen (Klasse I) bzw. die mikrosomalen (Klasse II) P450-Systeme. Dabei spielen die mitochondrialen Cytochrome P450 eine entscheidende Rolle in der Biosynthese von Steroidhormonen, Vitamin D

und Gallensäure, während die mikrosomalen Cytochrome P450 in den Metabolismus endo- und exogener Substanzen involviert sind (Fettsäuren, Prostaglandine, Wirkstoffe, Fremdstoffe) (Hasler *et al.*, 1999). In Klasse I werden die Elektronen von NAD(P)H durch eine FAD-haltige Ferredoxin-Reduktase (FdR) auf ein Eisen-Schwefel-Protein, Ferredoxin (Fdx), und von dort auf das Cytochrom P450 übertragen. Im bakteriellen System liegen alle drei Proteine in gelöster Form im Cytosol vor. Das Ferredoxin des mitochondrialen Systems ist ebenfalls löslich, allerdings ist die Reduktase an die innere Mitochondrienmembran assoziiert und das Cytochrom P450 ist membrangebunden (siehe Abb. 1.2). Der Elektronentransfer im mikrosomalen System erfolgt von NADPH über eine Cytochrom P450-Reduktase, die sowohl FAD als auch FMN als prosthetische Gruppe besitzt, auf das Cytochrom P450. Beide Proteine sind dabei in die Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert. Darüberhinaus gibt es eine Reihe weiterer Elektronentransportsysteme, bei denen die Proteine teilweise fusioniert vorliegen und auch andere Proteine an der Elektronenübertragung beteiligt sind. Diese Systeme kommen vor allem in Bakterien vor und sind nicht Gegenstand dieser Arbeit (Hannemann *et al.*, 2007).

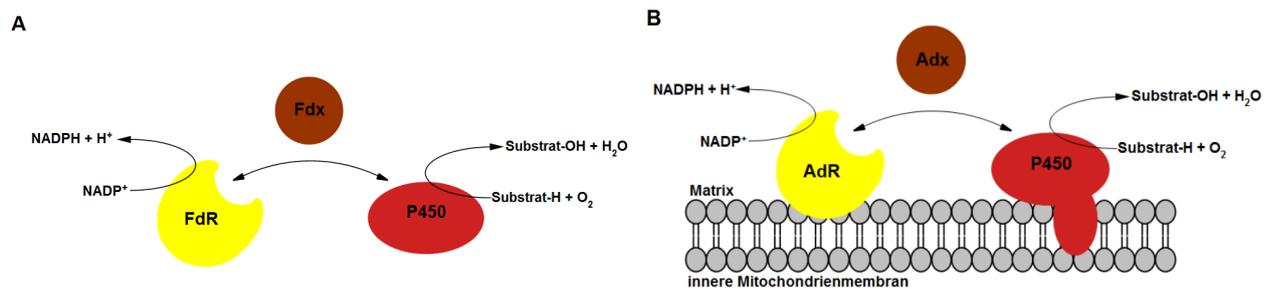


Abb. 1.2.: Schematische Darstellung der Elektronentransportsysteme der Klasse I: **A.** bakterielles System mit ausschließlich löslichen Transferproteinen, **B.** mitochondriales System mit membranassoziierter Ferredoxin-Reduktase (FdR), löslichem Ferredoxin (Fdx) und membrangebundenem Cytochrom P450 (P450) (nach Hannemann *et al.*, 2007).

1.1.3. Katalytischer Reaktionsmechanismus

Der Reaktionszyklus der Cytochrome P450 (Abb. 1.3) läuft in mehreren Schritten ab: im freien Enzym befindet sich das Eisen (Fe^{3+}) des Häms im *low-spin* Zustand, in dem an die sechste Koordinationsstelle ein Wassermolekül gebunden ist (1). Dieses wird durch die Bindung eines Substrates (RH) im aktiven Zentrum verdrängt und geht in den *high-spin* Zustand über (2). Dadurch wird das Reduktionspotential erhöht und das Fe^{3+} kann durch die Aufnahme des ersten Elektrons leichter zu Fe^{2+} reduziert werden (3). Die Bindung von molekularem Sauerstoff führt zur Bildung eines relativ stabilen Zwischenproduktes (Oxy-P450-Komplex) und das Eisen kehrt in den *low-spin* Zustand zurück (4). Die Aufnahme eines zweiten Elektrons führt zur Reduktion dieses Komplexes zu einem Peroxo- Fe^{3+} -Zwischenprodukt (5a), welches zu einem Hydroperoxo- Fe^{3+} -Zwischenprodukt protoniert wird (5b). Eine zweite Protonierung

am distalen Sauerstoffatom sowie die Spaltung der O-O-Bindung resultiert in *Compound I* unter Abspaltung eines Wassermoleküls (6). Das verbleibende Sauerstoffatom der *Compound I* wird in einem sogenannten *Rebound*-Mechanismus auf das Substrat übertragen (7) (Ortiz de Montellano, 2010). Schließlich wird das hydroxylierte Produkt freigesetzt, das Häm kehrt in seinen Ausgangszustand zurück und das Enzym steht für eine neue Reaktion zur Verfügung (Denisov *et al.*, 2005).

An drei Positionen des Zyklus können sogenannte Entkopplungsreaktionen ablaufen, die zwar Reduktionsäquivalente verbrauchen, aber nicht zur Vollendung der eigentlichen Reaktion, d. h. der Oxygenierung des Substrates, führen. Stattdessen resultieren diese Reaktionen wieder im Substrat-Enzym-Komplex im *high-spin* Zustand (2): Autoxidation des Oxy-P450-Komplexes (4) mit Bildung eines Superoxidanions (*autoxidation shunt*), Abspaltung eines Peroxids vom Hydroperoxo-Fe³⁺-Intermediat (*peroxide shunt*) bzw. Oxidation des *Compound I* und Bildung eines Wassermoleküls (*oxidase shunt*).

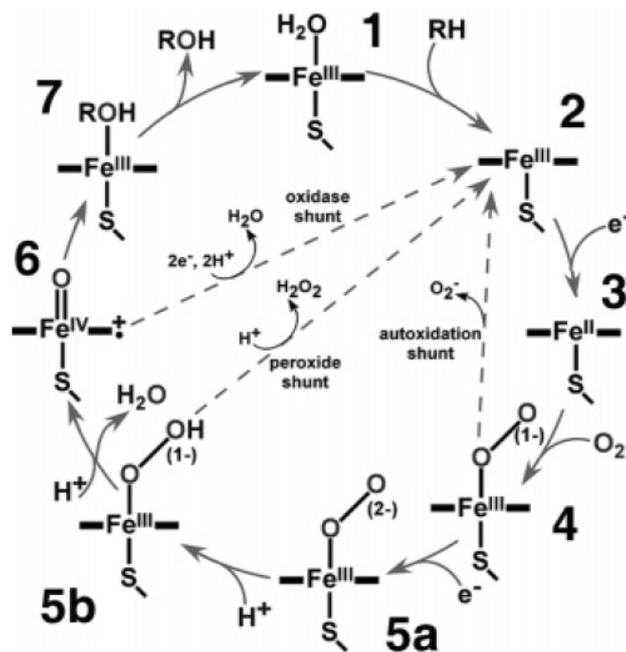


Abb. 1.3.: Der katalytische Reaktionszyklus der Cytochrome P450 (Denisov *et al.*, 2005). RH = Substrat in reduzierter Form, ROH = Substrat in oxidiert Form.

Die große Vielfalt der von Cytochromen P450 katalysierten Reaktionen umfasst diverse Hydroxylierungen, N-, O-, S-Desalkylierungen, N-Oxidreduktionen, Epoxidationen, Desaminierungen, Dehalogenierungen usw. Ebenso akzeptieren diese Enzyme eine Anzahl unterschiedlicher Substrate wie z. B. Fettsäuren, Steroide, Prostaglandine, verschiedene Wirkstoffe, Anästhetika, organische Lösemittel, Ethanol, Pestizide und mehr (Bernhardt, 1996; Bernhardt, 2006). Damit spielen Cytochrome P450, physiologisch gesehen, eine wichtige Rolle im Metabolismus vieler Wirkstoffe und Xenobiotika. Die Schlüsselrolle dieser Enzyme in der Biotransformation von Wirkstoffen und Steroiden wurde bereits in den 60er Jahren expe-

rimentell bewiesen (Estabrook *et al.*, 1963). Weiterhin sind sie für die Anwendung in der Biotechnologie unentbehrliche Werkzeuge geworden, die viele Prozesse ermöglichen, bei denen chemische Syntheseschritte ihre Grenzen erreichen. Die Untersuchung der P450-Systeme erstreckt sich daher auf viele unterschiedliche Forschungsbereiche: Pharmakologie, Toxikologie, Endokrinologie, Physiologie, Mikrobiologie, organische Chemie, Pflanzenbiologie, Umweltwissenschaften (Bernhardt, 2006).

1.1.4. Strukturelle Aspekte der Cytochrome P450

Cytochrome P450 akzeptieren ein breites Spektrum strukturell sehr unterschiedlicher Substrate, interagieren mit verschiedenen Redoxpartnern und liegen entweder als lösliche oder membrangebundene Proteine vor. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Sequenzidentität dieser Enzyme untereinander oft weniger als 20 % beträgt. Die stetig wachsende Zahl der Kristallstrukturen der P450 zeigt jedoch, dass trotz dieser Varianz die dreidimensionale Struktur dieser Enzyme hochkonserviert ist (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000). Eine schematische Darstellung der generellen P450-Topologie ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

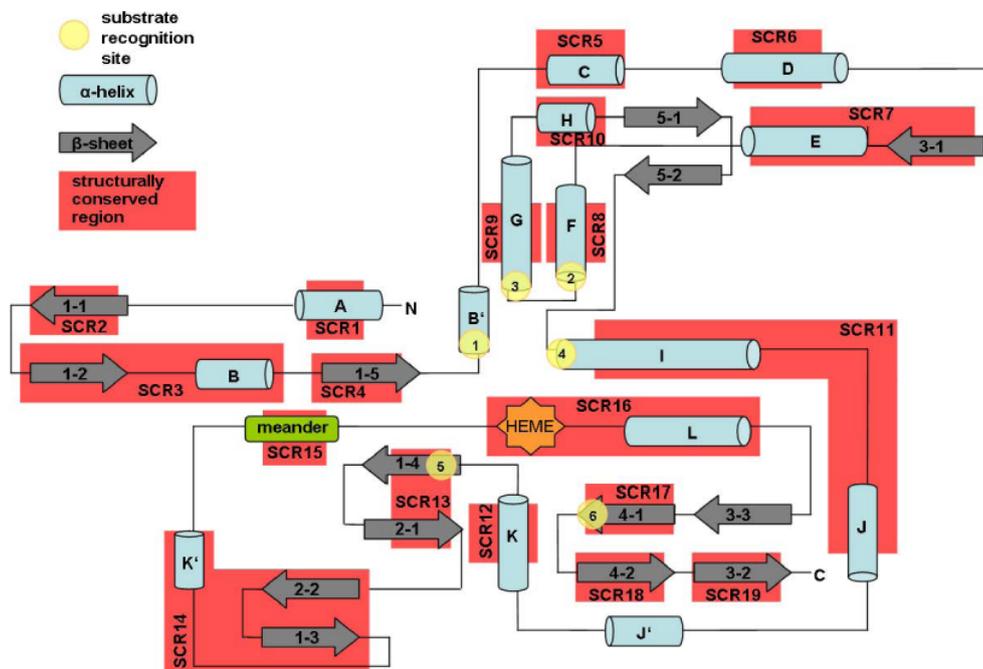


Abb. 1.4.: Schematische Darstellung der Topologie der Cytochrome P450. α -Helices sind als hellblaue Röhren, β -Faltblätter als graue Pfeile dargestellt. Die gelben Kreise kennzeichnen die sechs Substraterkennungsstellen (SRS). Strukturell konservierte Bereiche sind rot markiert (Sirim *et al.*, 2010).

Der am höchsten konservierte Bereich betrifft die Struktur, die das Häm umgibt, und lässt auf einen gemeinsamen Mechanismus des Elektronen- und Protonentransfers sowie der Sauerstoffaktivierung schließen. Diese Kern-Struktur besteht aus einem vier Helix-Bündel (D-, E-, I-, und L-Helix), zwei β -Faltblättern (β 1 und 2), den Helices J und K, sowie dem sogenannten *Meander-Loop* (Peterson und Graham, 1998; Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000). Die Häm-Bindestelle mit dem konservierten Sequenzmotiv F-X-X-G-X-R-X-C-X-G liegt vor der L-Helix und enthält das absolut konservierte Cystein, das den 5. Liganden des Häm-Eisens bildet. Helix K enthält ebenfalls ein absolut konserviertes Motiv (E-X-X-R), welches vermutlich der Stabilisierung der Kernstruktur dient. Die lange I-Helix erstreckt sich durch die ganze P450-Struktur und macht einen leichten Knick in der Nähe des Häms. In diesem zentralen Teil der Helix befindet sich einer der am höchsten konservierten Bereiche mit der Konsensussequenz [ASTG]-[ASTG]-X-[DEQN]-T-[ASTG]¹. Dieses Motiv enthält ein absolut konserviertes Threonin, von dem angenommen wird, dass es ein Sauerstoffmolekül in der axialen Position über dem Häm ausrichtet und den Protonentransfer während des katalytischen Zyklus erleichtert. Die beiden β -Faltblätter (β -sheet 1 und 2) dienen der Ausbildung eines hydrophoben Substratzugangskanals (Peterson und Graham, 1998; Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000; Otyepka *et al.*, 2007).

Als Kontrast zu den hochkonservierten Bereichen gibt es in den Cytochromen P450 auch Regionen mit hoher Variabilität. An diesen Stellen findet die Substraterkennung statt. Diese sogenannten Substraterkennungsstellen (*substrate recognition site*, SRS) sind nahe des Substrateingangskanals am aktiven Zentrum lokalisiert und liegen im BC-Loop (SRS1), am C-terminalen Ende der Helix F (SRS2), in den N-terminalen Bereichen der Helices G (SRS3) und I (SRS 4) sowie in den β -Strängen 1-4 (SRS 5) und 4-1 (SRS 6) (Gotoh, 1992; Peterson und Graham, 1998; Sirim *et al.*, 2010). Da die Substraterkennungsstellen eine hohe Sequenzvariabilität aufweisen, ist die genaue Zuordnung der Residuen einer SRS in einem Cytochrom P450 relativ schwierig. Kürzlich konnten jedoch zwei *Hotspots* identifiziert werden, die eine Schlüsselerolle in der regio- und stereoselektiven Aktivität des CYP102A1 spielen. Dabei handelt es sich um eine Aminosäure in SRS 5 und eine Aminosäure im BC-Loop (F87) (Urlacher *et al.*, 2006; Seifert und Pleiss, 2009). Die mögliche Veränderung der Regio- und Stereoselektivität ist besonders interessant für die Anwendung der Cytochrome P450 in biotechnologischen Prozessen, um das Substrat- und Produktspektrum zu erweitern bzw. gezielt zu verändern (Nguyen *et al.*, 2012).

Ein weiteres wichtiges Merkmal in der Struktur der Cytochrome P450 bilden die F- und die G-Helix sowie der FG-Loop. Diese Bereiche kontrollieren zusammen mit dem BC-Loop den Zugang zum aktiven Zentrum (Otyepka *et al.*, 2007). Insbesondere definieren diese Strukturen wichtige Kanäle für den Substratzugang und die Produktfreisetzung (Cojocaru *et al.*,

¹Eckige Klammern geben die Aminosäuren an, die an dieser Position möglich sind.

2007). Eukaryotische Cytochrome P450 sind, im Gegensatz zu den prokaryotischen, meist membrangebunden und befinden sich entweder in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (mikrosomale P450) oder in der zur Matrixseite gewandten inneren Mitochondrienmembran (P450 der Steroid- und Gallensäuresynthese). Die membrangebundenen Cytochrome P450 weisen dabei eine relativ lange Verbindung zwischen der F- und der G-Helix auf, so dass dort häufig zwei zusätzliche Helices (F' und G') zu finden sind. Über hydrophobe Residuen in diesem Bereich und eine N-terminale Helix werden die Proteine in der Membran verankert. Durch die Insertion der G'-Helix und des FG-Loops in die Membran wird ein Zugangskanal in diese geleitet, wodurch hydrophobe Substrate, wie z. Bsp. Steroide, von der Membran aus das aktive Zentrum erreichen können. Ebenso können hydrophobe Produkte von der Proteinbindetasche in die Membran oder hydrophile Produkte über andere Kanäle ins Cytoplasma entlassen werden (Denisov *et al.*, 2012; Otyepka *et al.*, 2007; Cojocaru *et al.*, 2007).

1.1.5. Kristallstrukturen und Homologie-Modellierung

Die erste Kristallstruktur eines Cytochroms P450 wurde 1985 von Poulos *et al.* beschrieben, wobei es sich um das bakterielle CYP101 (P450cam) handelte. Der Fortschritt in der Entwicklung der rekombinanten Proteinexpression in *E. coli* führte zu einer stetig wachsenden Zahl an P450-Kristallstrukturen, die jedoch lange Zeit auf lösliche P450 begrenzt war. Die Strukturaufklärung eukaryotischer Cytochrome P450 gestaltet sich sehr schwierig, da diese Enzyme membrangebunden und somit schwer zu exprimieren und zu kristallisieren sind. Um die Kristallisation zu erleichtern muss die Löslichkeit der Proteine erhöht werden, wobei der N-terminale Membrananker durch eine hydrophilere Sequenz ersetzt wird. So konnte im Jahr 2000 die Struktur von CYP2C5 aus *Oryctolagus cuniculus* (Kaninchen) aufgeklärt werden, welche die erste P450-Struktur eines Säugetiers ist (Williams *et al.*, 2000). Die erste humane P450-Struktur wurde 2003 durch Williams *et al.* gelöst. Dabei handelt es sich um CYP2C9, ein mikrosomales P450 der Leber, welches eines der wichtigsten Enzyme im Wirkstoff-Metabolismus darstellt. Dagegen konnte die erste Struktur eines mitochondrialen P450 erst 2009 bestimmt werden (Annalora *et al.*, 2010). Mit dieser Struktur des CYP24A1, das in den Vitamin D-Metabolismus involviert ist, konnten die Autoren einen ersten Einblick für das Verständnis der Membraninsertion, der Substratbindung und der Interaktion mit Redoxpartnern in dieser P450-Klasse geben.

Von den sechs Cytochromen P450, die an der Steroidhormonbiosynthese beteiligt sind (siehe Abb. 1.6), konnten in kürzester Zeit die Strukturen von CYP19 (Ghosh *et al.*, 2009), CYP11A1 (Strushkevich *et al.*, 2011; Mast *et al.*, 2011), CYP21 (Zhao *et al.*, 2012) und CYP17 (DeVore und Scott, 2012) aufgelöst werden. Die Kristallstruktur der humanen Al-

dosteronsynthese wurde erst während der Fertigstellung dieser Arbeit veröffentlicht (Strushkevich *et al.*, 2013). Zuvor konnten zur strukturellen Untersuchung von CYP11B2 und dem verbleibenden steroidbildenden CYP11B1 nur Homologie-Modelle herangezogen werden (Belkina *et al.*, 2001; Ulmschneider *et al.*, 2005a; Roumen *et al.*, 2007).

1.2. Steroidhormonbiosynthese

Steroidhormone bilden, neben den Protein-/Peptidhormonen und den Aminosäurederivaten, eine der 3 Hauptklassen von Hormonen. Als Vorläufer-Molekül für die Synthese, sowohl von Steroidhormonen als auch von Gallensäuren und Vitamin D, dient Cholesterol (Abb. 1.5), das ein wichtiger Bestandteil der Zellmembran ist (Kleine und Rossmanith, 2009; Berg *et al.*, 2003).

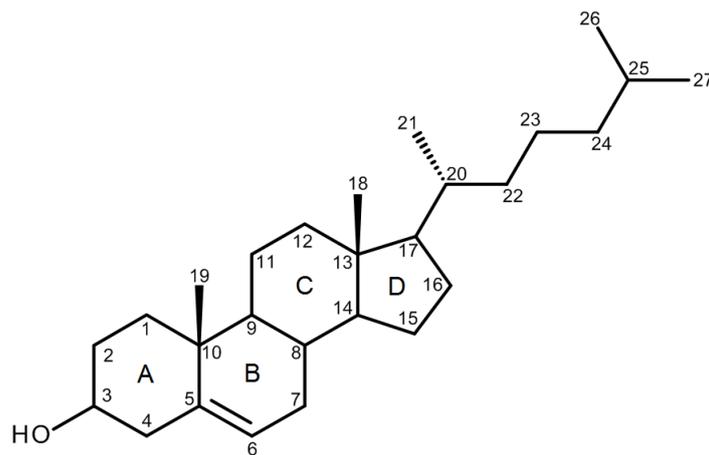


Abb. 1.5.: Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel des Cholesterols.

Cholesterol stellt die Grundstruktur bereit, das Steran, von dem sich die Steroide ableiten und das aus vier Kohlenstoffringen (Ringe A-D in Abb. 1.5) aufgebaut ist. Cholesterol muss für die Bildung der Steroidhormone entweder, ausgehend von Acetyl-CoA, über eine Vielzahl enzymatischer Reaktionen, *de novo* synthetisiert oder aus Lipoproteinpartikeln (*low density lipoproteins*, LDL) entnommen werden, welche zum Transport des Cholesterols im Blut dienen (Berg *et al.*, 2003; Miller und Auchus, 2011). In den Zellen der Steroidhormonbiosynthese wird Cholesterol zunächst mit Hilfe des StAR-Proteins (*Steroidogenic acute regulatory protein*) von der äußeren in die innere Mitochondrienmembran transportiert, wo der erste Schritt der Steroidhormonsynthese stattfindet (Kleine und Rossmanith, 2009; Bernhardt und Waterman, 2007).

Die Steroidhormone, die sich in 5 Hauptklassen einteilen lassen (Tab. 1.1), werden durch eine Reihe enzymatischer Reaktionen gebildet, an der bis zu sechs Cytochrome P450 beteiligt sind: CYP11A1, CYP17, CYP19, CYP21 sowie CYP11B1 und CYP11B2. Des Weiteren sind zwei Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (3β -HSD und 17β -HSD) und die 5α -Reduktase in die komplexen Biosynthese der Steroidhormone involviert (Abb. 1.6). Die beteiligten Enzyme sind in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert, entweder in der inneren Mitochondrienmembran (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2) oder dem glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) (Bernhardt und Waterman, 2007; Miller und Auchus, 2011).

Tab. 1.1.: Klassifizierung der Steroidhormone. Angegeben sind die wichtigsten Vertreter jeder Gruppe sowie deren Aufgabe und Syntheseort (Berg *et al.*, 2003).

Klasse	Beispiel	Funktion	Syntheseort
Gestagene	Progesteron	Regulation des weibl. Zyklus, Schwangerschaftserhaltung	Corpus luteum, Plazenta
Glucocorticoide	Cortisol	Energiebereitstellung, Immunreaktion	Nebenniere
Mineralocorticoide	Aldosteron	Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes	Nebenniere
Androgene	Testosteron	Ausbildung der männl. Geschlechtsmerkmale	Testes
Östrogene	Östron	Ausbildung der weibl. Geschlechtsmerkmale	Ovarien

In den Mitochondrien katalysiert CYP11A1 zunächst die Hydroxylierung am C20 und C22 des Cholesterols sowie die anschließende oxidative Spaltung der C-C-Bindung, die die Seitenkette entfernt und zur Bildung von Pregnenolon führt. Diese Reaktionen stellen den geschwindigkeitslimitierenden Schritt der Steroidhormonsynthese dar (Bernhardt und Waterman, 2007). Die nachfolgenden Reaktionen finden im ER statt, wo CYP17 eine 17α -Hydroxylierung und eine $17,20$ -Lyase-Reaktion katalysiert, gefolgt von einer Oxidation am C3 und der Umlagerung der Doppelbindung durch die 3β -HSD. Hierbei entsteht Androstendion, das als Ausgangssubstrat für die Synthese der weiblichen und männlichen Sexualhormone in den Gonaden dient.

Für die Synthese der Mineralo- und Glucocorticoide erfolgt zunächst eine C21 Hydroxylierung des Progesterons bzw. 17 -Hydroxyprogesterons im ER, nach der die Produkte zurück in die Mitochondrien transportiert werden. Ausgehend von 11 -Desoxycorticosteron bzw. 11 -Desoxycortisol entstehen schließlich die Hauptvertreter dieser beiden Steroidklassen, Aldosteron und Cortisol, die in den Nebennieren gebildet werden.

1.2. STEROIDHORMONBIOSYNTHESE

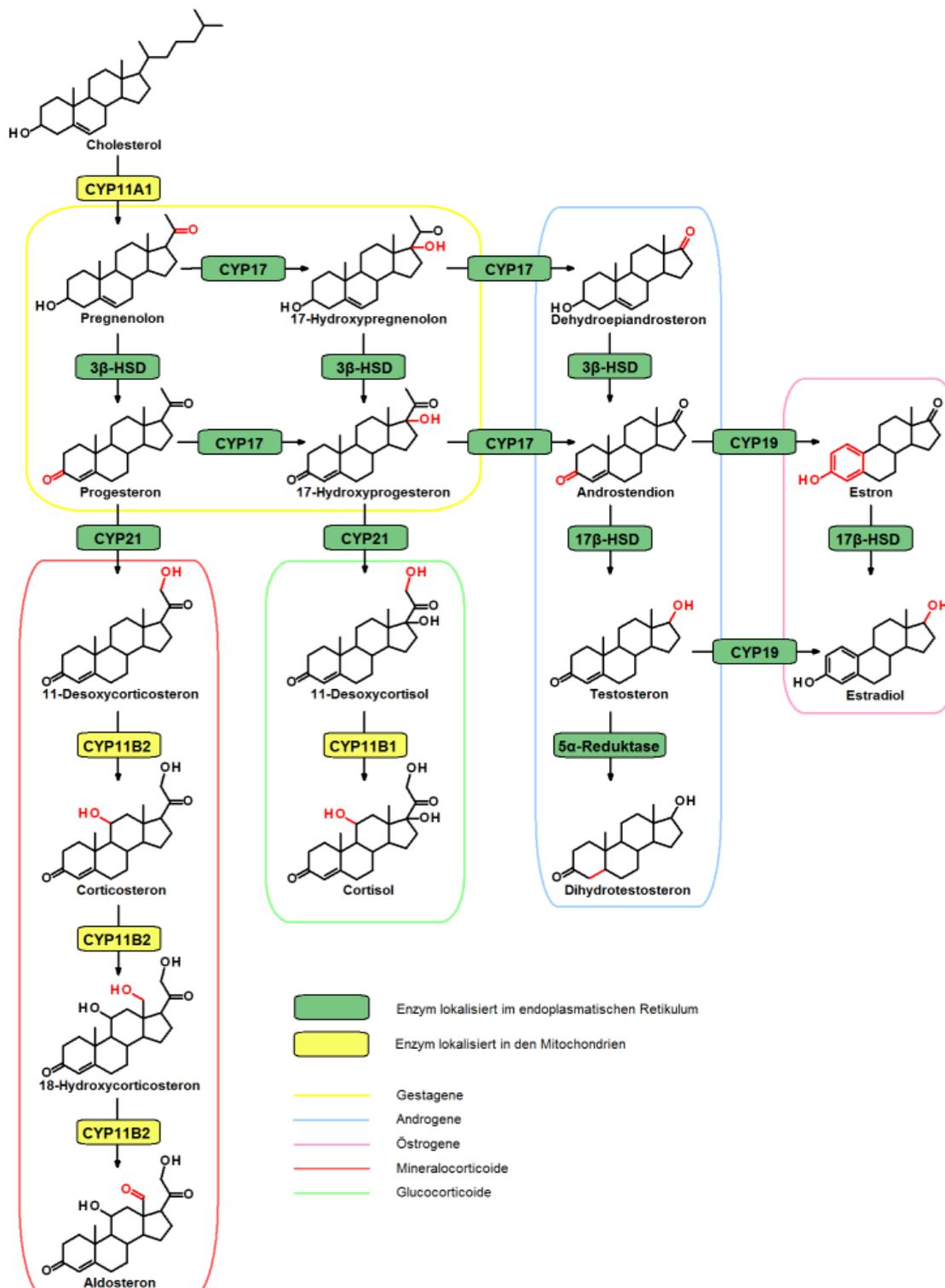


Abb. 1.6.: Biosynthese der Steroidhormone. Die Biosynthese erfolgt ausgehend von Cholesterol durch mehrere Cytochrome P450, sowie zwei Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (3 β -HSD und 17 β -HSD) und eine Steroid-Reduktase (5 α -Reduktase). Diese Enzyme sind entweder im endoplasmatischen Retikulum oder in den Mitochondrien lokalisiert. Die Steroidhormone der einzelnen Klassen sind farbig umrandet (nach Bernhardt und Waterman, 2007).

Die Nebennieren (*Glandulae adrenalis*) sitzen wie Kappen den Polen der Nieren auf und bestehen aus dem Nebennierenmark (*Medulla*), der -rinde (*Cortex*) sowie einer Kapsel (Abb. 1.7). Die Nebennierenrinde besteht aus drei Schichten, in denen jeweils unterschiedliche Steroidhormone gebildet werden. Die innere, direkt an die Medulla grenzende Schicht wird als *Zona reticularis* bezeichnet. Hier werden überwiegend Androgene (DHEA, Androstendion), aber auch Cortisol gebildet. In den Zellen der darüberliegenden *Zona fasciculata* erfolgt die Synthese der Glucocorticoide, allen voran Cortisol, durch die Anwesenheit von CYP17 und CYP11B1. Die Bildung der Glucocorticoide steht unter der Kontrolle des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus der Hypophyse. Die äußere Schicht ist die *Zona glomerulosa*, in der CYP11B2 exprimiert wird, welches für die Synthese der Mineralocorticoide verantwortlich ist und als Hauptprodukt Aldosteron bildet.

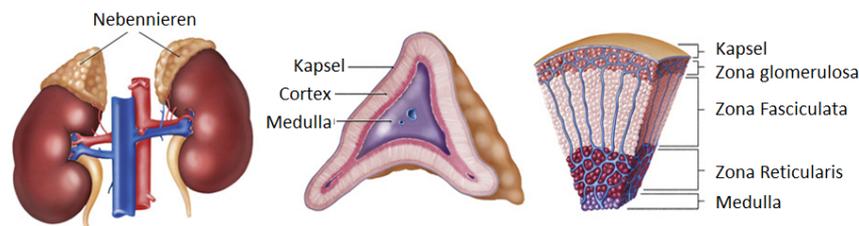


Abb. 1.7.: Aufbau der Nebennierenrinde².

1.3. Das Mineralocorticoid Aldosteron

Aldosteron ist das wichtigste Mineralocorticoid im menschlichen Körper und ist an der Aufrechterhaltung der Salz- und Wasser-Homöostase beteiligt. Somit spielt es eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Blutdrucks. Aldosteron entsteht ausgehend von 11-Desoxycorticosteron durch eine Hydroxylierung in 11 β -Position, sowie eine Hydroxylierung und eine anschließende Oxidation an Position 18. Diese drei Reaktionen werden von einem einzigen Enzym, der Aldosteronsynthase (CYP11B2), katalysiert.

1.3.1. CYP11B2 und die Regulation der Aldosteronbiosynthese

Das *CYP11B2*-Gen befindet sich auf dem Chromosom 8, Region q22 und besteht aus neun Exons und acht Introns, die sich über eine Länge von etwa 7,2 kbp erstrecken (Mornet *et al.*, 1989). CYP11B2 wird zunächst als Protein mit 503 Aminosäuren exprimiert, wobei die

²Quelle: <http://www.georgiahealth.edu/medicine/phy/raineylab/objective.html>

mitochondriale Signal-Sequenz von 24 Aminosäuren bei der Inkorporation in die innere Mitochondrienmembran abgespalten wird. Das reife Enzym besteht dann aus 479 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 48,5 kDa. Im Gegensatz zu CYP11B1, das die Synthese des Cortisols katalysiert, wird CYP11B2 nur in geringen Mengen exprimiert. Es wurde beobachtet, dass die Expression des Enzyms in den Glomerulosa-Zellen sowohl sporadisch als auch häufig in sogenannten Aldosteron-produzierenden Zellclustern (*aldosterone-producing cell clusters, APCC*) erfolgt (Nishimoto *et al.*, 2010).

Trotz einer Primärsequenzidentität von 93 % (29 von 479 Residuen sind nicht identisch) unterscheiden sich CYP11B1 und CYP11B2 in ihrer enzymatischen Aktivität. Während CYP11B1 Hydroxylierungen an den Positionen 11 β , 18 und 19 des Steroidgerüsts katalysiert, besitzt CYP11B2 zusätzlich eine 18-Oxidase-Funktion (Nonaka *et al.*, 1998).

Interessanterweise sind die beiden Enzyme nicht in allen Gattungen vertreten. In Mensch (Mornet *et al.*, 1989), Maus (Domalik *et al.*, 1991), Ratte (Matsukawa *et al.*, 1990), Meer-schweinchen (Bülow und Bernhardt, 2002) und Hamster (LeHoux *et al.*, 1994) werden beide Isoformen des Enzyms exprimiert und sind an der Synthese der Gluco- bzw. Mineralocorticoide beteiligt. Die Synthese dieser Steroidhormone wird in den Nebennierenrinden von Rindern (Wada *et al.*, 1985), Schweinen (Yanagibashi *et al.*, 1986), Fröschen (Nonaka *et al.*, 1995) und Schafen (Boon *et al.*, 1997) jedoch nur von einem einzigen Enzym übernommen. Der Grund für die unterschiedliche Expression eines oder beider Enzyme ist bis heute nicht geklärt.

Die Hauptregulatoren der Aldosteronsekretion sind Angiotensin II, Kalium sowie in geringem Maße das adrenocorticotrope Hormon (ACTH). Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist essentiell für die Regulation des Blutdrucks und läuft über eine enzymatische Kaskade ab (Abb. 1.8). Renin, eine Aspartylprotease, wird von den juxtaglomerulären Zellen der Niere produziert und freigesetzt, sobald der Blutdruck sinkt. Dann wird Angiotensinogen, ein Prekursor-Protein aus der Leber, durch Renin zu Angiotensin I umgewandelt. Das ACE (*Angiotensin I-converting enzyme*), eine Dipeptidyl-Carboxypeptidase, welche hauptsächlich in der Lunge und der Leber synthetisiert wird, spaltet Angiotensin I, wodurch Angiotensin II entsteht. Angiotensin II stellt die physiologisch aktive Komponente des Systems dar und interagiert mit den Angiotensin-Rezeptoren, um unterschiedliche Prozesse in Gang zu setzen. Zum Einen kommt es in den kleinen Arterien und Arteriolen zur Vasokonstriktion. Zum Anderen wird in der Hypophyse ADH (antidiuretisches Hormon) sekretiert, welches die Absorption von Wasser in der Niere fördert. Zusätzlich wird die Synthese von Aldosteron in den Nebennieren stimuliert. Aldosteron bewirkt in der Niere die Resorption von Na⁺ und Wasser aus dem Urin ins Blut und die Sekretion von K⁺. Durch diese Maßnahmen steigt das Blutvolumen und somit auch der Blutdruck. Ist der physiologische Blutdruck hergestellt, wirkt dieser hemmend auf die Renin-Produktion in der Niere (Lavoie und Sigmund, 2003; Santos *et al.*, 2012). Zudem reagiert die Aldosteronproduktion sehr sensitiv auf Änderungen

Typ 2 (11 β -HSD2) gewährleistet, die im Zielgewebe, vor allem den Nieren, mit dem MR co-lokalisiert ist. Dieses Enzym überführt die Glucocorticoide in ihre inaktive 11-Keto-Form (Cortisol zu Cortison), so dass diese nicht mehr in der Lage sind, den Rezeptor zu aktivieren (Funder *et al.*, 1988).

1.3.3. Genomische und nicht-genomische Effekte des Aldosterons

Die Wirkung des Aldosterons erfolgt entweder über die soeben beschriebenen genomischen oder über nicht-genomische Effekte. Die klassische Wirkungsweise des Aldosterons wird durch die Bindung an den Mineralocorticoid-Rezeptor vermittelt, welcher als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Proteine veranlasst, die an der Regulation des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes beteiligt sind (*Epithelial Na⁺ channel* (ENaC), *Serum glucocorticoid-regulated kinase 1* (SGK1), *Na⁺-K⁺-ATPase*, *Kirsten Ras GTP-binding Protein 2A* (Ki-Ras2A), *Phosphatidylinositol-3-Kinase* (PI3K), *Channel-inducing factor* (CHIF)) (Connell, 2005).

Neben dieser genomischen Wirkung des Aldosterons, deren Reaktion mit einer Latenzzeit von Stunden oder sogar Tagen auftritt, konnten auch sehr schnelle Effekte des Aldosterons (innerhalb von Minuten) beschrieben werden. Diese Effekte ließen auf eine nicht-genomische Wirkung schließen, da sie sehr schnell einsetzten und weder durch Transkriptions- noch durch Translationsinhibitoren unterdrückt werden konnten (Moura und Worcel, 1984). Da die nicht-genomischen Effekte auch indirekt genomische Prozesse auslösen können, wird häufig auch der Ausdruck "nicht-genotrop" verwendet. Die Effekte beeinflussen die intrazelluläre Ca⁺-Konzentration und den pH-Wert und werden durch Signalkaskaden vermittelt, in die mehrere Proteine involviert sind (s. Abb.1.9). Diese nicht-genomischen Effekte werden zum Teil aber auch über den Mineralocorticoid-Rezeptor hervorgerufen. Jedoch gibt es auch Hinweise darauf, dass diese Effekte durch die Bindung an einen nicht-klassischen Rezeptor vermittelt werden, wobei die Identifikation eines solchen Rezeptors noch aussteht (Dooley *et al.*, 2012).

Zwischen den genomischen und nicht-genomischen Effekten bestehen sogenannte "Cross-Talks", um die physiologische Aldosteronantwort genau abzustimmen. Dieses Netzwerk an Interaktion zwischen den Effekten muss jedoch noch genauer erforscht werden (Dooley *et al.*, 2012).

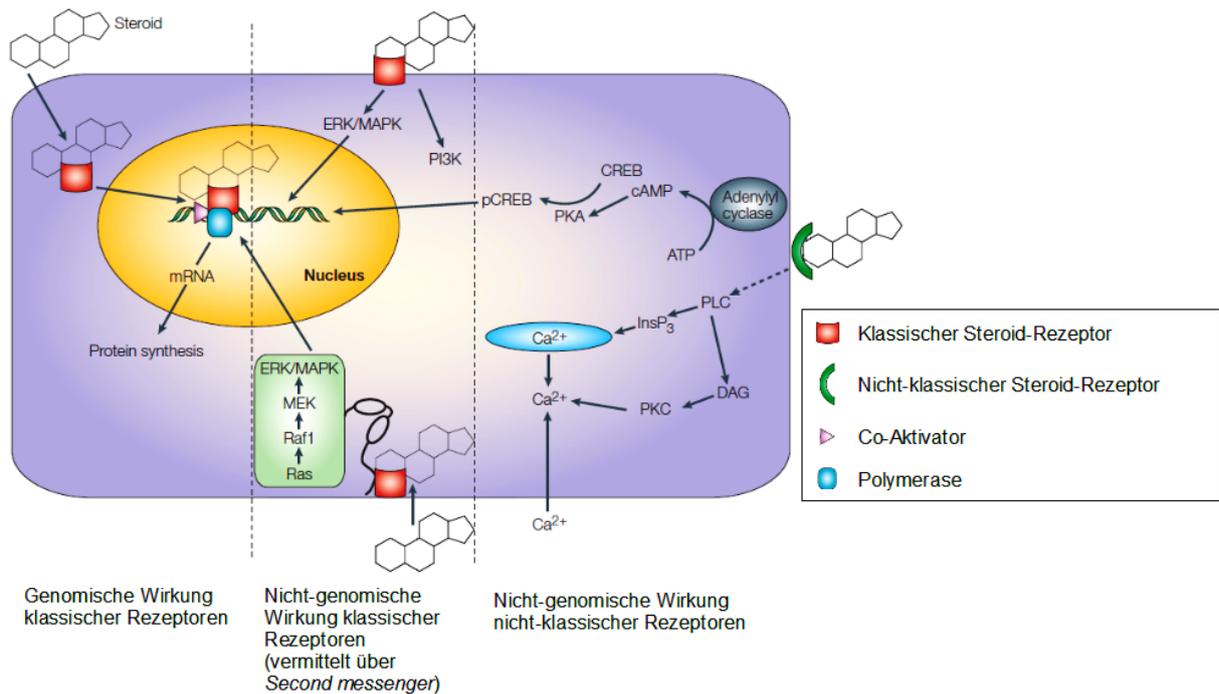


Abb. 1.9.: Schematische Darstellung der Aldosteronwirkung. Die genomische Wirkung des Aldosterons (links) wird über die Bindung an den Mineralocorticoid-Rezeptor vermittelt, wobei der Rezeptor-Hormon-Komplex im Nucleus als Transkriptionsfaktor die Proteinexpression reguliert. Der Mineralocorticoid-Rezeptor kann auch eine nicht-genomische Wirkung (Mitte) über die Bildung von *Second messengers* ausüben, die ihrerseits Einfluss auf die Proteinexpression nehmen. Zudem können nicht-genomische Effekte über nicht-klassische Rezeptoren (rechts) vermittelt werden, die über Signalkaskaden die Aldostereffekte steuern. PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, PKC: Proteinkinase C, MAPK: Mitogen-activated protein kinase, ERK: Extracellular-signal regulated kinase, DAG: Diacylglycerol, CREB: cyclic AMP response-element-binding protein, pCREB: phosphoryliertes CREB, InsP₃: Inositol Triphosphat, PLC: Phospholipase C, MEK: MAPK and ERK Kinase (nach Lösel und Wehling, 2003).

1.3.4. Störungen der Aldosteronbiosynthese

Betrachtet man die Krankheitsbilder, die mit Störungen des Aldosteronstoffwechsels einhergehen, so wird deutlich, welche wichtige Rolle Aldosteron für den menschlichen Körper spielt. Diese Störungen können sowohl zu Hyper- als auch Hypoaldosteronismus führen.

So kommt es beim adrenogenitalen Syndrom, einer autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselkrankheit, zu einem Aldosteronmangel, der häufig durch eine Defizienz des CYP21 verursacht wird. Oftmals wird dieser Hypoaldosteronismus von einem Hypocortisolismus begleitet, da Progesteron und 17-Hydroxyprogesteron für die Synthese des Cortisols bzw. des Aldosterons fehlen (siehe Abb. 1.6). In selteneren Fällen ist ein Defekt der Aldosteronsynthese, der entweder die 18-Hydroxylase- (*Corticosterone methyloxidase I*, CMO I) oder die 18-Oxidase-Aktivität (CMO II) des Enzyms betrifft, Auslöser des Aldosteronmangels. In beiden Fällen werden die Vorläufer verstärkt in die Synthese der Androgene geleitet, wodurch es zu einer Vermännlichung der äußeren Genitalien von betroffenen Patientinnen,

und bei beiden Geschlechtern, zu einer verfrühten Pubertät, zu Entwicklungsstörungen, sowie zu schnellem Wachstum in der Kindheit und Kleinwuchs im Erwachsenenalter kommen kann (Krone *et al.*, 2007; Peter *et al.*, 1999; White *et al.*, 1994). Zudem kommt es durch den Aldosteronmangel zu einer Störung des Salz- und Flüssigkeitshaushaltes, der in einer übermäßigen Natriumexkretion (Hyponaträmie) sowie einer verminderten Kaliumsekretion (Hyperkalämie) resultiert und zu einer lebensbedrohlichen Salzverlustkrise, insbesondere bei Neugeborenen, führen kann. Die Behandlung des Hypoaldosteronismus erfolgt meist durch eine lebenslange Ersatztherapie der Mineralocorticoide in Form von Fludrocortison (White, 2004). Die Aldosteronsynthese-Defizienz wird durch eine Vielzahl bekannter Mutationen des Enzyms verursacht, die unterschiedlich starke Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms haben (Pascoe *et al.*, 1992; Peter *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1995; Portrat-Doyen *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 2010).

Die Störung der Aldosteronbiosynthese kann nicht nur in einer verminderten Bildung dieses Steroidhormons resultieren, sondern ebenso in einer übermäßigen Produktion von Aldosteron. Die erhöhten Aldosteronlevel werden dabei entweder durch eine autonome Aldosteronsynthese der Nebenniere (primärer Hyperaldosteronismus, PH) oder durch andere, extraadrenale Störungen verursacht (sekundärer Hyperaldosteronismus). In den meisten Fällen des primären Hyperaldosteronismus liegt ein Aldosteron-produzierendes Adenom (APA) oder eine Hyperplasie der Nebenniere vor. Seltener ist der primäre Hyperaldosteronismus genetisch (familiärer Hyperaldosteronismus (FH)) bedingt. Die Ursache des sekundären Hyperaldosteronismus liegt in einer gesteigerten Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, die durch verschiedene Grunderkrankungen hervorgerufen wird (z. B. chronische Nierenerkrankung, Herzinsuffizienz, Nierenarterienstenose) (Siegenthaler, 2006). Durch diese Krankheiten kommt es zu einer renalen Minderdurchblutung, der durch die Erhöhung des Blutdrucks entgegengewirkt werden soll. Folglich kommt es zur Aktivierung des RAAS und der Bildung von Angiotensin II, welches die Vasokonstriktion veranlasst und zur Steigerung des Widerstandes in den Blutgefäßen führt. Zusätzlich kommt es durch die vermehrte Aldosteronsekretion zur Rückresorption von Natrium und Wasser, wodurch das Blutvolumen erhöht wird. Da das insuffiziente Herz jedoch nicht in der Lage ist, das Blutvolumen zu bewältigen, kommt es mehr und mehr zur Schädigung des Herzens. Neben arteriellem Bluthochdruck und Herzinsuffizienz, konnte Aldosteron als Auslöser für die Entwicklung einer Herzfibrose ausgemacht werden. Hierbei stimuliert das Hormon die Kollagensynthese in kardialen Fibroblasten, wodurch es zu einer Versteifung des Herzmuskels mit fortschreitender Verschlechterung der Herzfunktion kommt. Letztendlich entsteht eine progressive Schädigung des Herzens durch einen *Circulus vitiosus* aus unzureichender renaler Durchblutung, persistenter Aktivierung des RAAS mit übermäßiger Bildung von Angiotensin II sowie Aldosteron und fibrotischem Wachstum (Brilla, 2000).

1.3.5. Behandlungsmöglichkeiten und CYP11B2 als Drug Target

Für die medikamentöse Behandlung von Patienten mit sekundärem Hyperaldosteronismus stehen mehrere Wirkstoffe zur Verfügung. Um die Aktivität des RAAS zu reduzieren, werden häufig ACE-Hemmer oder AT-1 Antagonisten eingesetzt, um die Aldosteronsekretion sowie die Vasokonstriktion der Blutgefäße zu vermindern. Je nach Begleiterkrankungen des Patienten werden diese Wirkstoffe mit Diuretika, Kalzium-Antagonisten und/oder β -Blockern kombiniert, die unterschiedliche Effekte vermitteln, jedoch alle darauf abzielen, den Blutdruck zu senken.

Die Therapie mit ACE-Hemmern oder AT-1 Antagonisten wird häufig von einem sogenannten Aldosteron-*Escape* begleitet, bei dem es trotz supprimierter Angiotensin II-Bildung bzw. -Wirkung zu einem Anstieg der Aldosteronkonzentration kommt. Dieser Anstieg wird vermutlich durch erhöhte Kaliumwerte verursacht, welche die Aldosteronsekretion fördern (Brilla, 2000).

Ein weiterer Therapieansatz besteht in der Blockierung des Mineralocorticoid-Rezeptores mit den Aldosteron-Antagonisten Spironolacton und Eplerenon. In einer klinischen Studie wurde die Wirksamkeit von Spironolacton untersucht, das zusätzlich zur Standardtherapie mit ACE-Inhibitoren und Diuretika gegeben wurde (*Randomized Aldactone Evaluation Study* (RALES), Pitt *et al.*, 1999). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das Mortalitätsrisiko bei schwer herzinsuffizienten Patienten durch die Gabe von Spironolacton um 30 % gesenkt werden konnte. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Spironolacton die Entstehung bzw. die weitere Entwicklung einer Herzfibrose verhindert werden kann (Zannad *et al.*, 2000). Der steroidale Charakter des Spironolactons führt jedoch durch die hohe Affinität zu Androgen- und Progesteron-Rezeptoren zu einer Reihe schwerer Nebeneffekten (z. B. Gynäkomastie) (Pitt *et al.*, 1999). In einer weiteren Studie (*Eplerenone Post-acute myocardial infarction Heart failure Efficacy and Survival study* (EPHESUS)) konnte die positive Wirkung durch die Blockierung des MR mit Eplerenon, ebenfalls ein Aldosteron-Antagonist, bestätigt werden. Durch die geringere Affinität zu anderen Steroidrezeptoren ist die Schwere der Nebenwirkungen des Eplerenons jedoch deutlich geringer (Pitt *et al.*, 2003). Die Inhibition des MR steht jedoch in Verbindung mit dem Auftreten von Hyperkaliämien, die zu Herzrhythmusstörungen und Kammerflimmern bis hin zum Tod führen können.

Ein neue Form der Therapie soll die Inhibition der Aldosteronsynthese ermöglichen, die direkt am Hormon-bildenden Enzym (CYP11B2) ansetzt. Das Ziel besteht darin, die pathologisch erhöhten Aldosteronlevel zu reduzieren und sowohl die MR-vermittelten als auch MR-unabhängigen Effekte des Aldosterons zu unterbinden. Hierdurch soll nicht nur die Entwicklung von Bluthochdruck, sondern auch die Entstehung einer Herzinsuffizienz und Myo-

kardfibrose verhindert werden (Hakki und Bernhardt, 2006).

Ein wichtiger Aspekt hinsichtlich der Hemmung der Aldosteronsynthese, ist die Entwicklung eines selektiven Inhibitors. Die Aktivität der zu 93 % identischen 11- β -Hydroxylase darf hierbei nicht unterdrückt werden, um die Aufrechterhaltung der Cortisolsynthese zu gewährleisten. Die selektive Wirkung verschiedener Inhibitoren für CYP11B2 konnte bereits in mehreren Untersuchungen gezeigt werden (Bureik *et al.*, 2004; Ulmschneider *et al.*, 2005a; Voets *et al.*, 2006). Die Entwicklung dieser nicht-steroidalen Inhibitoren zielt dabei auf eine Verringerung möglicher Nebenwirkungen ab. In einer kürzlich erschienen Studie konnte die Wirksamkeit des ersten oral aktiven Aldosteronsynthese-Inhibitors LCI699 gezeigt werden (Amar *et al.*, 2010). In höheren Dosen wurde jedoch eine latente Inhibition der 11 β -Hydroxylase beobachtet, die die Weiterentwicklung von Inhibitoren mit höherer Selektivität verlangt (Azizi *et al.*, 2013).

1.4. Bisherige Arbeiten zur humanen Aldosteronsynthese

Das Gen für die humane Aldosteronsynthese, *CYP11B2*, wurde erstmals 1989 aus einer genomischen Bibliothek des Menschen kloniert und charakterisiert (s. Abschnitt 1.3.1, Mornet *et al.*, 1989). Kurze Zeit später wurde die Sequenz der Aldosteronsynthese, bis auf einzelne Residuen, durch die Klonierung einer cDNA aus einem adrenalen Tumor eines Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus bestätigt. Das Enzym konnte damit zum ersten Mal in COS-7 Zellen exprimiert werden, wobei die Untersuchung der Steroidhydroxylase-Aktivität durch die Inkubation der solubilisierten Mitochondrien mit 11-Desoxycorticosteron erfolgte. Die Analyse der Produkte ergab eine 11 β -, 18- und 19-Hydroxylase- sowie eine 18-Oxidase-Aktivität des rekombinanten Enzyms (Kawamoto *et al.*, 1990b). Ebenso wurde eine CYP11B2 cDNA aus gesunder Nebenniere kloniert und sowohl in COS-7 als auch in V79 Zellen (Chin. Hamsterfibroblasten) exprimiert. Der Umsatz des Substrates 11-Desoxycorticosteron in die Produkte Corticosteron, 18-Hydroxycorticosteron und Aldosteron konnte hierbei bestätigt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Produktbildung von 18-Hydroxycorticosteron und Aldosteron ausgehend von 11-Desoxycorticosteron wesentlich höher ist als durch den Einsatz von Corticosteron als Substrat (Denner *et al.*, 1995a). Darüber hinaus erfolgte die Expression der Aldosteronsynthese in verschiedenen humanen Nebennieren-Zelllinien zur Untersuchung physiologischer Aspekte, wie z. B. der Regulation der CYP11B2-Expression und Aldosteronproduktion in Abhängigkeit verschiedener Faktoren (Wang *et al.*, 2012; Pezzi *et al.*, 1997; Bassett *et al.*, 2004; Nogueira und Rainey, 2010; Xing *et al.*, 2012). Neben der Expression der Aldosteronsynthese in Säugerzellen wurde ein Expressionssystem in der Spalthefe (*Schizosaccharomyces pombe*) etabliert, bei dem das rekombinante Protein in den Mitochondrien lokalisiert werden konnte und der Expressionslevel etwa 2 nmol pro

Liter Hefekultur beträgt. Durch das Vorhandensein einer endogenen Elektronentransferkette ist dabei die zusätzliche Expression von Adx und AdR für Substratumsätze *in vivo* nicht notwendig (Bureik *et al.*, 2002).

Das Expressionsystem in der Hefe wird als Screening-System für die Identifikation potentieller CYP11B2-Inhibitoren eingesetzt (Ehmer *et al.*, 2002; Bureik *et al.*, 2004). Hierzu werden die rekombinanten Hefezellen mit dem Substrat 11-Desoxycorticosteron sowie dem potentiellen Inhibitor inkubiert und durch die Analyse der Produktbildung im Vergleich zu einer Kontrollkultur kann die inhibitorische Wirkung einer Substanz überprüft werden. Die Weiterentwicklung dieses Systems erlaubt nun einen höheren Durchsatz beim Screening nach selektiven Inhibitoren durch ein automatisiertes Verfahren und den Einsatz von 96-Well-Platten (Hakki *et al.*, 2011). Die stabile Expression von CYP11B2 und CYP11B1 in V79 Zellen wird dazu genutzt, potentielle Inhibitoren der Aldosteronsynthese, die aus dem *S. pombe*-Screening-System hervorgehen, zu validieren und auf ihrer Selektivität gegenüber CYP11B1 zu überprüfen (Denner *et al.*, 1995b; Ehmer *et al.*, 2002; Ulmschneider *et al.*, 2005a; Voets *et al.*, 2005).

Für das Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehungen der Aldosteronsynthese und der Bindung von Substraten und Inhibitoren wurden mehrere Homologiemodelle des Proteins erstellt. Hierzu wurden verschiedene Templates verwendet: Belkina *et al.* verwendeten die Strukturen von bakteriellem CYP102 und CYP108 für die Modellbildung von CYP11B1 und CYP11B2 zur Untersuchung der strukturellen Unterschiede (Belkina *et al.*, 2001). Mit diesen Modellen konnten die größten Unterschiede der beiden Isoformen in der Ausrichtung des Häms und, damit verbunden, der Größe des aktiven Zentrums ausgemacht werden. Dieser Unterschied läßt sich gut durch das größere Substrat des CYP11B1 erklären, welches eine zusätzliche Hydroxylgruppe am C17 des Steroidgerüsts trägt.

Die Entwicklung potentieller CYP11B2-Inhibitoren wurde durch Dockingstudien unterstützt, die anhand eines Modells aufbauend auf humanem CYP2C9 durchgeführt wurden (Ulmschneider *et al.*, 2005b). Mit Hilfe dieses Modells wird die Bindung der verschiedenen Inhibitoren im Protein untersucht, um durch Modifikationen an der Inhibitorstruktur die Selektivität zu verbessern (Ulmschneider *et al.*, 2005a; Voets *et al.*, 2005).

Roumen *et al.* konstruierten ein Hybridtemplate aus CYP101 und CYP2C5, welches als Grundlage für die Homologiemodellierung von CYP11B2 diene und mit dem sowohl die Bindung von Substrat und Produkten als auch verschiedener Inhibitoren untersucht wurde (Roumen *et al.*, 2007).

Die beiden Isoenzyme CYP11B1 (11 β -Hydroxylase) und CYP11B2 (Aldosteronsynthese) katalysieren die 11 β - und 18-Hydroxylierung ihrer Substrate. Trotz 93 % Sequenzidentität, d. h. von 479 Aminosäuren sind nur 29 nicht identisch, ist nur die Aldosteronsynthese in der Lage, eine 18-Oxidation zu katalysieren. Zur Untersuchung der unterschiedlichen Re-

aktionsselektivität wurden die Residuen an den Positionen 301, 302 und 320 der Aldosteronsynthase durch diejenigen der 11 β -Hydroxylase ersetzt. Hierbei zeigte sich, dass die einzelnen Mutationen nur zu einer leicht erhöhten 11 β -Hydroxylase-Aktivität führten. Die Kombination der Mutationen L301P/A320V und L301P/E302D/A320V führte jedoch zu einer 11 β -Hydroxylase-Aktivität von 60 bzw. 85% im Vergleich zum CYP11B1-Wildtyp und gleichzeitig zu einer Reduktion der Aldosteronsynthase-Aktivität auf 10 bzw. 13 % gegenüber dem CYP11B2-Wildtyp (Böttner *et al.*, 1996).

Eine weitere Charakterisierung der enzymatischen Aktivität der Aldosteronsynthase erfolgt durch die Anwendung des Expressionssystems in *S. pombe*. Durch die Expression verschiedener Mutanten der Aldosteronsynthase, die bei CMO-Patienten gefunden wurden, und die Durchführung von Substratumsätzen kann so der Einfluss der verschiedenen Mutationen auf die einzelnen Reaktionsschritte bestimmt werden (Tin *et al.*, 2011).

Die am besten charakterisierten Formen der Aldosteronsynthase stammen jedoch aus Ratte und aus Rind, wobei das bovine Enzym sowohl für die Synthese von Cortisol als auch von Aldosteron verantwortlich ist. Das CYP11B2-Homolog aus der Ratte wurde erfolgreich in Zellkulturen mit COS-7 Zellen exprimiert und bezüglich seiner Aktivität durch Substratumsätze untersucht (Nonaka und Okamoto, 1991). Im Vergleich zu humanem CYP11B1 und CYP11B2, konnten die Enzyme aus der Ratte schon sehr früh in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Trotz geringer Ausbeuten konnten erste *in vitro*-Umsätze durchgeführt werden (Nonaka *et al.*, 1998).

Die humane 11 β -Hydroxylase konnte 2008 erstmals in *E. coli* exprimiert werden. Durch die Co-Expression mit Chaperonen konnte ein Expressionlevel erreicht werden, der die Reinigung des Proteins für eine umfangreiche enzymatische Charakterisierung erlaubte (Zöllner *et al.*, 2008). Die erste erfolgreiche Expression der humanen Aldosteronsynthase in *E. coli* gelang erst über 20 Jahre nach der Klonierung des Gens im Rahmen meiner Masterarbeit. Im Gegensatz zu der Expression der 11 β -Hydroxylase wurde jedoch ein für die Expression von Membranproteinen optimierter *E. coli*-Stamm verwendet, der es ermöglichte, eine ausreichende Menge des Proteins zu reinigen und erste *in vitro*-Umsätze und Bindungsstudien durchzuführen (Hobler, 2008). Die detaillierte Untersuchung hinsichtlich der enzymatischen Aktivität und Wirkungsweise der Aldosteronsynthase soll Gegenstand dieser Arbeit sein.

1.5. Zielstellung dieser Arbeit

Aldosteron als wichtigstes Mineralocorticoid des Menschen spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des Elektrolyt-Haushaltes und des Blutdrucks. Die Regulation der Aldosteronsynthese wiederum ist von besonderer Bedeutung, da erhöhte Aldosteronwerte zu einer Reihe kardiovaskulärer Erkrankungen führen können: Bluthochdruck, Herzinsuffizienz und Myokardfibrose. Bluthochdruck, eine der häufigsten Erkrankungen in Industrieländern, wird zur Zeit durch Wirkstoffe behandelt, die das Angiotensin-konvertierende Enzym inhibieren oder den Angiotensin-Rezeptor blockieren. Beide Behandlungen werden jedoch von einer Reihe schwerer Nebeneffekte begleitet. In neuerer Zeit hat die spezifische Inhibition der Aldosteronsynthese das Interesse der Pharmaforschung geweckt, weshalb dieses Enzym als neues Drug Target von Bedeutung ist.

Nach der erfolgreichen Expression der Aldosteronsynthese in *E. coli* und der Reinigung, konnte im Rahmen meiner Masterarbeit der erste *in vitro*-Umsatz mit dem humanen Enzym durchgeführt und die Bindung des Substrates 11-Desoxycorticosteron untersucht werden. Ziel der vorliegenden Arbeit sollte sein, eine umfassende enzymatische Charakterisierung der Aldosteronsynthese zu erstellen. Dazu sollten Substratumsätze von 11-Desoxycorticosteron mit der humanen Aldosteronsynthese und den Elektronentransferpartnern Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase durchgeführt werden, um die kinetischen Parameter zu bestimmen. Mit dem *in vitro*-System sollte zudem der Einfluss verschiedener Faktoren (Reaktionsintermediate, Inhibitoren, pH-Wert, Zeit) auf den Umsatz des Substrates und das Produktmuster untersucht werden. Des Weiteren sollte die Bindung des Substrates und der Intermediate der CYP11B2-Reaktion durch Differenzspektroskopie bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser experimentellen Untersuchungen sollten anhand eines Homologiemodells und Dockingstudien untermauert werden.

Für die Durchführung der oben aufgeführten *in vitro*-Experimente wird eine ausreichende Menge der gereinigten Aldosteronsynthese benötigt. Deshalb bestand die erste Aufgabe innerhalb dieser Arbeit in der Optimierung der Expressionsbedingungen und in der Erhöhung der Proteinausbeute.

Die enzymatische Charakterisierung sollte durch Substratumsätze erfolgen, bei denen die für die Reaktion benötigten Elektronen von NADPH über ein rekonstituiertes Elektronentransfersystem, bestehend aus Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase, auf die Aldosteronsynthese übertragen werden. In der Arbeitsgruppe wurden zu diesem Zweck bisher bovines Adx und bovine AdR verwendet, die in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt werden. Da sich die Interaktion des humanen CYP11B2 mit dem bovinen Elektronentransfersystem von der Interaktion mit dem humanem System möglicherweise unterscheiden und so zu un-

genauen Ergebnissen führen kann, soll ein Mischsystem vermieden werden. Deshalb sollten zunächst humanes Adx und humane AdR in geeignete Expressionsvektoren kloniert, in *E. coli* exprimiert und chromatographisch gereinigt werden.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Lill (Philipps-Universität Marburg) sollte ein zweites humanes Ferredoxin (Fdx2) auf seine Funktion als Elektronenüberträger auf Cytochrome P450 untersucht werden. Dazu sollte der Wildtyp bzw. verschiedene Mutanten des Ferredoxins in *in vitro*-Umsätzen von 11-Desoxycortisol mit CYP11B1 eingesetzt werden und die Produktbildung im Vergleich zu humanem Adrenodoxin verglichen werden.

Für die Entwicklung neuer Inhibitoren, die nicht die Aktivität der 11 β -Hydroxylase beeinflussen, bedarf es einer detaillierten Kenntnis der Struktur und des Reaktionsmechanismus der Aldosteronsynthese. Daher sollten die experimentellen Daten durch Dockingstudien und durch die Untersuchung der an der Bindung beteiligten Residuen zu einem besseren Verständnis dieses Enzyms führen. Hierfür sollte zunächst ein geeignetes Template ausgewählt werden, welches dann für die Erstellung eines Homologiemodells dient. Mit diesem sollte schließlich molekulares Docking der verschiedenen Liganden durchgeführt und die Bindung im aktiven Zentrum analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme waren, wenn nicht explizit angegeben, von analytischer Reinheit und wurden über Standardfirmen bezogen.

2.1.1. Bakterienstämme

Tab. 2.1.: Genotypen der in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme. Für die Klonierungsarbeiten wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α verwendet. Die heterologe Expression der Proteine fand dagegen in *E. coli* C43(DE3)-Zellen statt.

Stamm	Genotyp	Referenz
C43(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Miroux und Walker, 1996
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻m_K⁺)</i> , λ -	Hanahan, 1985

2.1.2. Plasmide

Tab. 2.2.: Übersicht über *E. coli*-Plasmide, die für die Klonierung und Expression verschiedener Proteine verwendet wurden. hCYP11B1: humane 11 β -Hydroxylase, hCYP11B2: humane Aldosteronsynthase, hAdx: humanes Adrenodoxin, hAdR: humane Adrenodoxin-Reduktase.

Name	Beschreibung	Referenz
pETHCYP11B1	Expression von hCYP11B1; abgeleitet von pET-17b, Amp ^R	Zöllner <i>et al.</i> , 2008
pETHCYP11B2	Expression von hCYP11B2; abgeleitet von pET-17b, Amp ^R	diese Arbeit

2.1. MATERIAL

pEThAdx	Expression von hAdx; abgeleitet von pET-15b, Amp ^R	diese Arbeit
pEThAdR	Expressions von hAdR; abgeleitet von pET-17b, Amp ^R	diese Arbeit
pEThCYP11B2_W116F	Expression der hCYP11B2-Mutante W116F; Amp ^R	diese Arbeit
pEThCYP11B2_W116Y	Expression der hCYP11B2-Mutante W116Y; Amp ^R	diese Arbeit
pEThCYP11B2_F130A	Expression der hCYP11B2-Mutante F130A; Amp ^R	diese Arbeit
pEThCYP11B2_Ecoopt	Expression von hCYP11B2 mit codon-optimiertem Gen für <i>E. coli</i> ; Amp ^R	diese Arbeit
pMA_hCYP11B2_Ecoopt	Amplifizierung des codon-optimierten (für <i>E. coli</i>) hCYP11B2-Gens; Amp ^R	diese Arbeit
pUC19-hAdx7	Amplifizierung von hAdx; Amp ^R	Picado-Leonard <i>et al.</i> , 1988
pMB193	Amplifizierung von hAdR; Amp ^R	
pGro12	Expression der <i>E. coli</i> -Chaperone GroEL und GroES; Kan ^R	Nishihara <i>et al.</i> , 1998

2.1.3. Oligonukleotide

Tab. 2.3.: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg, Deutschland).

Name	Verwendungszweck	Sequenz (5' → 3')
F_hAdx_NcoI	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von humanem Adx (ohne mito. Targetsequenz) mit Nco I -Schnittstelle	CATGCCATGGGCAGCTCAGA AGATAAAATAACAG

2.1. MATERIAL

R_hAdx_BamHI	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von humanem Adx mit BamH I -Schnittstelle	CGGGATCCTCAGGAGGTCTT GCCCACATC
F_hAdR_NdeI	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von humaner AdR (ohne mito. Targetsequenz) mit Nde I -Schnittstelle	GGAATTCCATATGTCCACAC AGGAGAAGACCC
R_hAdR_KpnI	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von humaner AdR mit Kpn I -Schnittstelle	GGGTACCCGGATCTAGGCTC AGTGGCCCAG
F_11B2_W116F	Vorwärtsprimer zur ortsgerichteten Mutagenese von hCYP11B2 W116F mit Xho I -Schnittstelle	GGATGATCCTCGAGCCCTTT GTGGCCTAC
R_11B2_W116F	Rückwärtsprimer zur ortsgerichteten Mutagenese von hCYP11B2 W116F mit Xho I -Schnittstelle	GTAGGCCACAAAGGGCTCGA GGATCATCC
F_11B2_W116Y	Vorwärtsprimer zur ortsgerichteten Mutagenese von hCYP11B2 W116Y mit Nde I -Schnittstelle	ATGATCCTGGAGCCATATGT GGCCTACAGAC
R_11B2_W116Y	Rückwärtsprimer zur ortsgerichteten Mutagenese von hCYP11B2 W116Y mit Nde I -Schnittstelle	GTCTGTAGGCCACATATGGC TCCAGGATCAT
F_11B2_F130A	Vorwärtsprimer zur ortsgerichteten Mutagenese von hCYP11B2 F130A mit Dra I -Schnittstelle	GCACAAATGTGGCGTGGCCC TTTTAAATGGGCCTGAATG
R_11B2_F130A	Rückwärtsprimer zur ortsgerichteten Mutagenese von hCYP11B2 F130A mit Dra I -Schnittstelle	CATTCAGGCCCATTTAAAAG GGCCACGCCACATTTGTGC

2.1.4. Proteine

Fdx2 wurde freundlicherweise von Herrn Holger Webert bereitgestellt (Arbeitsgruppe Prof. Roland Lill, Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg). Humanes CYP11B1 wurde im Rahmen meiner Masterarbeit in *E. coli* exprimiert und gereinigt (Hobler, 2008).

2.1.5. Medien

2.1.5.1. Medien für die Anzucht bzw. Regeneration transformierter Zellen

SOB Medium:

0,5 % Hefeextrakt
2 % Bacto Trypton
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
10 mM NaCl

SOC Medium:

0,5 % Hefeextrakt
2 % Bacto Trypton
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
10 mM NaCl
20 mM Glucose

2.1.5.2. Kulturmedien für die Expression

TB-Medium:

12 g Pepton
24 g Hefeextrakt, technisch
4 ml Glycerin
ad. 900 ml H₂O
100 ml 10x Phosphatpuffer

10x Phosphatpuffer:

2,31 g KH₂PO₄
12,54 g K₂HPO₄
ad. 100 ml H₂O
(pH 7,4)

Autoinduktionsmedium:

12 g Pepton
24 g Hefeextrakt, technisch
4 ml Glycerin
ad. 880 ml H₂O
100 ml 10x Phosphatpuffer
20 ml 50x 5052

50x 5052:

25 g Glycerin
2,5 g Glucose
10 g α -Lactose
ad. 100 ml H₂O

2.2. Methoden

2.2.1. Gentechnische Methoden

Die gentechnischen Arbeiten wurden, falls nicht anders angegeben, nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook, 2001).

2.2.1.1. Amplifikation und Klonierung von cDNA

Die Amplifikation von cDNA erfolgte mittels PCR von einem Template-Plasmid mit den entsprechenden Primern unter Verwendung von Phusion DNA Polymerase. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes sah wie folgt aus:

5x Phusion HF Puffer	10 μ l
dNTPs (5 mM)	3 μ l
Vorwärts-Primer (10 μ M)	5 μ l
Rückwärts-Primer (10 μ M)	5 μ l
Template-DNA (50 ng/ μ l)	1 μ l
DMSO	1,5 μ l
Phusion DNA Polymerase (2 U/ μ l)	0,5 μ l
H ₂ O	24 μ l
Σ	50 μ l

Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

1.	98 °C	1 min	
<hr/>			
2.	98 °C	10 s	
3.	60 °C	35 s	35x
4.	72 °C	30 s	
<hr/>			
5.	72 °C	10 min	

Die amplifizierte cDNA wurde nach der PCR in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und die gewünschte Bande mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aus dem Gel extrahiert. Die isolierte cDNA sowie der entsprechende Expressionsvektor wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (Promega bzw. NEB) im

geeigneten Puffer verdaut und nochmals einer Gelelektrophorese und Reisolation unterzogen. Die Ligation der cDNA und des Vektors erfolgte mit dem FastLink DNA Ligation Kit (Epicentre, Madison, WI, USA) nach Herstellerangaben und dem folgenden Programm:

1. 16°C 15 min
2. 20°C 15 min
3. 70°C 15 min
4. 4°C forever

2.2.1.2. Klonierung von humanem Adrenodoxin

Die cDNA von humanem Adrenodoxin (Picado-Leonard *et al.*, 1988) wurde mittels der Primer F_hAdx_NcoI und R_hAdx_BamHI aus dem Vektor pUC19-hAdx7 amplifiziert und via *Nco* I/*Bam*H I in den Vektor pET-15b (Novagen) kloniert. Anschließend wurden *E. coli* C43(DE3)-Zellen mit diesem Vektor transformiert.

Der Vektor pUC19-hAdx7 wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Walter L. Miller zur Verfügung gestellt.

2.2.1.3. Klonierung von humaner Adrenodoxin-Reduktase

Die cDNA von humaner Adrenodoxin-Reduktase (Solish *et al.*, 1988) wurde mit den Primern F_hAdR_NdeI und R_hAdR_KpnI aus dem Vektor pMB193 amplifiziert und via *Nde* I/*Kpn* I in den Vektor pET-17b kloniert. *E. coli* C43(DE3)-Zellen wurden mit diesem Vektor und dem Vektor für Chaperone (pGro12) co-transformiert.

Der Vektor pMB193 wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Matthias Bureik bereitgestellt. Die darin enthaltene cDNA der humanen Adrenodoxin-Reduktase stammt von Herrn Prof. Walter L. Miller.

2.2.1.4. Klonierung eines codon-optimierten Gens für humanes CYP11B2

Die cDNA von humanem CYP11B2 wurde für die Expression in *E. coli* durch die Geneart AG (Regensburg, Deutschland) codon-optimiert. Für die Klonierung des Expressionsvektors wurde die codon-optimierte cDNA aus dem Vektor pMA_11B2_Ecoopt durch einen Restriktionsverdau mit *Nde* I/*Hind* III ausgeschnitten und durch Ligation in den ebenfalls mit *Nde* I/*Kpn* I verdauten Vektor pET-17b eingebracht. Für die Expression erfolgte eine

Co-Transformation von *E. coli* C43(DE3)-Zellen mit diesem Vektor (pEThCP11B2_Ecoopt) und dem Vektor pGro12 für die Expression der Chaperone GroEL und GroES.

2.2.1.5. Plasmidpräparation

Die Plasmid-Präparation erfolgte aus *E. coli* DH5 α -Zellen (100 ml Kultur in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) mit dem NucleoSpin Plasmid QuickPure bzw. dem NucleoBond PC 100 Kit nach Hersteller-Angaben (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Da es sich bei den pET-Vektoren um low-copy Plasmide handelt (15-20 Kopien pro Zelle) wurde etwa 8 Stunden nach Inokulation der Kultur eine geringe Menge Chloramphenicol (12 μ g/ml) zugegeben, um die Plasmid-Amplifikation zu erhöhen (Frenkel und Bremer, 1986).

2.2.1.6. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch die Messung der Absorption bei 260 nm, bei der ein Wert von 1 einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml entspricht (Sambrook, 2001).

2.2.1.7. Ortsgerichtete Mutagenese

Die Einführung der einzelnen Mutationen W116F, W116Y und F130A in humanes CYP11B2 erfolgte mittels der entsprechenden Primer (siehe Tabelle 2.3) und dem Ausgangsplasmid pEThCYP11B2. Die Mutationsprimer wurden mit Hilfe des Programms Silent Site Selector (<http://rana.lbl.gov/SSS/>) entworfen. Hierbei wird neben der gewünschten Mutation auch eine Restriktionsschnittstelle durch eine stille Mutationen eingeführt, um durch einen einfachen Restriktionsverdau der erhaltenen Plasmide den Erfolg der Mutation zu überprüfen. Die Mutagenese wurde mit dem QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) und dem folgenden PCR-Programm durchgeführt:

1.	95 °C	3 min	
2.	95 °C	1 min	20x
3.	68 °C	10 min	
4.	4 °C	forever	

2.2.1.8. DNA-Sequenzierung

Zur Verifizierung der klonierten cDNA und zur Überprüfung der Mutagenese erfolgte die Sequenzierung durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland).

2.2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1. Präparation von kompetenten *E. coli*-Zellen und Transformation

Chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen, sowohl für Klonierungs- als auch für Expressionszwecke, wurden nach der Inoue-Methode präpariert (Inoue *et al.*, 1990). Die Transformation der kompetenten Zellen erfolgte durch die Hitzeschock-Methode nach Standardprotokoll (Sambrook, 2001).

2.2.2.2. Lagerung von *E. coli*-Stämmen

Für die langfristige Lagerung der *E. coli*-Expressionsstämme für humanes CYP11B2, Adx und AdR wurde jeweils eine Kultur mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht inkubiert. 500 μ l der Kultur wurden dann 1:1 mit einer sterilen 50 %igen Glycerinlösung versetzt, in sterilen Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3. Expression und Reinigung von humanem CYP11B2

Für die Expression von CYP11B2 wurde zunächst eine Vorkultur von 10 ml TB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin und 50 μ g/ml Kanamycin angesetzt, die mit Zellen aus einem Glycerolstock (*E. coli* C43(DE3) pETHCYP11B2 pGro12) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 UpM inkubiert wurde. Für die Hauptkultur wurden 400 ml TB-Medium in 2,8 L Fernbach-Kolben (Nalgene) mit Ampicillin und Kanamycin versetzt, mit 4 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 210 UpM inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Zellen mit 0,5 mM IPTG und 4 mg/ml Arabinose induziert und bei 27,5 °C und 180 UpM inkubiert. Zusätzlich wurden zum Zeitpunkt der Induktion 1 mM δ -ALA als Häm-Precursor und nochmals 50 μ g/ml Ampicillin zugegeben. Nachdem der pH-Wert des Mediums einen Wert von etwa 7,2 erreicht hatte (etwa 20 Stunden) wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 5000g und 4 °C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet

in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Zellyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in 40 ml Lysepuffer (50 mM KP_i (pH 7,4), 500 mM Na-Acetat, 20 % Glycerin, 1,5 % Na-Cholat, 1,5 % Tween 20, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTE, 0,1 mM PMSF) resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Ultrazentrifugation für 30 min bei 35.000 UpM und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgetrennt. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Reinigung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Reinigung des Proteins erfolgte über 3 verschiedene Chromatographie-Schritte, die alle bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt wurden. Das mit einem C-terminalen 6xHis-Tag versehene Protein wurde zunächst über eine IMAC-Säule mit Ni-NTA Agarose (Qiagen) gereinigt, die zuvor mit Puffer A (3x Säulenvolumen, SV) äquilibriert wurde. Nach dem Auftragen des Zelllysates wurde das Säulenmaterial mit Puffer B (7x SV) und C (1x SV) gewaschen. Danach wurde das Zielprotein mit Puffer D (3x SV) eluiert. Die rötlichen Fraktionen wurden vereinigt und mittels Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 30 kDa (Millipore) konzentriert. Für die Reinigung über den Anionenaustauscher wurde das Eluat der IMAC-Säule mit dem 3-fachen Volumen von Puffer F verdünnt und auf die mit Puffer E (3x SV) äquilibrierte DEAE-Säule gegeben. CYP11B2 bindet im Gegensatz zu vielen *E. coli*-Proteine unter diesen Bedingungen nicht an das Säulenmaterial. Die Säule wurde mit Puffer G und H gewaschen (3x SV). Die rötlichen Fraktionen wurden wiederum vereinigt. Für den nächsten Reinigungsschritt über einen Kationenaustauscher wurde das CYP11B2 nach der DEAE-Säule (Tosoh Bioscience) auf die mit Puffer E (3x SV) äquilibrierte SP-Säule (GE Healthcare) gegeben. Das Säulenmaterial wurde mit Puffer I (4x SV) gewaschen. CYP11B2 wurde mit steigender NaCl Konzentration eluiert (Puffer J + 25 mM NaCl, Puffer J + 50 mM NaCl, Puffer J + 75 mM NaCl und Puffer J + 150 mM NaCl, jeweils 2x SV). Die rötlichen Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und in Lagerpuffer umgepuffert bis zu einer maximalen Imidazol-Konzentration von 0,05 bis 0,1 mM.

Tab. 2.4.: Puffer für die Reinigung mittels Ni-NTA Agarose.

Puffer A (Äquilibriumspuffer)	Puffer B (Waschpuffer 1)	Puffer C (Waschpuffer 2)	Puffer D (Elutionspuffer)
50 mM KP_i (pH 7,4)	50 mM KP_i (pH 7,4)	50 mM KP_i (pH 7,4)	200 mM Imidazol-
500 mM Na-Acetat	500 mM Na-Acetat	20 % Glycerol	Acetat (pH 7,4)
20 % Glycerin	20 % Glycerin	1 % Na-Cholat	20 % Glycerin
1 % Na-Cholat	1 % Na-Cholat	1 % Tween 20	1 % Na-Cholat
1 % Tween 20	1 % Tween 20	0,1 mM EDTA	1 % Tween 20
0,1 mM EDTA	0,1 mM EDTA	0,1 mM DTE	0,1 mM EDTA
0,1 mM DTE	0,1 mM DTE	0,1 mM PMSF	0,1 mM DTE
0,1 mM PMSF	0,1 mM PMSF	0,1 mM ATP	0,1 mM PMSF
	40 mM Imidazol	40 mM Imidazol	

Tab. 2.5.: Puffer für die Reinigung mittels DEAE-Sepharose.

Puffer E (Äquilibriumspuffer)	Puffer F (Verdünnungspuffer)	Puffer G (Waschpuffer 1)	Puffer H (Waschpuffer 2)
20 mM KP_i (pH 7,4)	20 % Glycerin	30 mM KP_i (pH 7,4)	50 mM KP_i (pH 7,4)
20 % Glycerin	1 % Na-Cholat	20 % Glycerin	20 % Glycerin
10 mM Imidazol	0,1 mM EDTA	10 mM Imidazol	10 mM Imidazol
1 % Na-Cholat	0,1 mM DTE	1 % Na-Cholat	1 % Na-Cholat
0,1 % Tween 20		0,1 % Tween 20	0,1 % Tween 20
0,1 mM EDTA		0,1 mM EDTA	0,1 mM EDTA
0,1 mM DTE		0,1 mM DTE	0,1 mM DTE

Tab. 2.6.: Puffer für die Reinigung mittels SP-Sepharose.

Puffer I (Waschpuffer 1)	Puffer J (Waschpuffer 2)	Lagerpuffer
20 mM KP_i (pH 7,4)	40 mM KP_i (pH 7,4)	50 mM KP_i (pH 7,4)
20 % Glycerin	20 % Glycerin	20 % Glycerin
10 mM Imidazol	10 mM Imidazol	1 % Na-Cholat
1 % Na-Cholat	1 % Na-Cholat	0,1 mM EDTA
0,1 mM EDTA	0,1 mM EDTA	0,1 mM DTE
0,1 mM DTE	0,1 mM DTE	0,05 % Tween 20
0,1 % Tween 20	0,1 % Tween 20	

2.2.2.4. Expression und Reinigung von humanem Adrenodoxin

Für die Expression von humanem Adx wurde zunächst eine Vorkultur von 10 ml TB-Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin angesetzt, die mit Zellen aus einem Glycerinstock (*E. coli* C43(DE3) pEThAdx) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert wurde. Die Expression erfolgte in 1 L TB-Medium in 2 L-Erlenmeyerkolben nach der Induktion bei $\text{OD}_{600} = 0,5$ mit 1 mM IPTG für etwa 16 Stunden bei 37 °C und 180 UpM. Das Bakterienpellet wurde in Lysepuffer (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl, pH 8,0) gelöst und mit 1 mM PMSF versetzt. Nach Aufschluß mit Ultraschall wurden die Zelltrümmer durch Ultrazentrifugation bei 30.000 UpM, 30 min, 4 °C pelletiert und der Überstand für die Reinigung verwendet. Der erste Reinigungsschritt erfolgte über einen Anionenaustauscher mit Source 30 Q (GE Healthcare). Nach dem Waschen mit Puffer A (20 mM Tris/HCL, pH 7,5) wurde das Protein mit einem linearen Gradienten eluiert (0-100 % Puffer B (20 mM Tris/HCl + 400 mM NaCl, pH 7,5)). Die Adx-haltigen Fraktionen mit einem Q-Wert ($A_{414\text{nm}}/A_{276\text{nm}} > 0,2$) wurden konzentriert, um den anschließenden zweiten Reinigungsschritt mittels Gelfiltration (Superdex 75, GE Healthcare) mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) durchzuführen. Nach der Gelfiltration wurden die Fraktionen mit einem Q-Wert $> 0,6$ vereinigt und konzentriert. Die Konzentration wurde über das Lambert-Beer'sche Gesetz mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{414\text{nm}} = 11 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ berechnet (Coghlan und Vickery, 1989).

2.2.2.5. Expression und Reinigung von humaner Adrenodoxin-Reduktase

Für die Expression von humaner AdR wurde zunächst eine Vorkultur von 10 ml TB-Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin angesetzt, die mit Zellen aus einem Glycerolstock (*E. coli* C43(DE3) pEThAdR pGro12) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 UpM inkubiert wurde. Die Zellen wurde in 1 L TB-Medium in 2 L-Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 160 UpM bis zu einer OD_{600} von 0,5 kultiviert und dann mit 1 mM IPTG und 4 mg/ml Arabinose induziert. Die Expression erfolgte für 72 Stunden bei 26 °C und 110 UpM. Die Reinigung erfolgte nach Sagara *et al.*, 1993.

2.2.3. Spektroskopische Methoden

2.2.3.1. Bestimmung der optischen Dichte

Die Zelldichte der *E. coli*-Kulturen erfolgte durch die Messung der optischen Dichte (OD) einer Probe gegen die Referenz bei einer Wellenlänge von 600 nm.

2.2.3.2. CO-Differenzspektroskopie

Die Bestimmung der CYP11B2-Konzentration erfolgte durch die Aufnahme von CO-Differenzspektren nach der Methode von Omura und Sato (Omura und Sato, 1964a; Omura und Sato, 1964b). Für die Bestimmung der CYP11B2-Konzentration in den Expressionskulturen wurde eine Probe des Überstandes nach Zellyse und Ultrazentrifugation 1:2 mit Lysepuffer verdünnt. Für die Konzentrationsbestimmung des gereinigten Proteins wurde dieses 1:100 mit Lagerpuffer verdünnt. In beiden Fällen wurden 100 μM DOC zur Stabilisierung des CYP11B2 zugegeben, welches dann mit einer Spatelspitze Natriumdithionit reduziert wurde. Nach Aufnahme der Basislinie wurden die Proben 30 Sekunden mit CO begast und anschließend ein Differenzspektrum aufgenommen. Die Aufnahme des Differenzspektrums wurde solange wiederholt, bis kein Anstieg des Absorptionsmaximums bei 450 nm zu verzeichnen war.

$$c(\text{CYP450}) = \frac{\Delta A_{450-490} * \text{VD}}{\epsilon * d}$$

$c(\text{CYP450})$: Konzentration Cytochrom P450 [mM]

$\Delta A_{450-490}$: Differenz der Absorption bei 450 und 490 nm

VD: Verdünnungsfaktor

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

d: Lichtweg der Küvette [cm]

2.2.3.3. Differenzspektroskopie zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die Bindung von Substraten bzw. Inhibitoren durch CYP11B2 wurde mittels Differenzspektroskopie bestimmt (Schenkman, 1970). Dazu wurden Tandem-Küvetten (Hellma, Müllheim, Deutschland) verwendet, die jeweils 2 Kammern besitzen. Eine 2 μM Lösung von CYP11B2 in Puffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4), 20 % Glycerin, 0,5 % Na-Cholat, 0,05 %

Tween 20) wurde in die Kammern R2 und M2 der Referenz- bzw. der Messküvette gegeben (siehe Abb. 2.1). In den Kammern R1 und M1 befand sich dagegen nur Puffer. In die Kammern R1 und M2 wurde schließlich die zu untersuchende Substanz (gelöst in DMSO) mit steigenden Konzentrationen titriert, während in die Kammern R2 und M1 reines DM-SO in den gleichen Mengen zugegeben wurde. Die Proben wurden 2 Minuten inkubiert und schließlich ein Spektrum von 340 bis 460 nm aufgenommen (Jefcoate, 1978).

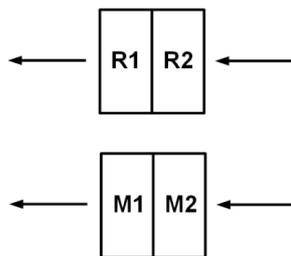


Abb. 2.1.: Aufbau der verwendeten Tandem-Küvetten mit je zwei Kammern. Die Pfeile geben die Richtung des Lichtstrahls an. R: Referenzküvette, M: Messküvette.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D wurde die Substanzkonzentration gegen die Differenz des Absorptionsmaximums und -minimums ($\Delta\text{Abs}_{\text{Max-Min}}$) aufgetragen und anschließend mittels hyperbolischer Regression mit dem Programm Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) bestimmt.

2.2.3.4. Reduktion von Adx und Fdx2

Zur Überprüfung des Elektronentransfers von NADPH auf die Ferredoxine durch AdR wurden $10 \mu\text{M}$ des jeweiligen Ferredoxins mit $0,5 \mu\text{M}$ AdR in 50 mM HEPES (pH 7,4) und $0,05 \%$ Tween 20 angesetzt und ein Spektrum im Bereich von 200 bis 700 nm aufgenommen. Nach der Zugabe von $30 \mu\text{M}$ NADPH wurde erneut ein Spektrum aufgenommen und die Reduktion der Ferredoxine anhand der Abnahme der charakteristischen Maxima bei 414 und 455 nm beobachtet.

2.2.3.5. Bestimmung des Redoxpotentials von Adx und Fdx2

Die Bestimmung der Redoxpotentiale von Adx und Fdx2 wurde spektroskopisch mithilfe des Farbstoffes Safranin T als Redoxindikator durchgeführt (Sligar *et al.*, 1979). Die Probenvorbereitung und Messung erfolgte nach Uhlmann und Bernhardt, 1995.

2.2.4. Untersuchung der enzymatischen Aktivität

2.2.4.1. CYP11B2-abhängiger *in vitro* Substratumsatz

Die Untersuchung der enzymatischen Aktivität des rekombinanten CYP11B2 erfolgte durch die Umsetzung des Substrates in einem rekonstituierten *in vitro*-System. Ein Reaktionsansatz (250 μ l) bestand dabei aus 0,5 μ M CYP11B2, 0,5 μ M AdR, 20 μ M Adx, sowie einem NADPH-regenerierenden System aus 1 mM MgCl₂, 5 mM Glucose-6-Phosphat, 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in 50 mM HEPES (pH 7,4) mit 100 μ M DLPC (1,2-Dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, Sigma-Aldrich). Die Konzentration des Substrates variierte je nach Experiment zwischen 200 und 400 μ M. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 mM NADPH gestartet und für 40 Minuten bei 37 °C und 800 UpM inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 250 μ l Chloroform gestoppt. Zur Berechnung des Extraktionsverlustes wurden 5 nmol Progesteron als interner Standard zugegeben. Die Proben wurden anschließend zweimal mit Chloroform extrahiert und die Chloroformphase mit den Steroiden wurde durch Zentrifugation unter Vakuum eingedampft. Die Proben wurden bis zur HPLC-Analyse bei -20 °C gelagert. Die Reaktionen wurden in der Regel jeweils in dreifacher Ausführung durchgeführt.

2.2.4.2. Fdx2-abhängiger *in vitro* Substratumsatz

Die Untersuchung von humanem Fdx2 als potentieller Elektronenüberträger von AdR auf die Cytochrome P450 der Steroidhormonbiosynthese wurde anhand eines rekonstituierten *in vitro* Substratumsatzes von 11-Desoxycortisol durch humanes CYP11B1 realisiert. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben mit wenigen Änderungen: der Reaktionspuffer enthielt 50 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) mit 0,05 % Tween und die Reaktionszeit betrug 10 Minuten. Fdx2 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen von 0,5 bis 20 μ M eingesetzt. Als Kontrolle für den Elektronentransfer diente ein Umsatz mit humanem Adx.

2.2.4.3. Bestimmung der kinetischen Parameter

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden die Substratumsätze mit unterschiedlichen Konzentrationen von 11-Desoxycorticosteron im Bereich von 0 bis 300 μ M durchgeführt. Das Reaktionsvolumen der Ansätze wurde zur besseren Detektion in den niedrigen Konzentrationsbereichen auf 1 ml erhöht. Da die Reaktionszeit hier nur 1 Minute betrug,

wurden die Proben vor der NADPH-Zugabe auf 37 °C erwärmt, um die optimale Reaktionstemperatur zu gewährleisten. Die Produktbildung wurde über den Substratverbrauch berechnet. Die kinetischen Konstanten K_M und V_{max} wurden durch das Auftragen der Geschwindigkeit des Substratumsatzes gegen die entsprechende Substratkonzentration und hyperbolische Regression mit Hilfe des Programms Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) erhalten.

2.2.5. Analytische Methoden

2.2.5.1. HPLC-Analyse

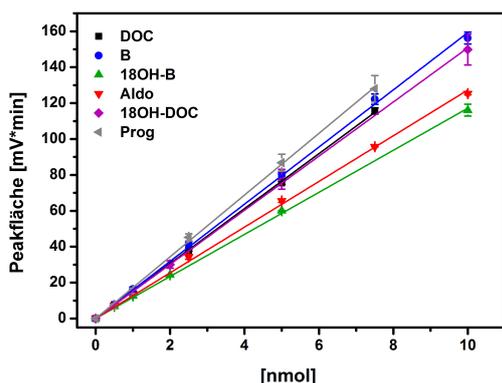
Für die HPLC-Analyse wurden die Steroide eines *in vitro*-Umsatzes in 100 μ l 20 % Acetonitril resuspendiert. Die Analyse erfolgte mit einem HPLC-System der Jasco 2000 Serie. Das verwendete Acetonitril war von höchster Reinheit (CHROMASOLV HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich) und das Wasser wurde zuvor mit einem Milli-Q Biocel-System (Millipore, Bedford, MA, USA) gereinigt. Die mobilen Phasen wurden vor Verwendung im Ultraschall-Bad für 15 Minuten entgast. Zur Trennung der Steroide wurde eine Nucleodur C₁₈ Isis-Säule verwendet mit 5 μ m Partikelgröße, 150 mm Länge, 4,6 mm Innendurchmesser (Macherey-Nagel). Die Säulentemperatur wurde dabei in einem Peltierofen konstant bei 35 °C gehalten. Die Detektion der Steroide erfolgte mittels eines UV/Vis-Detektors bei 240 nm. Die mobile Phase für die Trennung bestand aus einer Acetonitril/Wasser-Mischung gemäß Tabelle 2.7.

Tab. 2.7.: Gradient für die Trennung der Produkte des CYP11B2-Umsatzes.
A: 10 % Acetonitril, B: Acetonitril.

Zeit [min]	Fluss [ml/min]	A [%]	B [%]
0	0,8	80	20
5	0,8	80	20
13	0,8	60	40
20	0,8	20	80
21	0,8	20	80
22	0,8	80	20
30	0,8	80	20

Die HPLC-Analyse der Fdx2-abhängigen Substratumsätze erfolgte nach A. Hobler, 2008 (Hobler, 2008).

Die Berechnung der Steroidmenge in einem Substratumsatz erfolgte anhand von Kalibriergeraden des jeweiligen Steroidstandards (soweit verfügbar) (Abb. 2.2). Anhand der Peakfläche eines Produktes im HPLC-Chromatogramm kann so die absolute Menge bestimmt werden. Über den internen Standard Progesteron, von dem eine Menge von 5 nmol vor der Extraktion der Steroide aus dem Umsatz zugegeben wurde, kann der Extraktionsverlust berechnet und somit die Steroidmenge korrigiert werden.



DOC	$y = 15,309x$	$R^2 = 0,999$
B	$y = 15,922x$	$R^2 = 0,999$
18OH-B	$y = 11,716x$	$R^2 = 0,999$
Aldo	$y = 12,728x$	$R^2 = 0,999$
18OH-DOC	$y = 15,078x$	$R^2 = 0,999$
Prog	$y = 17,195x$	$R^2 = 0,999$

Abb. 2.2.: Kalibriergeraden der Steroide, die zur Berechnung der Steroidmengen in den *in vitro*-Substratumsätzen und der anschließenden HPLC-Analyse herangezogen wurden. 11-Desoxycorticosteron (schwarz), Corticosteron (blau), 18-Hydroxycorticosteron (grün), Aldosteron (rot), 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron (violett) und Progesteron (grau).

19-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron konnte zwar als Standard für die HPLC eingesetzt werden, jedoch war die verfügbare Menge zu gering, um eine Kalibriergerade zu erstellen. Deshalb wurden in den Substratumsätzen nur die Produkte quantifiziert, die in Abbildung 2.2 genannt sind. Weitere mögliche Produkte wurden vernachlässigt, da sie nicht identifiziert sind und ihr Anteil an der Gesamtpeakfläche unter 1 % liegt. Um die Produktbildung unter verschiedenen Bedingungen zu vergleichen, wurde die relative Produktbildung anhand der Stoffmengen von 11-Desoxycorticosteron, Corticosteron, 18-Hydroxycorticosteron, Aldosteron und 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron in einem Umsatz wie folgt berechnet:

$$\text{Relative Produktbildung [\%]} = \frac{\text{nmol}_{\text{Produkt}}}{\sum \text{nmol}_{(\text{DOC, B, 18OH-B, Aldo, 18OH-DOC})}} * 100$$

2.2.5.2. GC-MS Analyse

Um die Ergebnisse der HPLC zu validieren bzw. um noch unbekannte Produkte des CYP11B2-abhängigen DOC-Umsatzes zu identifizieren, wurden die Produkte zusätzlich per GC-MS analysiert. Dazu wurden 10 *in vitro*-Umsätze wie in Abschnitt 2.2.4.1 durchgeführt und die

extrahierten Steroide in 100 μl 20 % Acetonitril resuspendiert. Die anschließende HPLC-Trennung erfolgte mit einem Injektionsvolumen von 40 μl wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben, wobei von der 3. bis zur 20. Minute Fraktionen à 20 Sekunden gesammelt wurden. Diese Fraktionen wurden wiederum eingedampft und erneut in 100 μl 20 % Acetonitril resuspendiert. HPLC-Läufe mit 5 μl pro Fraktion bestätigten die Reinheit der Fraktionen bevor sie zur weiteren Bearbeitung dem Steroidlabor der Universitätsklinik Gießen übergeben wurden. Die Fraktionen wurden für die GC-MS im Stickstoffstrom getrocknet und danach zu Methyloxim-Trimethylsilyl-Ethern derivatisiert. Die Gaschromatographie wurde mittels einer Optima 1 Säule (Macherey-Nagel) durchgeführt. Als Trägergas diente Helium mit einer Flussrate von 1 ml/min. Der Gaschromatograph (Agilent 6890 series GC, Agilent 7683 Series Injector, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) wurde direkt an einen massenselektiven Detektor (Agilent 5973 N MSD, Agilent Technologies) gekoppelt, der im Full-Scan-Modus betrieben wurde. Die Injektion der Probe erfolgte in einem GC-Ofen bei 80 °C in 2 Minuten. Die Temperatur wurde dann mit 2 °C/min auf 190 °C (1 min) erhöht. Für die Trennung der Steroide wurde die Temperatur dann mit 2,5 °C/min auf 272 °C erhöht. Die Steroide wurden anhand von Standards identifiziert.

Die GC-MS-Analyse erfolgte freundlicherweise durch Frau Dr. Michaela Hartmann und Herrn Prof. Dr. Stefan Wudy (Steroidlabor, Universitätsklinikum Giessen).

2.2.6. Bioinformatische Arbeiten

2.2.6.1. Homologie-Modellierung von CYP11B2

Für das Homologie-Modell von humanem CYP11B2 wurde zunächst ein geeignetes strukturelles Template gesucht, welches sich in der Struktur des humanen CYP11A1 fand (PDB-Eintrag 3NA0, mit 20,22-Dihydroxycholesterol). Das Alignment wurde mit ClustalW (Version 2) (Larkin *et al.*, 2007) erstellt und diente als Input für die Homologiemodellierung mit dem Programm SwissModel (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009; Peitsch, 1995). Die Koordinaten für die Porphyrin-Atome des Häm aus der Template-Struktur wurden nachträglich in das erhaltene Homologie-Modell eingefügt. Die Umgebung um das Porphyrin wurde durch Kraftfeld-Optimierung strukturell relaxiert. Dabei wurde ein AMBER94-Kraftfeld mit den in HyperChem implementierten Parametern verwendet (Hypercube Inc., 1999). Die Qualität des Modells wurde mit Ramachandran Plot 2.0 überprüft (Gopalakrishnan *et al.*, 2007).

2.2.6.2. Molekulares Docking

Für das Docking wurden die Liganden manuell erstellt und mittels eines MM⁺ Kraftfeldes, wie es in HyperChem implementiert ist, energetisch optimiert. Mit dem Programm-Paket AutoDock (version 4.00) erfolgte das Docking der Liganden in das CYP11B2-Modell (Huey *et al.*, 2007 Morris *et al.*, 1998). Dazu wurden mit der Windows Version 1.5.2 des Autodock Tools Gasteiger-Marsili-Ladungen für die Liganden berechnet. Dagegen wurden die AMBER94 Partialladungen, die während der strukturellen Optimierung auf die Aminosäuren des Proteins angewendet wurden, nicht verändert (Sanner, 1999). Dem Häm-Eisen wurde eine Partialladung von +0,400 *e* zugewiesen - welche einem Fe(II) entspricht - indem die Partialladungen der bindenden Stickstoffatome auf -0,375 *e* eingestellt wurden. Flexible Bindungen der Liganden wurden automatisch zugewiesen und, wenn notwendig, manuell korrigiert. Eine Gitterbox mit 52 x 68 x 50 Punkten mit einem Gitterabstand von 0,375 Å wurde 5 Å über dem Häm-Eisen platziert, um den Bereich des Proteins zu kennzeichnen, in dem das Docking durchgeführt werden soll. Die Aminosäure-Reste W116, F130 und T318 wurden flexibel behandelt, da sie sich in enger Nachbarschaft zum Porphyrin befinden. Für jeden Liganden wurden 200 Dockingläufe mit dem Lamarck'schen genetischen Algorithmus durchgeführt. Hierbei wurden die Standardeinstellung der Parameter verwendet, bis auf die Mutationsrate, die auf 0,05 erhöht wurde.

2.2.6.3. Berechnung der Wasserstoff-Abstraktion

Die Aktivierungsenergien für die Wasserstoff-Abstraktion wurden über semi-empirische AM1 Berechnungen der Molekülorbitale der Liganden berechnet. Diese wurden abgeleitet von einer linearen Regressionsgleichung mittels der Reaktionsenthalpie und Ionisierungsenergie des Substrat-Radikals als Deskriptor (Mayeno *et al.*, 2009). Die Berechnungen erfolgten in der Abwesenheit des Enzyms, aber sie berücksichtigen ein *p*-Nitrosophenoxy-Radikal als Ersatz für die aktive Sauerstoffspezies des Cytochromes P450, das in der Quantenchemie gut etabliert wurde. So sind die Abstraktionsenergien nur von den Substanzen selbst abhängig und können als maximale Aktivierungsenergien interpretiert werden. Die Berechnungen wurden mit einer modifizierten Version des Programm-Paketes VAMP durchgeführt (Rauhut *et al.*, 1997).

Die Durchführung der Homologiemodellierung, das Docking und die Berechnung der Wasserstoff-Abstraktion wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Michael Hutter am Lehrstuhl für Computational Biology, Universität des Saarlandes, durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Expression von humanem CYP11B2

Die Expression der Aldosteronsynthase (CYP11B2) in Prokaryoten wird durch den Umstand erschwert, dass es sich um ein Membranprotein mit hydrophobem Charakter handelt. Mehr als 20 Jahre schlugen alle Versuche in verschiedenen Laboren fehl, dieses Enzym in ausreichenden Mengen in Mikroorganismen zu exprimieren. Im Rahmen meiner Master-Arbeit konnte ich dieses Protein erstmals heterolog im Modellorganismus *Escherichia coli* exprimieren und anschließend chromatographisch reinigen. Dazu wurde die cDNA der Aldosteronsynthase ohne mitochondriale Signalsequenz in einen pET17b-Vektor kloniert und zusammen mit einem Expressionsvektor für die Chaperone GroEL und GroES in den *E. coli*-Stamm C43(DE3) eingebracht, der für die Expression von Membran- und globulären Proteinen entwickelt wurde (Miroux und Walker, 1996). Die damit erhaltene Ausbeute an gereinigter Aldosteronsynthase reichte aus, um erste *in vitro*-Untersuchungen für deren Charakterisierung durchzuführen (Hobler, 2008).

Zuvor konnte bereits die humane Form der 11 β -Hydroxyase (CYP11B1) in unserem Institut in ähnlicher Weise in *E. coli* exprimiert werden (Zöllner *et al.*, 2008), jedoch ist der durchschnittliche Expressionslevel dieses zu 93 % identischen Proteins wesentlich höher (400 nmol/L Kultur im Vergleich zu 60 nmol/L Kultur für CYP11B2).

Die detaillierte Untersuchung der Aldosteronsynthase in dieser Arbeit verlangte eine ausreichende Menge des gereinigten Enzyms. Deshalb stand zunächst die Optimierung der CYP11B2-Expression in *E. coli* im Vordergrund, bei der verschiedene Parameter geändert und deren Auswirkung auf die CYP11B2-Expression bestimmt wurden.

3.1.1. Optimierung der Expression

Die Expression des humanen CYP11B2 erfolgte in *E. coli* C43(DE3)-Zellen, die in 400 ml TB-Medium (mit Ampicillin und Kanamycin) in 2,8 L Fernbach-Kolben bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,5$ bei 37 °C und 210 UpM inkubiert wurden. Dann erfolgte die Pro-

teinexpression, die mit 0,5 mM IPTG und 4 mg/ml Arabinose induziert wurde. Zusätzlich wurden 1 mM δ -ALA als Häm-Precursor und 50 μ g/ml Ampicillin zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks zugegeben. Die Expression erfolgte bei 27,5 °C und 180 UpM bis ein pH-Wert des Mediums von ungefähr 7,2 erreicht wurde (etwa 20 Stunden). Die Expression des CYP11B2 wird dabei durch die Co-Expression der beiden *E. coli*-Chaperone GroEL und GroES unterstützt. Die damit erhaltenen Expressionslevel betragen etwa 60 nmol/L Kultur. Für die Optimierung wurden zunächst grundlegende Parameter verändert, um deren Effekt auf die Expression des Proteins zu untersuchen. Pro Expressionskultur wurde jeweils nur ein Parameter geändert und die Menge des exprimierten CYP11B2 mit dem einer unveränderten Kontrollkultur verglichen. Das Kulturmedium mit den entsprechenden Antibiotika wurde für die verschiedenen Ansätze aufgeteilt und aus der gleichen Vorkultur inokuliert, um Abweichungen bei der Anzucht zu vermeiden. Da die Übertragung der Expression auf einen kleineren Maßstab nicht erfolgreich war, wurden aus Mangel an Schüttlerkapazitäten mit jedem Parameter nur zwei unabhängige Expressionen durchgeführt.

Wie bereits für die humane Aromatase (CYP19) gezeigt wurde, spielt der pH-Wert des Mediums eine wichtige Rolle bei der heterologen Expression in *E. coli*, wobei dort die höchsten Expressionswerte bei einem pH-Wert von etwa 7,0 erhalten wurden (Kagawa, 2011). Für die Aldosteronsynthese zeigte sich, dass ein etwas höherer pH-Wert zwischen 7,2 und 7,8 die besten Expressionsergebnisse liefert. Da es nach der Induktion zunächst zu einem Absinken des pH-Wertes kommt, der anschließend wieder ansteigt, wurde in einem ersten Schritt die Puffer-Kapazität des Mediums erhöht. Dazu wurde ein zweifach-konzentrierter Kaliumphosphat-Puffer dem TB-Medium (Bezeichnung "2x TB") zugesetzt, um ein zu starkes Absinken des pH-Wertes während der Anfangsphase der Expression zu verhindern und so schneller wieder in den optimalen Bereich zu gelangen. Hierdurch konnte in der ersten Expression keine Verbesserung gegenüber der Kontrollkultur erreicht werden (27 bzw. 22 nmol/L Kultur), jedoch war in der zweiten Expression eine deutliche Erhöhung des Expressionslevel zu verzeichnen (65 bzw 89 nmol/L Kultur).

Eine mögliche Steigerung des Expressionslevels von CYP11B2 könnte durch die Erhöhung der Konzentration des Induktors (IPTG) von 0,5 mM auf 1 mM erreicht werden, wie sie auch bei der Expression anderer Cytochrome P450 in *E. coli* eingesetzt wird (bovines CYP21 (Arase *et al.*, 2006), humanes CYP19 (Kagawa *et al.*, 2004), CYP11B1 (Zöllner *et al.*, 2008), CYP11B2 aus der Ratte (Nonaka *et al.*, 1998)). Beide Expressionskulturen (39 und 97 nmol/L Kultur)¹ zeigten hierbei eine Steigerung des Expressionslevels gegenüber der jeweiligen Kontrollkultur (27 bzw. 65 nmol/L Kultur).

¹Die Abweichung der Expressionslevel gleicher Kulturen ist auf die Durchführung zu unterschiedlichen Zeitpunkten zurückzuführen.

Bei der Aldosteronsynthese handelt es sich um ein Membranprotein, dessen Expression in einem prokaryotischen Organismus nicht trivial ist. Um die korrekte Faltung des Proteins während der Expression zu unterstützen, werden daher die beiden Chaperone GroEL und GroES, deren DNAs sich auf einem zweiten Vektor (pGro12) befinden, co-exprimiert. Die Induktion der Chaperon-Expression erfolgt durch die Zugabe von Arabinose (Nishihara *et al.*, 1998) gleichzeitig mit der IPTG-abhängigen Induktion der CYP11B2-Expression bei einer OD₆₀₀ von 0,5. Es stellte sich jedoch die Frage, ob eine frühere Induktion der Chaperone die Ausbeute an CYP11B2 begünstigt. Daher wurden in einem weiteren Ansatz die Chaperone etwa 15 Minuten vor CYP11B2 induziert (OD₆₀₀ etwa 0,4). In diesem Fall konnte kein eindeutiger Rückschluß auf einen Effekt gezogen werden, da eine Kultur einen leicht erhöhten, die andere Kultur einen leicht niedrigeren Expressionslevel gegenüber der Kontrolle aufwies (32 bzw. 58 nmol/L Kultur ggü. 27 und 65 nmol/L Kultur).

Bei den bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten Fernbach-Kolben aus Polycarbonat konnte während der Inkubation der Expressionskulturen Ablagerungen beobachtet werden, die bei der Reinigung nicht mehr vollständig vom Material entfernt werden konnten und möglicherweise die Proteinexpression ungünstig beeinflussen. Des Weiteren ist der Boden der Polycarbonat-Kolben produktionsbedingt leicht gewölbt und stört somit ein gleichmäßiges Schüttelverhalten der Kultur. Dadurch wird die Schaumbildung begünstigt, was die Durchlüftung des Kulturmediums und damit auch die Expression des Proteins negativ beeinflussen könnte. Die Verwendung von Fernbach-Kolben aus Glas führte tatsächlich zu einer leichten, aber nicht eindeutigen Erhöhung des Expressionslevels (58 und 67 nmol/L Kultur im Vergleich zu 41 und 66 nmol/L Kultur der Kontrolle).

Die *E. coli*-Expression von CYP11B2 aus der Ratte erfolgte in Anwesenheit des Substrates 11-Desoxycorticosteron, welches das Enzym während der Expression stabilisieren und so zu einer höheren Ausbeute führen soll. In dieser Arbeit konnte durch die Zugabe von 100 μ M DOC bei Induktion in beiden Expressionkulturen nur eine negative Auswirkung auf die Proteinexpression festgestellt werden (35 und 49 nmol/L Kultur ggü. 41 und 66 nmol/L Kultur der Kontrolle).

In Tabelle 3.1 ist die prozentuale Zu- bzw. Abnahme der Expressionslevel der unterschiedlichen Kulturen aus 2 unabhängigen Expressionen in Bezug auf die jeweilige Kontrollkultur angegeben. Zu beachten ist, dass die Ausbeute an Protein in der ersten Expression unter dem sonst üblichen Durchschnitt (\sim 60 nmol/L Kultur) lag. Trotzdem hat die Erhöhung der IPTG-Konzentration in beiden Fällen eine positive Auswirkung. Die stärkere Pufferung des TB-Mediums konnte nur in einer Kultur zu einer deutlich erhöhten Ausbeute des Proteins führen. Die frühere Induktion der Chaperone führte in beiden Fällen nicht zu einer wesentlichen Änderung der Proteinexpression und wird daher, auch aufgrund der einfache-

ren Durchführung der Expression, vernachlässigt.

Da die Bestimmung der CYP11B2-Konzentration mittels CO-Differenzspektroskopie im Ly-sat nicht sehr genau ist, können diese Ergebnisse nur als positive bzw. negative Tendenzen der Proteinexpression angesehen werden.

Tab. 3.1.: Vergleich der Expressionskulturen. Prozentuale Zunahme bzw. Abnahme der Expressionslevel von humanem CYP11B2 in Kulturen mit unterschiedlichen Expressionsbedingungen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle.

Kultur	Expression 1 [%]	Expression 2 [%]
2x TB	- 19	+ 37
IPTG	+ 44	+ 49
Chaperone	+ 19	- 11
Glas	+ 42	+ 2
DOC	- 15	- 26

Für die weiteren Expressionen der humanen Aldosteronsynthase wurde das zweifach gepufferte TB-Medium verwendet und die Induktion mit 1 mM IPTG durchgeführt. Durch diese Kombination konnte ein um die Hälfte erhöhter Expressionslevel von etwa 90 nmol/L Kultur erreicht werden.

Eine weitere Überlegung zur Optimierung der CYP11B2-Expression bestand in der Verwendung einer für *E. coli* codon-optimierten cDNA. Die Synthese dieses Gens erfolgte durch die GENEART AG (Regensburg). Die Optimierung der cDNA erfolgte - soweit möglich - durch die Entfernung cis-regulierender Elemente (Spleißstellen, Polyadenylierungssignale, TATA-Boxen, usw.), die sich negativ auf die Expression auswirken können. Zusätzlich wurde der GC-Gehalt reduziert (von 58 % auf 48 %), um die mRNA-Halbwertszeit zu verlängern. Der Codongebrauch wurde auf *E. coli* angepasst und ergab einen nahezu optimalen CAI (Codon Adaption Index) von 0,99, der vor der Optimierung bei 0,7 lag. Das optimierte Gen sollte hohe und stabile Expressionraten in *E. coli* ermöglichen. Für die Expression wurde die optimierte cDNA in einen pET-17b-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Zusammen mit dem Chaperon-Plasmid pGro12 wurde der Vektor in *E. coli* C43(DE3)-Zellen eingebracht.

Zum Vergleich der Expressionslevel ausgehend von der humanen cDNA bzw. der *E. coli*-optimierten cDNA wurden jeweils 3 Kulturen angesetzt. Die Proteinexpression ausgehend von der optimierten cDNA ist überraschenderweise mit etwa 30 nmol/L Kultur deutlich geringer als die Expression ausgehend von der natürlichen cDNA (siehe Abb. 3.1). Auf eine Optimierung der Proteinexpression mit der *E. coli*-optimierten cDNA wurde angesichts des drastischen Unterschiedes verzichtet.

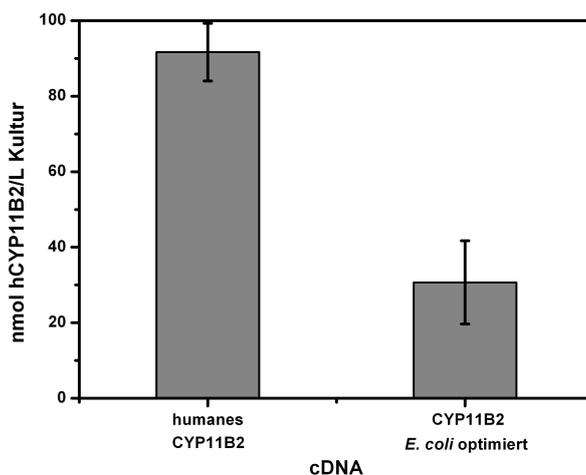


Abb. 3.1.: Vergleich der Proteinexpressionslevel. Die Expression der Aldosteronsynthese erfolgte ausgehend von humaner cDNA bzw. cDNA, die für die Expression in *E. coli* codon-optimiert wurde.

Um die Expression des CYP11B2 zu steigern, wurde außerdem ein Auto-Induktionsmedium getestet, welches von Frau Simone Anderko während ihrer Diplomarbeit bei der Entwicklung eines Ganzzellsystems in *E. coli* zu höheren Expressionleveln von CYP11B2 führte. Dieses Medium basiert auf der Verwendung von drei Kohlenstoffquellen (Glucose, Glycerin, Lactose), die zu einer an den Metabolismus der Zellen angepassten Induktion und so möglicherweise einer erhöhten Expression des rekombinanten Proteins führt. Nachdem Glucose und Glycerin aufgebraucht sind und die Zellen Lactose verstoffwechseln, wird durch die entstehende Galaktose der T7-Promotor des CYP11B2-Plasmids aktiviert und so die Proteinexpression induziert (Studier, 2005).

Anhand eines zeitlichen Verlaufs mit je zwei Kulturen von 2xTB- bzw. Autoinduktionsmedium wurde die Entwicklung der Zelldichte und des pH-Wertes des Mediums verfolgt (Abb. 3.2). Zu mehreren Zeitpunkten wurden aus den Kulturen Proben entnommen, die für die Bestimmung der Ausbeute des CYP11B2 dienten. In beiden Medien erreichen die Zellen nach etwa 12 Stunden die stationäre Phase. Ebenso unterscheidet sich der Verlauf des pH-Wertes nicht sehr stark in den unterschiedlichen Medien. Vergleicht man jedoch die Expression in 2xTB- bzw. im Autoinduktionsmedium so wird hier ein klarer Unterschied deutlich. Die Expression von CYP11B2 im Autoinduktionsmedium ist im gleichen Zeitraum deutlich geringer (3.3). Die höhere Ausbeute an CYP11B2 im *in vivo*-System bedingt durch das Autoinduktionsmedium konnte hier nicht bestätigt werden.

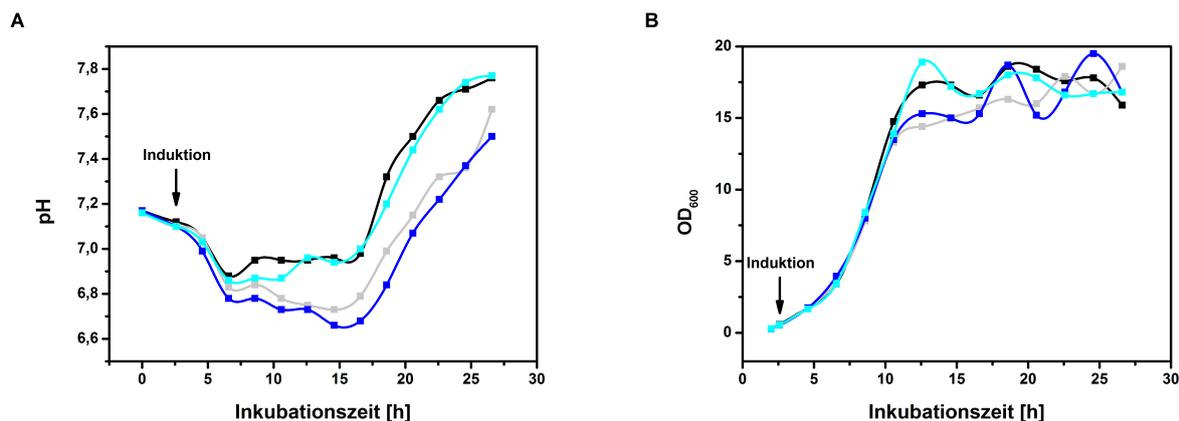


Abb. 3.2.: Vergleich der CYP11B2-Expressionskulturen in 2xTB-Medium und Autoinduktionsmedium. A. Verlauf des pH-Wertes und B. Verlauf der OD₆₀₀ während der Inkubation und Expression der Aldosteronsynthese in 2xTB-Medium (schwarz und grau) und in Autoinduktionsmedium (türkis und blau). Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Induktion der Proteinexpression an.

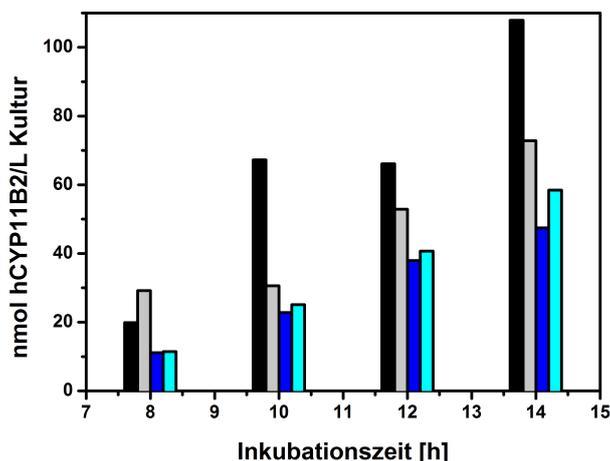


Abb. 3.3.: Vergleich der CYP11B2-Expression. Expressionslevel der Aldosteronsynthese in 2xTB-Medium (schwarz und grau) und Autoinduktionsmedium (türkis und blau).

Eine weitere Anstrengung zur Steigerung der CYP11B2-Expression erfolgte durch die Modifikation der cDNA durch das Einfügen eines N-terminalen 5xLys-Tags. Die Klonierung dieses Konstruktes erfolgte während des F-Praktikums von Frau Simone Anderko unter meiner Anleitung. Dieser Lysin-Tag führte im Fall des CYP51 zu einer immensen Steigerung der Expression (Chen *et al.*, 2010). Diese Steigerung konnte im Vergleich zur WT-cDNA auch für 5xLys-CYP11B2 erreicht werden und führte fast zu einer Verdopplung der Ausbeute (Abb. 3.4). Da das gereinigte Enzym mit Lysin-Tag eine drastisch reduzierte Umsetzung des Substrates 11-Desoxycorticosteron zeigte, wurde das entsprechende Plasmid in den folgenden Expressionen jedoch nicht weiter eingesetzt.

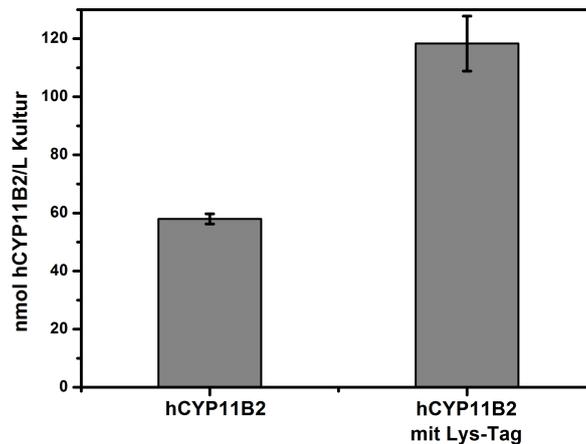


Abb. 3.4.: Vergleich der Proteinexpressionslevel der Aldosteronsynthese als Wildtyps (hCYP11B2) und mit N-terminalem 5xLys-Tag.

Durch die gezielte Optimierung einzelner Parameter und die Kombination der Parameter mit der höchsten Ausbeute konnte somit die Expression der humanen Aldosteronsynthese in *E. coli* um 50 % gesteigert werden.

3.2. Expression und Reinigung von humanem Adx und humaner AdR

Die Untersuchung verschiedener Cytochrome P450 in der Arbeitsgruppe erfolgte bei *in vitro*-Umsätzen durch den Einsatz eines bovinen Elektronentransportsystems, das Elektronen sowohl auf bakterielle als auch humane Cytochrome P450 übertragen kann (Virus *et al.*, 2006; Zöllner *et al.*, 2008). Dazu wurde bovines Adx und bovine AdR heterolog in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Die enzymatische Charakterisierung der humanen Aldosteronsynthese in dieser Arbeit sollte jedoch mit den natürlichen - d. h. den humanen - Redoxpartnern durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde die cDNA für humanes Adx und humane AdR in Expressionsvektoren kloniert, in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt. Die Ergebnisse dazu werden in den folgenden Abschnitten präsentiert.

3.2.1. Adrenodoxin

Für die Expression in *E. coli* wurde die cDNA von humanem Adx ohne mitochondriale Signal-Sequenz in einen pET-15b Expressionsvektor kloniert. Zu Klonierungszwecken erfolg-

te ein Basenaustausch im ersten Codon, der einen Austausch von Serin nach Glycin zur Folge hat. Bis auf diese Ausnahme entspricht die Aminosäuresequenz dabei der von Picado-Leonard *et al.*, 1988 beschriebenen. Die cDNA kodiert auf diese Weise ein Protein mit 124 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 13,7 kDa.

Das Protein wurde nach der Expression durch Anionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie bis zu einem Q-Wert (A_{414nm}/A_{276nm}) von 0,78 gereinigt, bei dem die Reinheit der Proteinpräparation größer als 95 % ist (Xia *et al.*, 1996). Somit konnten etwa 10 mg gereinigtes Adrenodoxin pro Liter Kultur gewonnen werden. Die rötlich-braune Färbung des gereinigten Adx ließ darauf schließen, dass der [2Fe-2S]-Cluster während der Expression in das Protein inkorporiert wurde. Diese Vermutung wurde durch die Messung der Absorption im sichtbaren und ultravioletten Bereich des Lichts bestätigt, bei der das Spektrum des rekombinanten Adrenodoxins die typischen, durch den [2Fe-2S]-Cluster verursachten, lokalen Maxima bei 455, 414 und 321 nm aufwies (siehe Abb. 3.5), (Coghlan und Vickery, 1989). Die Aktivität des Adrenodoxins wurde in CYP11B2-abhängigen *in vitro*-Umsätzen von 11-Desoxycorticosteron bestätigt (siehe Abschnitt 3.5.2.1).

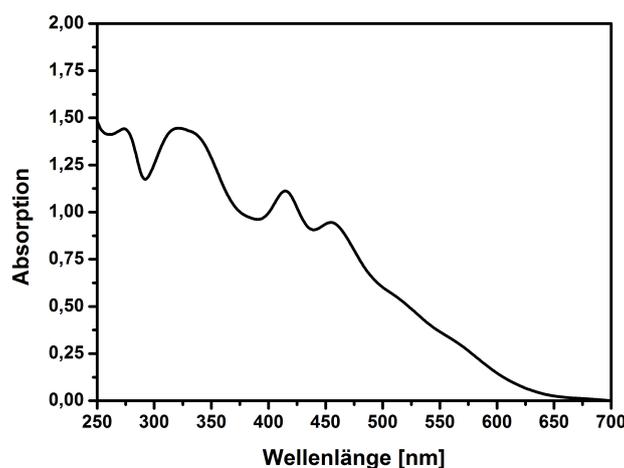


Abb. 3.5.: UV/Vis-Spektrum des oxidierten humanen Adrenodoxins. Die charakteristischen Maxima sind bei 321 und 414 nm sowie einer Schulter bei 455 nm zu erkennen.

3.2.2. Adrenodoxin-Reduktase

Die Klonierung der cDNA für humane Adrenodoxin-Reduktase erfolgte ohne mitochondriale Signal-Sequenz in einen pET-17b Expressionsvektor. Das daraus resultierende Protein entspricht der langen Isoform der AdR mit 465 Aminosäuren (50,7 kDa), die durch eine alternative Spleißform gegenüber der Kurzform 6 zusätzliche Aminosäuren aufweist und darüber hinaus eine natürliche Variante enthält (R123Q) (Solish *et al.*, 1988; Lin, 1990).

Die korrekte Faltung der AdR wurde durch die Co-Expression der beiden *E. coli* Chaperone GroEL und GroES unterstützt (Nishihara *et al.*, 1998). Die Ausbeute an gereinigter humaner AdR betrug etwa 7 mg/L Kultur. Dies stellt somit eine etwa 70-fache Erhöhung der Ausbeute des Proteins dar, im Vergleich zur beschriebenen Methode von Brandt und Vickery mit der etwa 0,1 mg/L Kultur erhalten wurden (Brandt und Vickery, 1992). Die heterolog exprimierte und gereinigte humane Adrenodoxin-Reduktase zeigte im oxidierten Zustand die für Flavoproteine typische gelbe Färbung, die vom Coenzym Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) verursacht wird. Im UV/Vis-Spektrum zeigt diese AdR lokale Maxima bei 376 und 450 nm sowie eine Schulter bei 475 nm (Abb. 3.6), die charakteristisch sind für Ferredoxin-Reduktasen (Sagara *et al.*, 1993; Brandt und Vickery, 1992).

Der Reinheit des Proteins wurde durch die Berechnung des Quotienten A_{270nm}/A_{450nm} ermittelt, bei dem das spezifische Absorptionsmaximum des Proteins (450 nm) in Relation zum allgemeinen Absorptionsmaximum von Proteinen (270 nm) gesetzt wird, das durch aromatische Aminosäuren hervorgerufen wird. Dieser Q-Wert der gereinigten AdR betrug 7,7 und ist vergleichbar mit dem Wert für bovine AdR (7,8) (Sagara *et al.* (1993)). Die Funktionalität der Adrenodoxin-Reduktase *in vitro* konnte in den durchgeführten Substratumsätzen mit CYP11B2 gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.5.2.1).

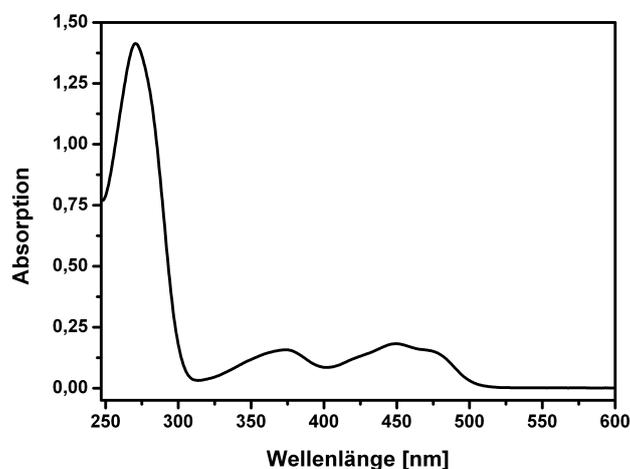


Abb. 3.6.: UV/Vis-Spektrum der oxidierten humanen Adrenodoxin-Reduktase. Die charakteristischen Maxima sind bei 376 und 450 nm sowie einer Schulter bei 475 nm zu erkennen.

3.3. Elektronentransfer mittels Fdx1 und Fdx2

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Roland Lill (Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg) erfolgte die Untersuchung eines zweiten humanen Ferredoxin, Fdx2, in Bezug zu einer möglichen Elektronenübertragung auf Cytochrome P450. Die Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit den molekularen Mechanismen der

Biogenese von Eisen-Schwefel-Proteinen in Eukaryoten. Diese Ferredoxine enthalten einen Eisen-Schwefel-Cluster, der durch einen komplexen Prozess auf- und in das Protein eingebaut wird. Hierbei spielt die mitochondriale ISC-Maschinerie (*Iron Sulfur Cluster*), die aus verschiedenen Proteinen besteht, eine wichtige Rolle (Abb. 3.7).

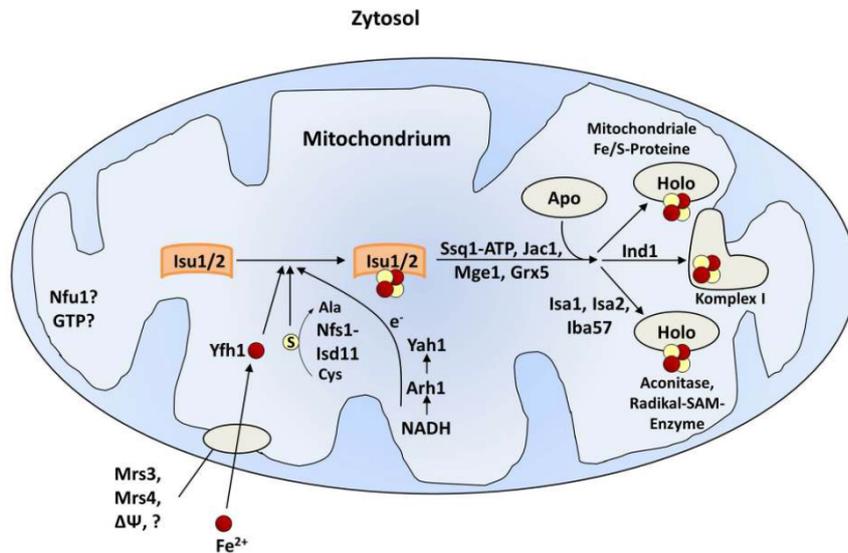


Abb. 3.7.: Mitochondriale ISC-Maschinerie der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) als eukaryotisches Modell. Die Synthese des Eisen-Schwefel-Clusters am Gerüstprotein Isu1 ist abhängig von der Anwesenheit von Reduktionsäquivalenten, die durch die Elektronentransportkette bestehend aus NADH, der Ferredoxin-Reduktase Arh1 und dem Ferredoxin Yah1 geliefert werden (Webert, 2011).

Für die Synthese des Eisen-Schwefel-Clusters werden Reduktionsäquivalente benötigt, die durch die Reduktion eines mitochondrialen Ferredoxins durch eine Ferredoxin-Reduktase unter Verbrauch von NAD(P)H bereitgestellt werden. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, die als eukaryotischer Modellorganismus dient, besteht diese Elektronentransferkette aus der Fdx-Reduktase Arh1 und dem Fdx Yah1 (Lill, 2009). Yah1 ist neben der Assemblierung der Eisen-Schwefel-Cluster auch an der Biosynthese des Häm A beteiligt.

Im Mensch konnte neben Adrenodoxin (Fdx1) ein weiteres Yah1-Homolog identifiziert werden, welches als Fdx2 bezeichnet wird. Beide Ferredoxine besitzen einen $[2Fe-2S]$ -Cluster, sind in den Mitochondrien lokalisiert und können mittels Elektronenübertragung von NADPH durch eine Fdx-Reduktase reduziert werden. Zudem weisen beide Ferredoxine eine relativ hohe Sequenzidentität und -ähnlichkeit mit Yah1 auf. Aus diesem Grund wurde für Adrenodoxin zunächst angenommen, dass es neben der Beteiligung an der Biosynthese der Steroidhormone auch eine Rolle in der Biosynthese der Eisen-Schwefel-Cluster spielt. Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden. Für das bis dahin noch nicht charakterisierte Fdx2 hingegen konnte eine essentielle Funktion in der Biogenese der Eisen-Schwefel-Cluster in menschlichen Zellen nachgewiesen werden (Sheftel *et al.*, 2010). Da Fdx1 und Fdx2 untereinander eine Sequenzidentität von 43 % und eine -ähnlichkeit von 69 % aufweisen, sollte abschließend eine mögliche Beteiligung von Fdx2 an der Elektronenübertragung auf Cyto-

chrome P450 untersucht werden. Dazu wurden in unserer Arbeitsgruppe *in vitro*-Umsätze mit humanem CYP11B1 (11 β -Hydroxylase) und seinem Substrat 11-Desoxycortisol durchgeführt. Hierbei gestaltet sich die Analyse des Umsatzes recht einfach, da nur ein Produkt (Cortisol) gebildet wird, im Gegensatz zu einem Umsatz mit CYP11B2.

Der Vergleich der Produktbildung eines CYP11B1-anhängigen Umsatzes von 11-Desoxycortisol mit verschiedenen Ferredoxin-Homologen (Abb. 3.8) zeigt, dass mit humanem Adx der größte Teil des Substrates 11-Desoxycortisol (RSS) in das Produkt Cortisol (F) umgewandelt wurde, während die homologen Proteine Yah1 aus *S. cerevisiae* und Etp1 aus *S. pombe* eine geringere Aktivität in der Elektronenübertragung auf das CYP11B1 aufweisen und somit weniger Produkt gebildet wird. Wird das humane Fdx2 in der Elektronentransportkette eingesetzt, so ist nur eine minimale Bildung von Cortisol zu beobachten, die unter 1 % der Substratmenge liegt.

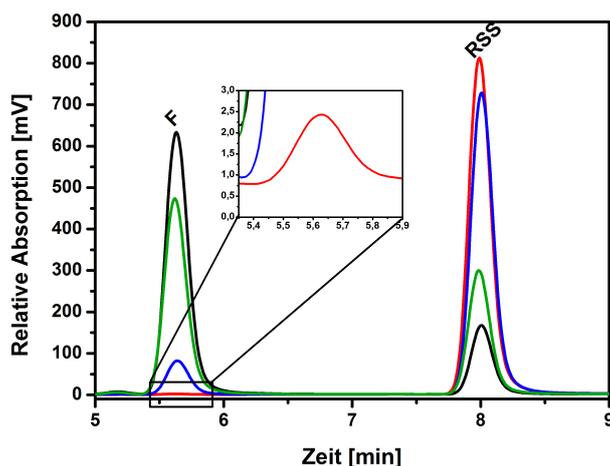


Abb. 3.8.: Umsatz von 11-Desoxycortisol durch CYP11B1. HPLC-Chromatogramme der *in vitro*-Umsätze von 11-Desoxycortisol (RSS) in Cortisol (F) durch CYP11B1 mittels einer rekonstituierten Elektronentransferkette bestehend aus Adx (schwarz), Fdx2 (rot), Yah1 (blau) bzw. Etp1 (grün). Die Umsätze wurden in 50 mM HEPES, pH 7,4 mit 0,05 % Tween 20 bei 37 °C und 800 UpM für 10 Minuten durchgeführt.

Eine genauere Analyse zeigte, dass die Bildung von Cortisol aus 11-Desoxycortisol von der Adx-Konzentration abhängig ist, wobei das Substrat bei einer Konzentration von 20 μ M Adx vollständig in das Produkt umgesetzt werden konnte (Abb. 3.9 A). Fdx2 kann ebenfalls konzentrationsabhängig Cortisol bilden, jedoch sind diese Mengen so gering, dass man hier nicht von einer spezifischen Funktion als Elektronenüberträger auf Cytochrome P450 sprechen kann (Abb. 3.9 B).

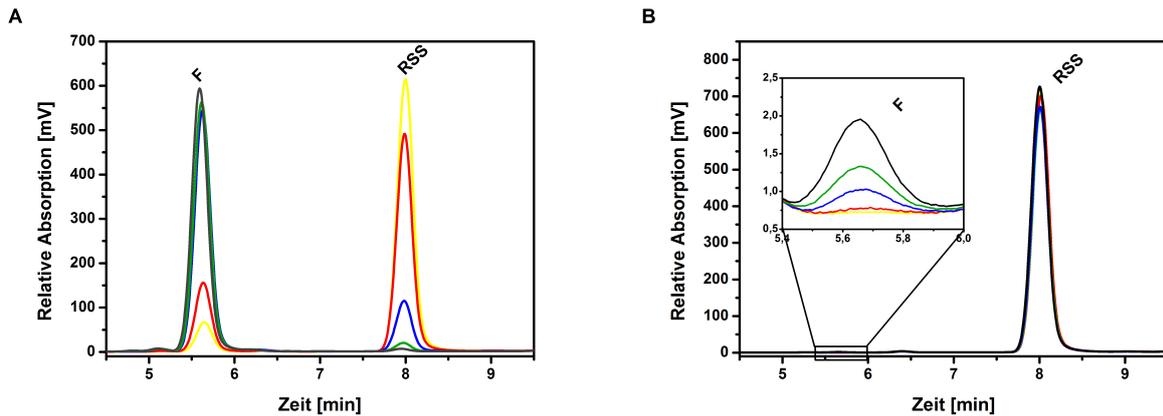


Abb. 3.9.: Umsatz von 11-Desoxycortisol durch CYP11B1. HPLC-Chromatogramme CYP11B1-abhängiger *in vitro*-Umsätze von 11-Desoxycortisol (RSS) mit rekonstituierter Elektronentransferkette bestehend aus Adrenodoxin-Reduktase und **A.** Adrenodoxin bzw. **B.** Fdx2. Die Ferredoxine wurde jeweils in steigenden Konzentration eingesetzt (0,5 μM (gelb), 1 μM (rot), 5 μM (blau), 10 μM (grün), 20 μM (schwarz)) und die Bildung des Produktes Cortisol (F) beobachtet. Der Cortisol-Peak in Abbildung B ist zur besseren Anschauung vergrößert dargestellt. Die Umsätze wurden in 50 mM HEPES, pH 7,4 mit 0,05 % Tween 20 bei 37 °C und 800 UpM für 10 Minuten durchgeführt.

Um zu zeigen, dass nicht die Elektronenübertragung von NADPH auf das Ferredoxin durch die AdR der limitierende Faktor ist, wurden zusätzlich UV-Vis-Spektren der beiden Ferredoxine aufgenommen. Durch die Zugabe von AdR und NADPH konnte eine Reduktion des Eisen-Schwefel-Clusters der Ferredoxine herbeigeführt werden, die in einer Abnahme der charakteristischen Maxima der oxidierten Form (414 und 455 nm) resultiert und der Bildung eines Maximums bei 550 nm bei zunehmender Reduktion (Abb. 3.10). Die Redoxpotentiale der Ferredoxine wurden spektroskopisch mittels des Farbstoffes Safranin T bestimmt und betragen -267 ± 5 mV für Adrenodoxin bzw. -342 ± 5 mV für Fdx2 (Sheftel *et al.*, 2010).

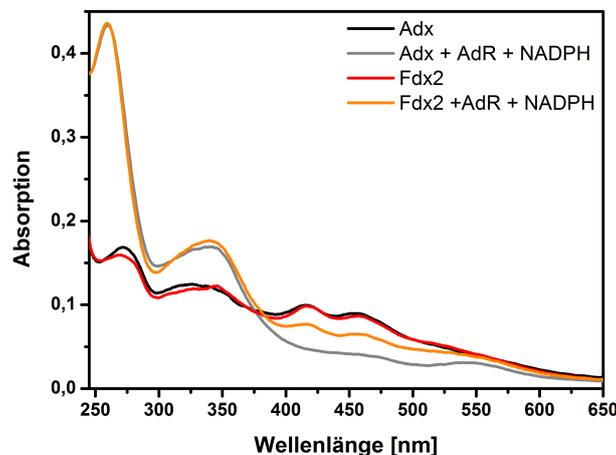


Abb. 3.10.: UV-Vis-Spektren des Adx bzw. Fdx2 vor und nach der Reduktion durch AdR und NADPH.

Ein weiteres Projekt der Arbeitsgruppe von Prof. Lill zielt auf die Umwandlung der Funktionalität des Fdx2 in die des Adx ab. Hierzu erstellte Herr Dr. Holger Weibert mehrere Mutanten, die zur Identifizierung der funktionsrelevanten Proteinabschnitte führen sollten. Die Aufgabe unserer Arbeitsgruppe bestand in der Durchführung von CYP11B1-abhängigen *in vitro*-Umsätzen von 11-Desoxycortisol mittels der Elektronenübertragung dieser Fdx2-Mutanten im Vergleich zu Adrenodoxin. Für die Entwicklung der Mutanten wurden Proteinabschnitte bzw. Residuen ermittelt, in denen sich Adx und Fdx2 unterscheiden und die jeweilige Adx-Sequenz wurde in Fdx2 übertragen. Die Mutationen umfassen die C-terminale Deletion von 12 Residuen (-C12), den Austausch der Helix C (Mutante M3), die Insertion der beiden Reste F43 und G44 des Adx (Mutante M5), sowie die Mutation des Arginins 73 zu Glutamat.

Die *in vitro*-Umsätze von 11-Desoxycortisol mit CYP11B1 zeigten, dass diese Mutationen - sowohl einzeln als auch in Kombination - nur zu einer minimalen Steigerung der Cortisolbildung beitragen. Die beste Mutante (Fdx2 -C12 M3 M5) liegt in ihrer Aktivität jedoch noch weit von der Aktivität des Adx entfernt, um von einer erkennbaren Umwandlung von RSS in Cortisol zu sprechen (Abb. 3.11 A). Der Austausch des positiv geladenen Arginins an Position 73 gegen Glutamat, d. h. gegen eine negativ geladene Aminosäure wie sie in Adx bzw. in Yah1 und Etp1 als Aspartat vorliegt, führt sowohl als Einzelmutation als auch in Kombination mit den oben genannten Mutationen zu einer deutlichen Erhöhung des 11-Desoxycortisol-Umsatzes (Abb. 3.11 B). Der Umsatz des Substrates liegt damit zwar bei etwa 5 %, ist allerdings immer noch sehr gering. Nichtsdestotrotz hat diese Mutation (R73E) einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität des Fdx2, unabhängig davon, mit welchen Mutationen sie kombiniert wurde.

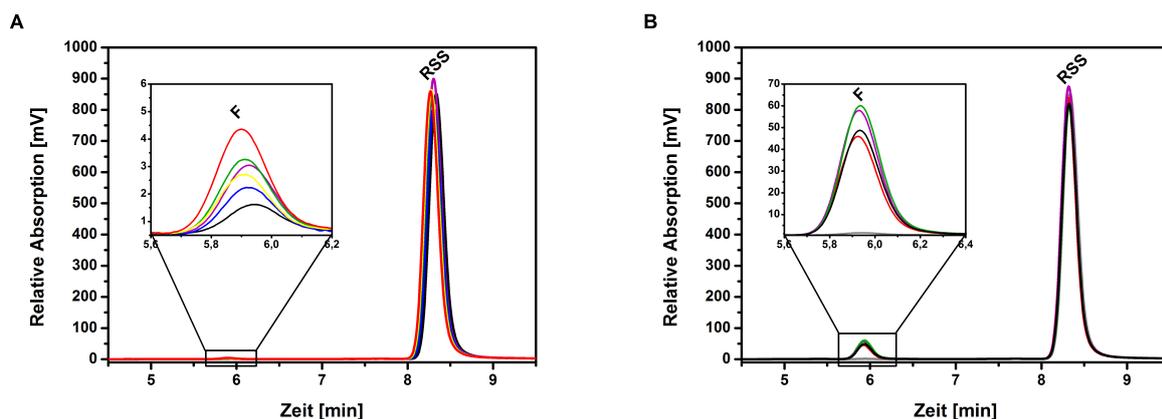


Abb. 3.11.: Umsatz von 11-Desoxycortisol durch CYP11B1 mit Fdx2 bzw. der generierten Mutanten. A. Fdx2 (schwarz), Fdx2 -C12 (violett), Fdx2 M5 (blau), Fdx2 -C12 M5 (grün), Fdx2 M3 M5 (gelb), Fdx2 -C12 M3 M5 (rot). **B.** Fdx2 (grau), Fdx2 R73E (schwarz), Fdx2 -C12 R73E (violett), Fdx2 -C12 M5 R73E (grün), Fdx2 -C12 M3 M5 R73E (rot). Die Umsätze wurden in 50 mM HEPES, pH 7,4 mit 0,05 % Tween 20 bei 37 °C und 800 U μ M für 10 Minuten durchgeführt.

Weiterführende Ergebnisse zum Themenkomplex des humanen Fdx2 sind Bestandteil der Dissertation von Herrn Dr. Holger Webert (Philipps Universität Marburg, 2011) und werden hier nicht weiter diskutiert.

3.4. Produktidentifizierung der *in vitro*-Umsätze

3.4.1. HPLC-Analyse

Die Analyse des Produktmusters von humanem CYP11B2 mittels RP-HPLC wurde ebenfalls gegenüber der vorangehenden Arbeit optimiert, um eine bessere Trennung der Steroide für die quantitative Analyse zu erhalten (Hobler, 2008). Dazu wurde eine Nucleodur C₁₈ Isis-Säule verwendet, die eine spezielle polymer quervernetzte Oberflächen-Modifizierung und somit eine hohe sterische Selektivität besitzt, die besonders für die Trennung von Steroiden empfohlen wird (Macherey-Nagel, 2013). Mit der bis dato verwendeten HPLC-Methode, bei der ein Methanol/Wasser-Gemisch als mobile Phase verwendet wurde, konnte mit der Zeit eine Umlagerung bestimmter Steroide beobachtet werden, weshalb auf ein Acetonitril/Wasser-Gemisch als Eluent umgestellt wurde. Die Temperatur des Peltier-Ofens wurde auf 35 °C erhöht, um Temperaturschwankungen der Säule durch Veränderungen der Umgebungstemperatur zu vermeiden.

Nach erfolgtem Substratumsatz *in vitro* wurden die Steroide extrahiert und für die HPLC-Analyse zur Injektion in der mobilen Phase gelöst. Die mobile Phase der bisherigen HPLC-Methode, ein Methanol-Wasser-Gemisch, führte mit der Zeit zu einer Umlagerung von 18-Hydroxycorticosteron. Das HPLC-Chromatogramm eines 11-Desoxycorticosteron-Umsatzes, von dem ein Teil nach der Probenvorbereitung 2 Tage bei -20 °C gelagert wurde, mit Signalen von Aldosteron, 18-Hydroxycorticosteron und Corticosteron, sowie eines unbekanntes Produktes ist in Abb. 3.12 A dargestellt (zur besseren Übersicht wurde auf die Darstellung von 11-Desoxycorticosteron und des internen Standards verzichtet). Der andere Teil des Umsatzes wurde 2 Tage bei 37 °C gelagert. Das HPLC-Chromatogramm dieser Probe zeigt, dass der Peak von 18-Hydroxycorticosteron nahezu verschwunden ist, dafür aber ein anderer Peak deutlich gestiegen ist (Abb. 3.12 B). Aus diesem Grund wird angenommen, dass es sich dabei um ein Umlagerungsprodukt des 18-Hydroxycorticosterons handelt (Aragones *et al.*, 1978). Der Peak des unbekanntes Produktes wird hier sehr wahrscheinlich aufgrund einer Retentionsverschiebung von Corticosteron überlagert.

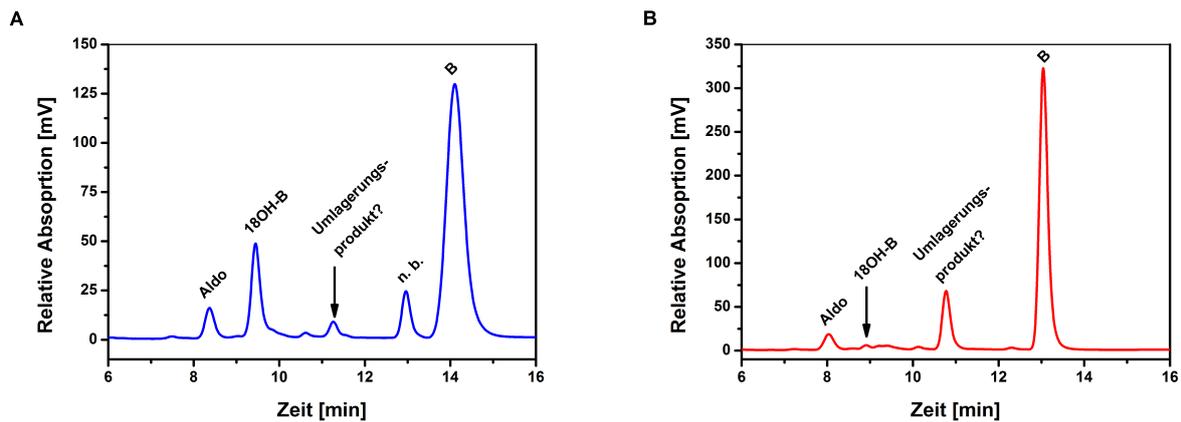


Abb. 3.12.: Trennung der Produkte eines 11-Desoxycorticosteron-Umsatzes durch CYP11B2. Trennung der Steroide mit bisheriger HPLC-Methode und Methanol-Wassergemisch als mobiler Phase auf einer Nucleodur C₁₈ ec-Säule (Hobler, 2008). **A.** Chromatogramm unmittelbar nach Extraktion und Probenvorbereitung, **B.** Chromatogramm nach 2 Tagen Probenlagerung. Zur besseren Betrachtung ist nur der Bereich dargestellt, in dem die relevanten Peaks der Umlagerung liegen. In Chromatogramm A sind die Peaks zweier unbekannter Produkte vorhanden.

Durch die Umstellung der mobilen Phase auf ein Acetonitril-Wasser-Gemisch konnte keine Umlagerung der Steroide mehr beobachtet werden (Abb. 3.13).

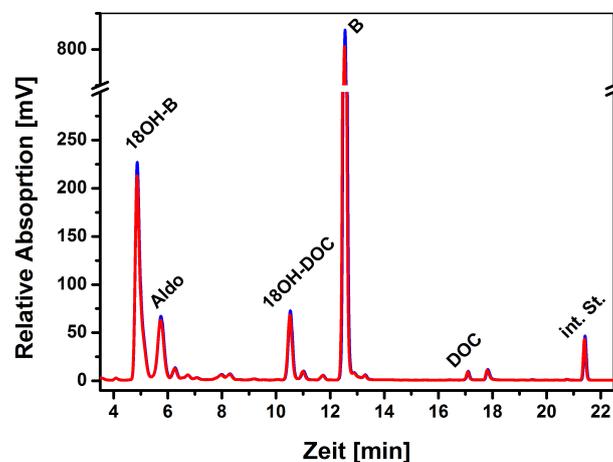


Abb. 3.13.: Trennung der Produkte eines 11-Desoxycorticosteron-Umsatzes durch CYP11B2. Trennung der Steroide mit verbesserter HPLC-Methode und Acetonitril-Wassergemisch als mobiler Phase auf einer Nucleodur C₁₈ Isis-Säule. Chromatogramm unmittelbar nach Extraktion und Probenvorbereitung (blau) und Chromatogramm nach 2 Tagen Probenlagerung (rot).

Durch die verbesserte Methode können nun die Produkte eines CYP11B2-abhängigen Umsatzes von 11-Desoxycorticosteron optimal getrennt werden (siehe Abb. 3.14), die anhand der Retentionszeit im Vergleich zu Steroidstandards (soweit verfügbar) zugeordnet wurden. Zur Verifizierung ihrer Identität wurden die einzelnen Produkte eines Umsatzes zusätzlich einer GC-MS-Messung unterzogen.

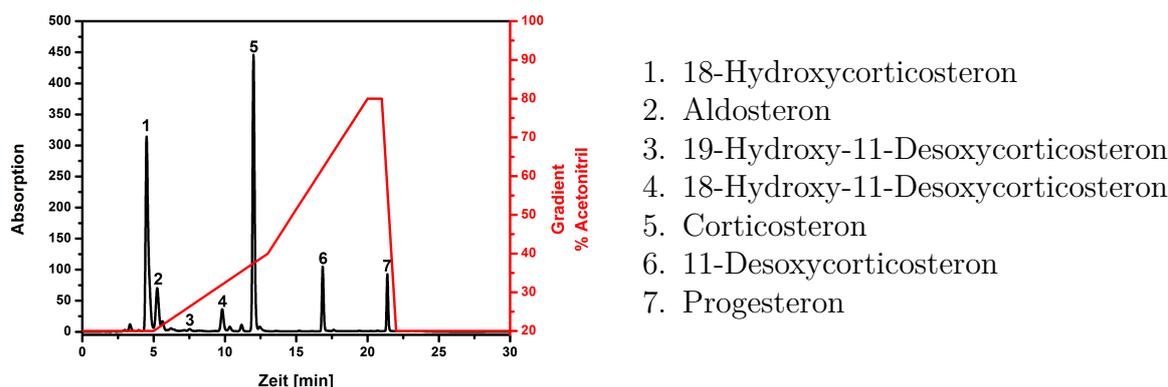


Abb. 3.14.: HPLC-Chromatogramm eines CYP11B2-abhängigen Umsatzes von 11-Desoxycorticosteron nach Optimierung der Trennmethode. Die identifizierten Produkte sind nummeriert und aufgelistet. Der Verlauf des Gradienten ist rot dargestellt.

3.4.2. GC/MS-Analyse

Zur Validierung der HPLC-Analyse und Identifizierung unbekannter Produkte, die CYP11B2 ausgehend von 11-Desoxycorticosteron bildet, wurde eine GC-MS-Analyse durchgeführt. Die mittels HPLC detektierten Produkte wurden gesammelt und für die GC-MS-Analyse derivatisiert. Durch die Elektronenstoßionisation, gekoppelt mit GC-MS, entstehen charakteristische Bruchstücke, die hochspezifische strukturelle Informationen über die Produkte liefern. Für die Fraktionierung der Produkte mußten mehrere *in vitro*-Umsätze durchgeführt werden, um ausreichende Mengen der einzelnen Produkte zu erhalten. Abbildung 3.15 zeigt das HPLC-Chromatogramm eines einfachen DOC-Umsatzes durch CYP11B2 (schwarz), sowie das Chromatogramm des HPLC-Laufs, bei dem die Fraktionierung der Produkte erfolgte (rot). Die Nummerierung der Produktpeaks wurde bereits in Abb. 3.14 gezeigt; die Zuordnung der einzelnen Fraktionen zu diesen Peaks ist in Tab. 3.2 dargestellt. Weiterhin sind in dieser Tabelle die charakteristischen Massenfragmente der einzelnen Steroide aufgelistet, die durch die Fragmentierung entstehen: $[M]^+$ Molekülion (unterstrichen), $[M - 15]^+$ Verlust der Methylgruppe ($-\text{CH}_3$), $[M - 31]^+$ Verlust der Methoxygruppe ($-\text{OCH}_3$), $[M - 90]^+$ Verlust des Trimethylsilanols ($-\text{HOSi}(\text{CH}_3)_3$), $[M - 103]^+$ Verlust des primären Trimethylsilanols ($-\text{CH}_2\text{HOSi}(\text{CH}_3)_3$). Die Steroidprodukte wurden bei der GC-MS anhand von Standards (DOC, B, 18OH-B, Aldosteron, 18OH-DOC) identifiziert.

Das Substrat 11-Desoxycorticosteron, sowie die Produkte Corticosteron, 18-Hydroxycorticosteron, Aldosteron und 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron konnten durch den Vergleich mit den Referenzspektren eindeutig identifiziert werden. Das Massenspektrum von Fraktion 7 weist ein Molekülion $[M]^+$ von m/z 636 auf, welches sich im Basispeak befindet. Diese Tatsache ist typisch für 19-hydroxylierte Steroide, weshalb vermutet wird, dass es sich bei dieser Substanz höchstwahrscheinlich um 19-Hydroxycorticosteron handelt. Ein weiteres 19-hydroxyliertes Produkt, 19-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron, findet sich mit ziemlicher

Sicherheit in Fraktion 11. Bei den Komponenten in den Fraktionen 12 und 20 handelt es sich möglicherweise um DOC-Isomere, die an anderen Positionen als C19 hydroxyliert sind, da die entsprechenden Spektren ein anderes Ionen-Verteilungsmuster zeigen alle mit $[M]^+$ von m/z 548, aber $[M-15]^+$ oder $[M-31]^+$ als Basispeaks. Die Substanz in Fraktion 23 konnte weder durch die Suche in der NIST-Bibliothek (National Institute of Standard and Technology) noch durch das Fragmentierungsmuster als Steroid identifiziert werden.

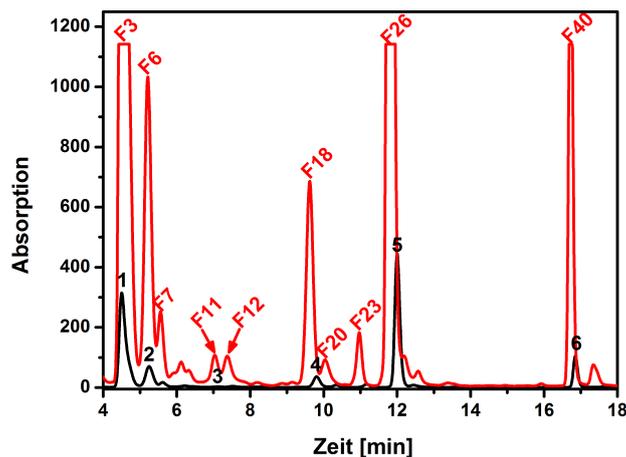


Abb. 3.15.: HPLC-Chromatogramme CYP11B2-abhängiger Umsätze von 11-Desoxycorticosteron für die Fraktionierung der einzelnen Produktpeaks. Chromatogramm der Referenz (schwarz), sowie des HPLC-Laufs bei Produktfraktionierung für die GC-MS (rot). Die angegebenen Fraktionen (F) enthielten nur ein Produkt und wurden für die GC-MS-Analyse verwendet.

Tab. 3.2.: GC-MS-Ergebnisse nach Analyse der Fraktionen mit den jeweils charakteristischen Massenfragmenten der TMS-Derivate. Unterstrichene Fragmente: jeweiliges Molekülion, unbekannt: Steroid mit Hydroxylierung an unbekannter Position, n. id.: nicht als Steroid identifizierbare Substanz.

Fraktion	HPLC-Peak	Substanz	Massenfragmente (m/z)
3	1	18OH-B	<u>636</u> , 605, 546, 515
6	2	Aldo	<u>562</u> , 459
7	-	unbekannt	
11	3	19OH-DOC	
12	-	unbekannt	
18	4	18OH-DOC	<u>548</u> , 517, 458, 427
20	-	unbekannt	
23	-	n. id.	
26	5	B	<u>548</u> , 517, 458, 427
40	6	DOC	<u>460</u> , 445, 429, 339

3.4. PRODUKTIDENTIFIZIERUNG DER IN VITRO-UMSÄTZE

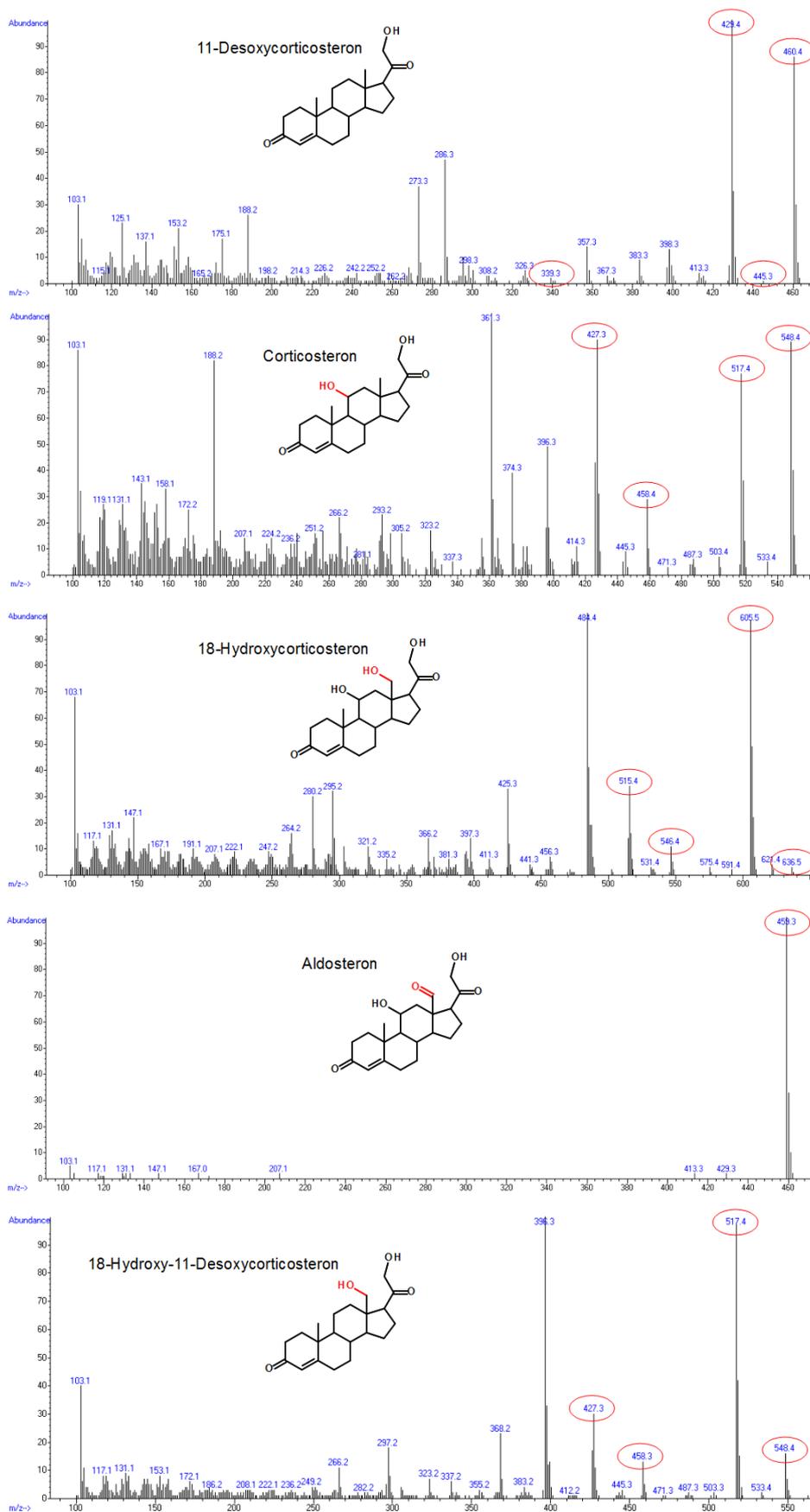


Abb. 3.16.: Massenspektren der identifizierten Steroide eines CYP11B2-abhängigen DOC-Umsatzes. Die charakteristischen Massenfragmente sind rot umrandet.

3.5. Funktionelle Charakterisierung des CYP11B2

3.5.1. Differenzspektroskopie zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die spektralen Eigenschaften der Cytochrome P450 bieten die Möglichkeit, die Bindung eines Substrates oder Inhibitors an das Protein zu untersuchen. Durch die Bindung eines Liganden im aktiven Zentrum wird eine Änderung im sichtbaren Bereich des Cytochrom P450-Absorptionspektrums von etwa 350 bis 450 nm hervorgerufen. Dabei wird zwischen zwei Arten der Änderung unterschieden: Eine sogenannte Typ I-Verschiebung, die charakteristisch für die Bindung eines Substrates ist, entsteht durch die Verdrängung des Wassermoleküls an der 6. Koordinationsstelle des Häm-Eisens, wodurch es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von etwa 420 nm (*low-spin* Zustand) zu etwa 390 nm (*high-spin* Zustand) kommt. Substanzen, die als Inhibitoren eines Cytochroms P450 wirken, verursachen bei der Bindung im aktiven Zentrum dagegen meist einen Typ II-*Shift*, bei dem das Absorptionsmaximum von etwa 420 nm zu 425 bis 436 nm verschoben wird. Diese Verschiebung wird verursacht durch die Verdängung des Wassermoleküls durch den Stickstoff eines Azol-Inhibitors, wobei jedoch der Koordinationszustand und der Spin des Häm-Eisens unverändert bleiben (Ortiz Montellano, 2005; Podust *et al.*, 2007).

Die Differenzspektren erlauben die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D , die ein Maß für die Stärke der Bindung eines Liganden zum Protein ist. Die Dissoziationskonstante kann durch die Zugabe steigender Mengen eines Liganden zum Protein und die Auftragung der Differenz des Absorptionsmaximums und -minimums gegen die Ligandenkonzentration mit anschließender Regression mit hyperbolischer Funktion ermittelt werden.

Im Zuge meiner Masterarbeit konnte ich bereits zeigen, dass 11-Desoxycorticosteron in der Lage ist, einen Typ I-*Shift* zu induzieren, womit die Bindungsstärke bestimmt werden konnte (Hobler, 2008). Für die weitere Charakterisierung des Enzyms und insbesondere für ein besseres Verständnis der katalysierten Reaktionen ist es jedoch von entscheidendem Interesse, auch die Dissoziationskonstanten der einzelnen Intermediate der CYP11B2-Reaktion zu ermitteln. Darüber hinaus wurde auch die Bindung einiger allgemeiner Cytochrom P450-Inhibitoren analysiert.

Wie bereits erwähnt, konnte für 11-Desoxycorticosteron ein Typ I-*Shift* beobachtet werden (Abb. 3.17 A). Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten mußte das Substrat bis zu einer Konzentration von 150 μM zugegeben werden, um in die Sättigung zu gelangen. Damit ergab sich ein K_D -Wert von $2,38 \pm 0,06 \mu\text{M}$ (Abb. 3.17 B). Das erste Intermediat der CYP11B2-Reaktion, Corticosteron, ist ebenfalls in der Lage, einen Typ I-*Shift* zu induzieren (Abb. 3.17 C), muss für das Erreichen der Substratsättigung jedoch bis zu einer Konzentration

on von $1500 \mu\text{M}$ zugegeben werden. Der daraus resultierende K_D -Wert von $115,08 \pm 5,97 \mu\text{M}$ (Abb. 3.17 D) zeigt, dass die Bindung dieses Intermediates wesentlich schlechter ist als die des Substrates. Das nächste Intermediat, 18-Hydroxycorticosteron, sowie das Endprodukt, Aldosteron, konnten selbst in einer Konzentration von 1 bzw $0,5 \text{ mM}$ keine Verschiebung hervorrufen. 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron, welches ein Nebenprodukt der Reaktion zu sein scheint, konnte ab etwa $50 \mu\text{M}$ einen Typ I-*Shift* induzieren. Vergleicht man dies mit der Titration von Corticosteron, bei dem ein erster *Shift* mit $10 \mu\text{M}$ beobachtet werden konnte, so besteht bei 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron nicht die Möglichkeit, in die Sättigung zu gelangen und die Dissoziationskonstante zu bestimmen. Die ermittelten K_D -Werte sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

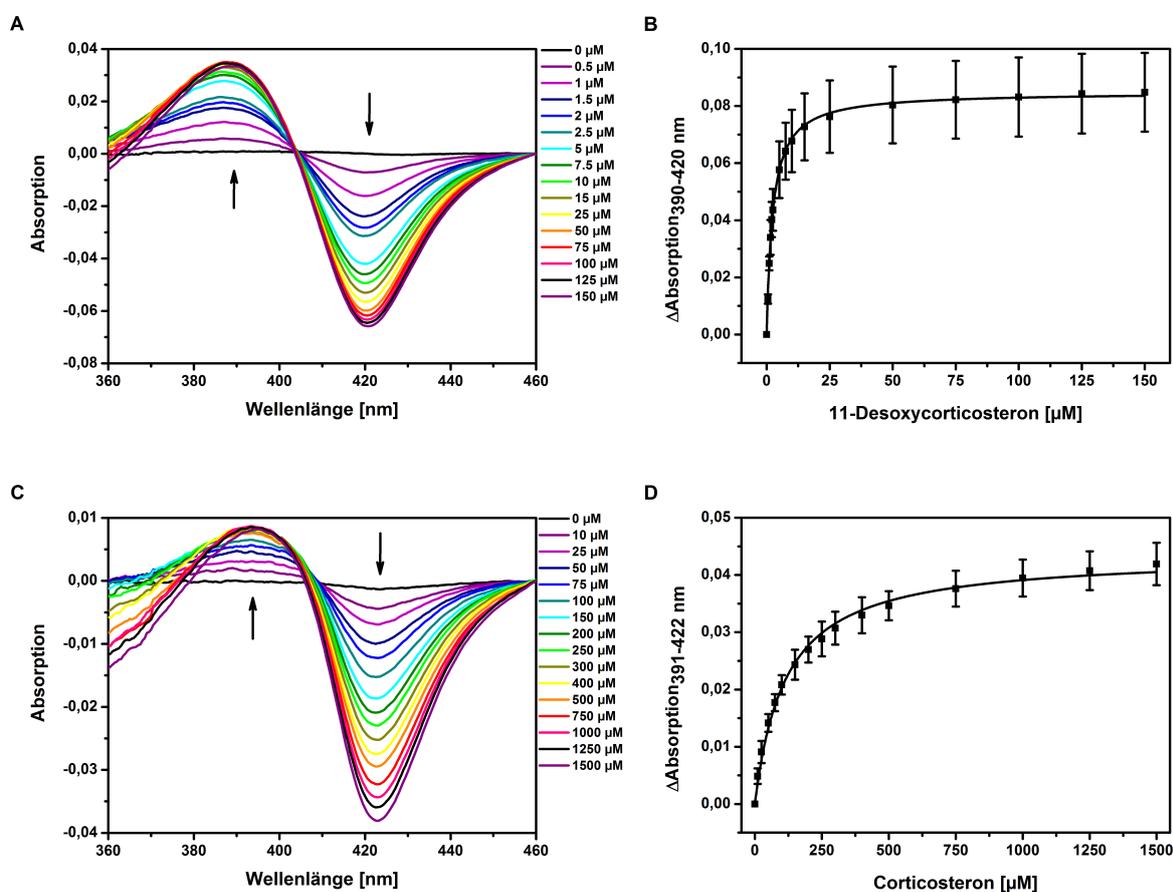


Abb. 3.17.: Differenzspektren von humanem CYP11B2 mit Substrat bzw. Intermediat. A. 11-Desoxycorticosteron und **C.** Corticosteron. Die Liganden wurden jeweils in steigenden Mengen zur Enzymlösung ($2 \mu\text{M}$ CYP11B2 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, $\text{pH } 7,4$, 20% Glycerol, $0,5 \%$ Na-Cholat, $0,05 \%$ Tween 20) zugegeben und die Differenzspektren nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten bei RT aufgenommen. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D wurde die Differenz des Maximums und des Minimums jedes Spektrums gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen und die Daten mittels hyperbolischer Regression ausgewertet: **B.** 11-Desoxycorticosteron und **D.** Corticosteron.

Die Methode der Differenzspektroskopie wurde darüber hinaus für die Untersuchung der Bindung von Inhibitoren genutzt. Hierfür wurden die allgemeinen Cytochrom P450-Inhibitoren Ketoconazol und Miconazol verwendet, bei denen es sich um Azol-Derivate handelt und die als antimykotische Arzneimittel Anwendung finden. Zusätzlich wurde die Bindung von

Spirolacton analysiert, das als kompetitiver Antagonist von Mineralocorticoiden fungiert (Denner *et al.*, 1995b).

Sowohl Ketoconazol als auch Miconazol induzierten einen Typ II-*Shift* (Abb. 3.18 A bzw. C), der charakteristisch für die Bindung eines Inhibitors im aktiven Zentrum ist. Beide Inhibitoren binden mit einem K_D von $0,63 \pm 0,085 \mu\text{M}$ bzw. $0,52 \pm 0,11 \mu\text{M}$ wesentlich stärker an das Enzym als das Substrat 11-Desoxycorticosteron (Abb. 3.18 B bzw. D). Spirolacton hingegen zeigt einen Typ I-*Shift* (Abb. 3.18 E) mit dem ein K_D -Wert von $4,11 \pm 0,42 \mu\text{M}$ ermittelt wurde. Somit ist die Bindung von Spirolacton etwas schwächer als die des Substrates 11-Desoxycorticosteron (Abb. 3.18 F).

Die Dissoziationskonstanten der Inhibitoren sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Der Einfluss der Inhibitoren in CYP11B2-abhängigen Substratumsätzen wird in Abschnitt 3.5.2.9 behandelt.

Tab. 3.3.: Übersicht der Dissoziationskonstanten und Regressionskoeffizienten verschiedener Substanzen, sowie Typ des induzierten Spektrums der humanen Aldosteronsynthese. n. b. = nicht bestimmbar.

Substanz	K_D [μM]	R^2	Typ
DOC	$2,38 \pm 0,06$	0,999	I
B	$115,08 \pm 5,97$	0,995	I
18OH-B	n. b.	n. b.	n. b.
Aldosteron	n. b.	n. b.	n. b.
18OH-DOC	n. b.	n. b.	I
Ketoconazol	$0,63 \pm 0,085$	0,974	II
Miconazol	$0,52 \pm 0,11$	0,946	II
Spirolacton	$4,11 \pm 0,42$	0,975	I

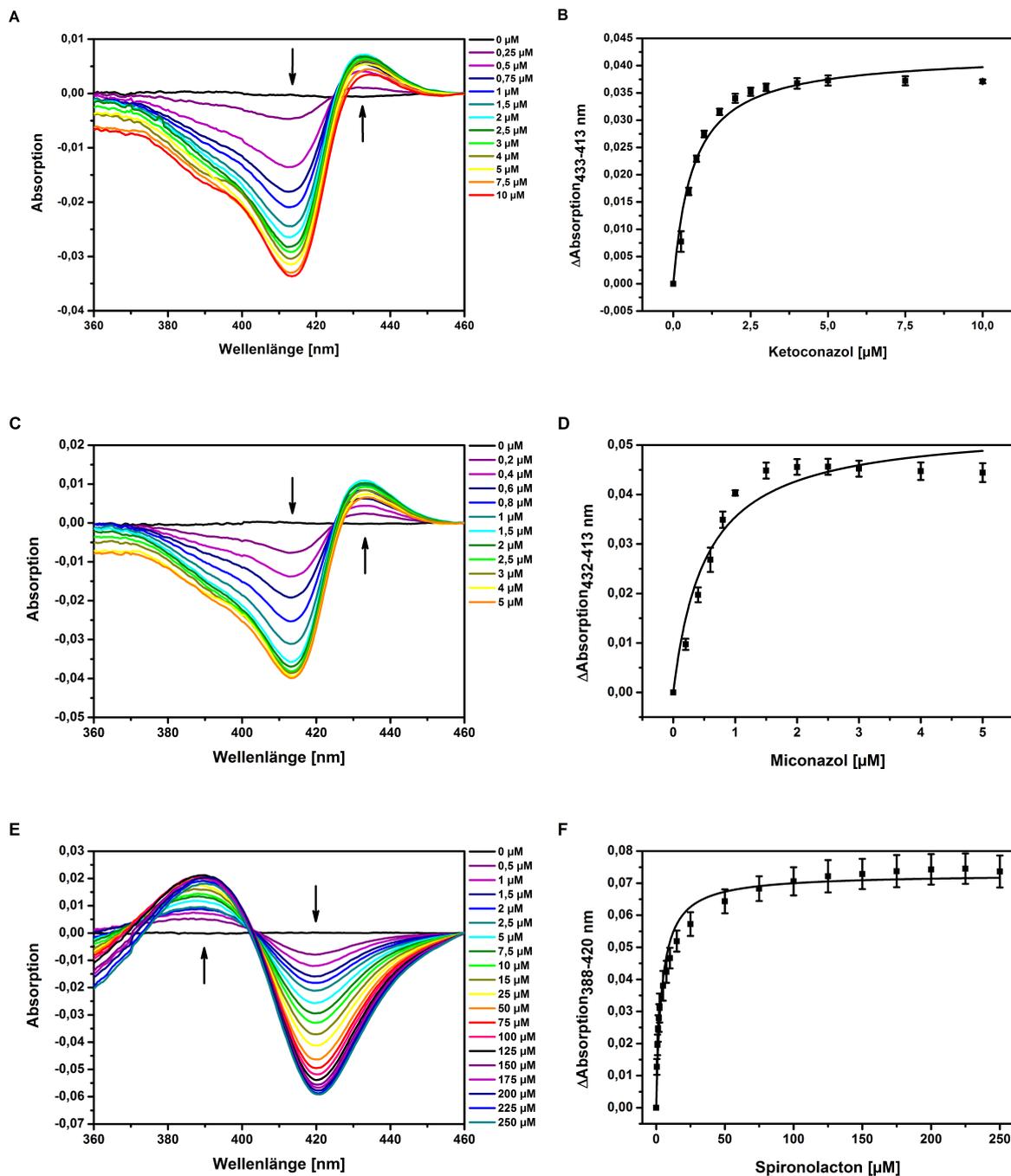


Abb. 3.18.: Differenzspektren von humanem CYP11B2 mit verschiedenen Inhibitoren. A. Ketoconazol, **C.** Miconazol und **E.** Spironolacton. Die Inhibitoren wurden jeweils in steigenden Mengen zur Enzymlösung (2 μ M CYP11B2 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20 % Glycerol, 0,5 % Na-Cholat, 0,05 % Tween 20) zugegeben und die Differenzspektren nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten bei RT aufgenommen. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde die Differenz des Maximums und des Minimums jeden Spektrums gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen und die Daten mittels hyperbolischer Regression ausgewertet: **B.** Ketoconazol, **D.** Miconazol, **F.** Spironolacton.

3.5.2. Substratumsätze *in vitro*

In meiner Masterarbeit konnte ich bereits zeigen, dass die gereinigte Aldosteronsynthase *in vitro* in der Lage ist, ihr Substrat 11-Desoxycorticosteron in die Hauptprodukte Corticosteron, 18-Hydroxycorticosteron und Aldosteron umzusetzen (Hobler, 2008). Ebenso konnte 19-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron identifiziert werden, welches jedoch in sehr geringen Mengen gebildet wird. In der vorliegenden Arbeit konnte zudem ein weiteres Produkt, 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron, identifiziert werden. Da in der Masterarbeit nur ein kurzer Einblick in die Funktionsweise der Aldosteronsynthase gegeben wurde, sollte eine weiterführende Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von CYP11B2 Gegenstand dieser Arbeit sein. Das *in vitro*-System wurde analog zu dem von Zöllner *et al.* für CYP11B1 verwendet (Zöllner *et al.*, 2008). Während CYP11B1 sein Substrat jedoch in nur ein Produkt umsetzt, werden bei CYP11B2 aus dem Substrat bisher 5 bekannte Produkte gebildet. Die Analyse dieses Produktmusters gestaltet sich deshalb deutlich komplexer in Bezug auf die verschiedenen Reaktionsschritte.

Die funktionelle Aktivität des Enzyms wurde durch CYP11B2-abhängige Substrat-Umsätze untersucht, bei denen das gereinigte Enzym mit Substrat in einem Reaktionspuffer inkubiert wird. Die für die Reaktion benötigten Elektronen werden von NADPH durch ein Elektronentransportsystem, bestehend aus Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase, auf das Enzym übertragen. Das Produktmuster wurde anschließend mittels HPLC analysiert und die Steroidmengen anhand von Kalibriergeraden quantifiziert. Zum besseren Vergleich der Umsätze unter verschiedenen Bedingungen wurde hier die relative Produktbildung der bekannten und quantifizierbaren Produkte ausgehend von 11-Desoxycorticosteron angegeben, d. h. 11-Desoxycorticosteron, Corticosteron, 18-Hydroxycorticosteron, Aldosteron und 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron bilden 100 %. 19-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron wurde hierbei vernachlässigt, da es nur in sehr geringen Mengen gebildet wird und nicht quantifiziert werden konnte.

3.5.2.1. Elektronentransfersystem

Im Gegensatz zu den Umsätzen in meiner Masterarbeit wurden einige Änderungen im Reaktionsansatz vorgenommen. So wurden humanes Adrenodoxin und humane Adrenodoxin-Reduktase - statt bovinem - verwendet, um damit die Interaktion der natürlichen Redoxpartner zu ermöglichen. Bei diesen Umsätzen zeigte sich, dass sowohl das rein humane System als auch das Mischsystem etwa gleich viel 11-Desoxycorticosteron verbraucht (Abb. 3.19). Jedoch wird mit den humanen Elektronentransferpartnern ähnlich viel 18-Hydroxycorticosteron und etwas mehr Aldosteron gebildet als mit bovinem Adx und AdR.

Die verringerte Bildung dieser beiden Produkte im bovinen Umsatz führt zu einer höheren Menge an Corticosteron, da dieses nicht weiter umgesetzt wird. Die Menge an gebildetem 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron ist etwa gleich.

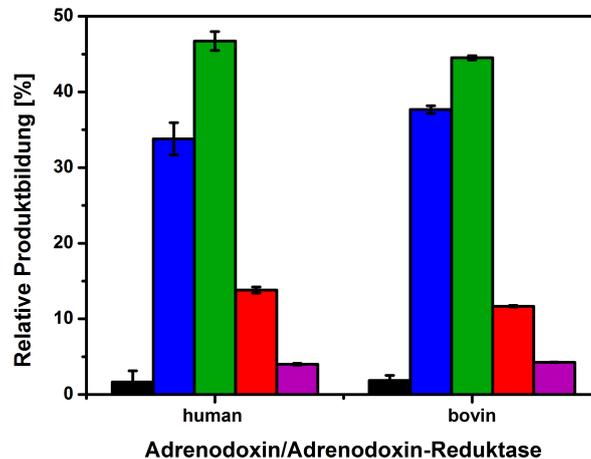


Abb. 3.19.: Vergleich der Produktbildung durch humanes CYP11B2 und der humanen bzw. bovinen Redoxpartner Adx und AdR. Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 μ M CYP11B2, 20 μ M Adx, 0,5 μ M AdR und 400 μ M DOC inkubiert. DOC: schwarz, Corticosteron: blau, 18OH-B: grün, Aldosteron: rot, 18OH-DOC: violett.

Das Verhältnis der Redoxpartner zum Enzym hat einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung der Produkte, da die für die Reaktion erforderlichen Elektronen von NADPH auf CYP11B2 übertragen werden müssen. Insbesondere bei der Bildung von Aldosteron müssen 6 Elektronen für die Reaktion bereitgestellt werden. Die Menge an Adrenodoxin spielt hierbei eine wichtige Rolle, da es die Elektronen von der Adrenodoxin-Reduktase aufnimmt und an das Cytochrom P450 abgibt. Durch unterschiedliche Mengen an Adrenodoxin wurde das Verhältnis von AdR, Adx und CYP11B2 von 1:1:1 bis 1:40:1 variiert und die Bildung der Produkte gemessen (Abb. 3.20). Es zeigte sich, dass bei geringen Konzentrationen des Adx überwiegend Corticosteron gebildet wird. Mit steigender Adx-Konzentration wird dann der Umsatz von 11-Desoxycorticosteron stärker in Richtung 18-Hydroxycorticosteron und Aldosteron verschoben. Die Bildung von 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron bleibt relativ unberührt vom Verhältnis der Redoxpartner. Standardmäßig wurden schließlich 20 μ M Adx in den Reaktionsansätzen verwendet, da hier die Menge des gebildeten Aldosterons am höchsten ist und sich somit am besten für die Analyse eignet.

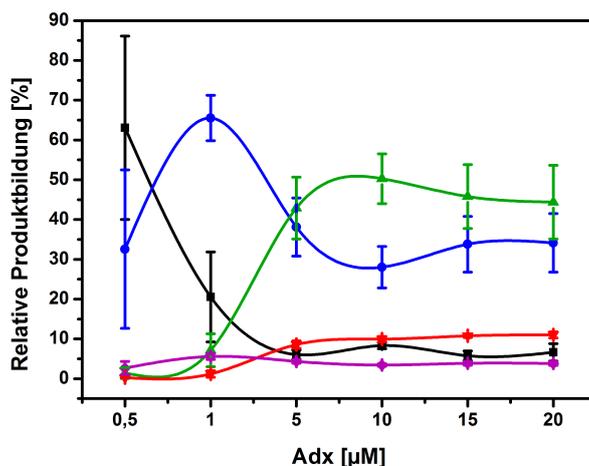


Abb. 3.20.: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen des humanen Adrenodoxins auf den Substratverbrauch bzw. die Produktbildung. Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 μM CYP11B2, 0,5 μM AdR, 400 μM DOC und 0,5-20 μM Adx inkubiert. DOC: schwarz, Corticosteron: blau, 18OH-B: grün, Aldosteron: rot, 18OH-DOC: violett.

3.5.2.2. Reaktionspuffer

Eine weitere Änderung betrifft die Zusammensetzung des Reaktionspuffers. In der vorhergehenden Arbeit wurde Tween 20 im Reaktionspuffer verwendet, welches zur Solubilisierung der beiden Membranproteine, CYP11B2 und AdR, dienen soll. Da Tween 20 jedoch die Synthese von Aldosteron inhibiert und auch zu einer verminderten Bildung von 18-Hydroxycorticosteron führt (Ogishima *et al.*, 1989), wird der größte Teil des Substrates zu Corticosteron umgesetzt (Abb. 3.21). Deshalb wurde in dieser Arbeit Dilauroylphosphatidylcholin (DLPC) verwendet (Nonaka *et al.*, 1998). Dadurch konnte das Produktmuster deutlich in Richtung 18-Hydroxycorticosteron und Aldosteron verschoben werden. Die Bildung von 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron ist mit DLPC etwas geringer.

Der pH-Wert des Reaktionspuffer hat ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Produktbildung, da die verwendeten Proteine ein pH-Optimum besitzen, bei dem ihre Aktivität maximal ist. Der pH-Wert des Reaktionspuffer für die Substratumsätze wurde zwischen 6,6 und 8,2 variiert und es zeigte sich eine maximale Aktivität von CYP11B2 und seinen Redoxpartnern bei Werten zwischen 7,4 und 7,8. Dies spiegelte sich in einer erhöhten Bildung von 18-Hydroxycorticosteron und Aldosteron wider (Abb. 3.22). Ist die Aktivität der Proteine verringert, so wird das Substrat größtenteils zu Corticosteron umgesetzt (pH < 7,4 und pH > 8,0). Der standardmäßig verwendete Reaktionspuffer für die Substratumsätze wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

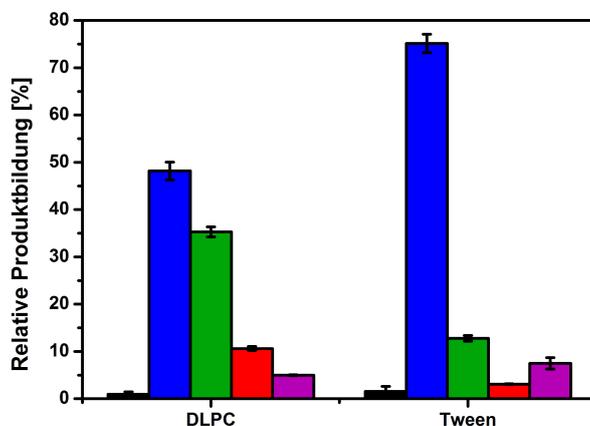


Abb. 3.21.: Vergleich der Produktbildung durch humanes CYP11B2 in Anwesenheit von DLPC bzw. Tween 20 im Reaktionspuffer zur Solubilisierung der Membranproteine CYP11B2 und AdR. Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 μ M CYP11B2, 20 μ M Adx, 0,5 μ M AdR und 400 μ M DOC inkubiert. DOC: schwarz, Corticosteron: blau, 18OH-B: grün, Aldosteron: rot, 18OH-DOC: violett.

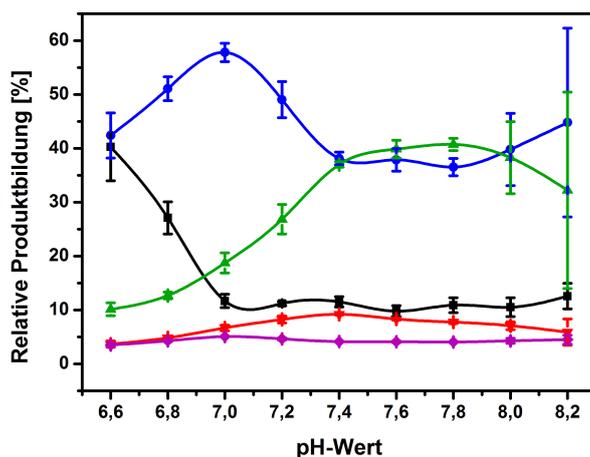


Abb. 3.22.: Einfluss unterschiedlicher pH-Werte des Reaktionspuffers auf den Substratverbrauch bzw. die Produktbildung. Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 μ M CYP11B2, 20 μ M Adx, 0,5 μ M AdR und 400 μ M DOC inkubiert. DOC: schwarz, Corticosteron: blau, 18OH-B: grün, Aldosteron: rot, 18OH-DOC: violett.

3.5.2.3. Zeitlicher Verlauf

Der zeitliche Verlauf eines Umsatzes von 11-Desoxycorticosteron mit CYP11B2 ist in Abb. 3.23 dargestellt. Dabei ist zu sehen, dass das Substrat nach etwa 20 Minuten verbraucht ist. Die Bildung von Corticosteron steigt bis etwa 15 Minuten sehr stark an, danach wird das Corticosteron für die Bildung der nachfolgenden Produkte verbraucht. Der Anstieg von 18-Hydroxycorticosteron ist bis etwa 30 Minuten zu verzeichnen. Die Bildung von Aldosteron und 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron verläuft in sehr flachen Kurven, die ihr Maximum bei 30 bzw. 20 Minuten erreichen. Der Substratumsatz und die Produktbildung im *in vitro*-System ist also nach etwa 40 Minuten abgeschlossen ist.

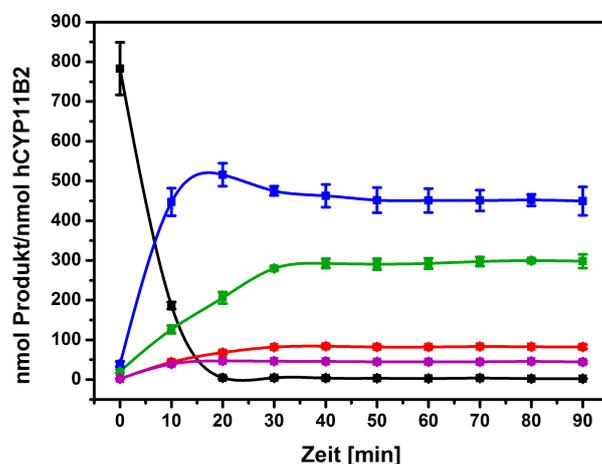


Abb. 3.23.: Zeitlicher Verlauf eines CYP11B2-abhängigen Umsatzes von 11-Desoxycorticosteron und der Produktbildung. Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C mit 0,5 μ M CYP11B2, 20 μ M Adx, 0,5 μ M AdR und 400 μ M DOC inkubiert. DOC: schwarz, Corticosteron: blau, 18OH-B: grün, Aldosteron: rot, 18OH-DOC: violett.

3.5.2.4. Substratkonzentration

Die von CYP11B2 katalysierte Reaktion erfordert zwei Hydroxylierungs- und einen Oxidationsschritt und führt zur Bildung mehrerer Produkte. Wie die bereits beschriebenen Experimente zeigen, nehmen Veränderungen der Reaktionsbedingungen in den *in vitro*-Umsätzen Einfluss auf die verschiedenen Reaktionsschritte und führen so zu einem veränderten Produktmuster, d. h. dass sich die Verhältnisse der einzelnen Produkte zueinander ändern. Die Analyse mittels HPLC erfordert deshalb ausreichende Mengen der gebildeten Produkte, vor allem von Aldosteron und 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron, die den geringsten Anteil der Produkte darstellen. Eine wichtige Rolle spielt daher die eingesetzte Substratkonzentration, die zum einen zu einer ausreichenden Menge der einzelnen Produkte führen soll, zum anderen

jedoch nicht zu einer möglichen Substratinhibierung. Um die optimale Substratkonzentration zu ermitteln, wurde 11-Desoxycorticosteron in unterschiedlichen Konzentrationen von 50 μM bis 1 mM eingesetzt.

Bei diesen Umsätzen zeigte sich, dass das Substrat erst ab einer Konzentration von etwa 600 μM nicht mehr vollständig verbraucht wird (Abb. 3.24 A und B).

Betrachtet man die absolut gebildeten Mengen der Produkte (Abb. 3.24 B), so steigt die Menge an Corticosteron mit der Menge an eingesetztem Substrat stark an. 18-Hydroxycorticosteron und das Endprodukt Aldosteron steigen dagegen nur leicht an bis zu einer Konzentration von 300 μM DOC. Mit höheren Konzentrationen des Substrates fällt die Menge dieser beiden Produkte wieder etwas ab. 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron hingegen wird gleichmäßig ansteigend gebildet und unterliegt keinen großen Schwankungen.

Die Darstellung der relativen Produktbildung (Abb. 3.24 A) macht deutlich, dass zunächst der größte Teil des Substrates zu 18-Hydroxycorticosteron umgesetzt wird. Erst ab einer Konzentration von etwa 300 μM DOC wird überwiegend Corticosteron gebildet, während 18-Hydroxycorticosteron mit steigender Substratkonzentration abnimmt. In einem ähnlichen, wenn auch nicht derart drastischen, Verlauf wird Aldosteron gebildet. Die Bildung von 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron steigt ebenfalls mit steigender Konzentration des Substrates leicht an.

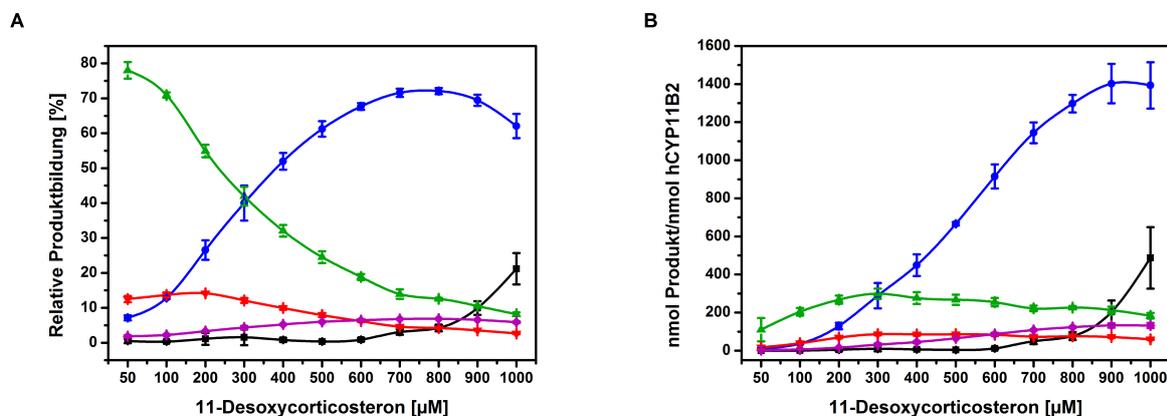


Abb. 3.24.: *In vitro* Umsatz von 11-Desoxycorticosteron durch humanes CYP11B2. Verbrauch von 11-Desoxycorticosteron beim Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen des Substrates sowie die daraus resultierende relative (A) und absolute (B) Produktbildung. Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 μM CYP11B2, 20 μM Adx und 0,5 μM AdR inkubiert. DOC: schwarz, Corticosteron: blau, 18OH-B: grün, Aldosteron: rot, 18OH-DOC: violett.

Für die folgenden Umsätze wurde eine Substratkonzentration von 400 μM 11-Desoxycorticosteron eingesetzt, da hier ausreichende Mengen der Produkte vorhanden sind, vor allem der in geringen Mengen gebildeten Produkte Aldosteron und 18-Hydroxycorticosteron. So können auch Auswirkungen von Faktoren, die eine Verminderung dieser Produkte nach sich ziehen, analysiert werden.

3.5.2.5. Substrat-Lösemittel

Eine wichtige Rolle in Zusammenhang mit der Substratmenge spielt die Konzentration von Ethanol in einem Reaktionsansatz. Ethanol stellt das Lösemittel der Steroide dar, die als Substrat eingesetzt werden, und beeinflusst die Stabilität des Enzyms und dessen Aktivität. Je höher die Ethanolkonzentration, desto weniger 18-Hydroxycorticosteron und Aldosteron werden gebildet. Die verminderte Enzymaktivität wirkt sich in den eingesetzten Ethanolkonzentrationen jedoch nicht auf den ersten, sondern hauptsächlich auf die nachfolgenden Reaktionsschritte aus, wodurch zwar das meiste Substrat verbraucht, aber überwiegend Corticosteron gebildet wird (Abb. 3.25). Für die Substratumsätze wurden die Steroide in einer Stockkonzentration von 10 mM verwendet und in einer Konzentration von 400 μM als Substrat in einem Umsatz eingesetzt. Dadurch ergibt sich für die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Umsätze eine Ethanolkonzentration von 4 %. Eine höhere Stock- und damit eine niedrigere Ethanolkonzentration im Umsatz ist bei manchen Steroiden aufgrund der Löslichkeit nicht möglich.

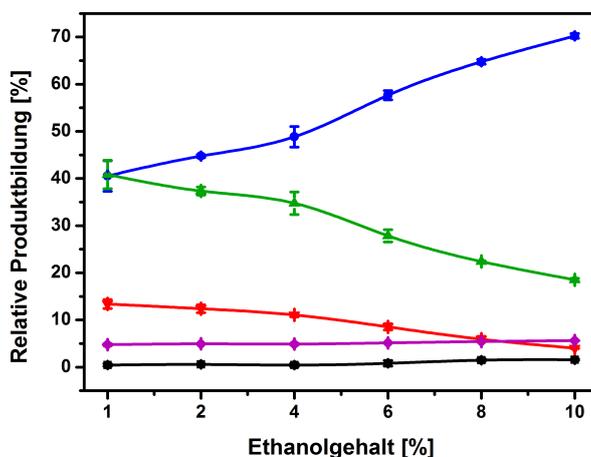


Abb. 3.25.: Einfluss unterschiedlicher Ethanol-Konzentrationen auf den Substratverbrauch bzw. die Produktbildung. Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 μM CYP11B2, 20 μM Adx, 0,5 μM AdR und 400 μM DOC inkubiert. DOC: schwarz, Corticosteron: blau, 18OH-B: grün, Aldosteron: rot, 18OH-DOC: violett.

Eine weitere Möglichkeit, die Löslichkeit hydrophober Substanzen zu erhöhen, besteht in der Verwendung von Cyclodextrinen (CD). Diese Verbindungen bestehen aus zyklisch angeordneten Glucosemolekülen, die α -1,4-glykosidisch verknüpft sind. Dadurch entsteht eine Molekülstruktur mit einer polaren Oberfläche und einer hydrophoben Kavität, in der verschiedene Substanzen komplexiert werden können. Durch diese Eigenschaft finden Cyclodextrine eine breite Anwendung in der Industrie (Singh *et al.*, 2002). Cyclodextrine werden z. B. auch bei Enzym-abhängigen Prozessen in der organischen Synthese eingesetzt (Harper *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurde Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP- β -CD) als Lösemittel von 11-

Desoxycorticosteron und Corticosteron verwendet und die Produktbildung durch CYP11B2 analysiert. Überraschenderweise führt der Einsatz des Cyclodextrins jedoch zu keinem positiven Effekt hinsichtlich der Produktbildung, sondern im Gegenteil sowohl im Fall von 11-Desoxycorticosteron (Abb. 3.26 A) als auch von Corticosteron (Abb. 3.26 B) zu einer schlechteren Umsetzung des Substrates mit geringeren Mengen der Produkte 18-Hydroxycorticosteron und Aldosteron. Folglich stellt Ethanol in den *in vitro*-Umsätzen mit der Aldosteronsynthese das Lösemittel der Wahl für die Substrate dar.

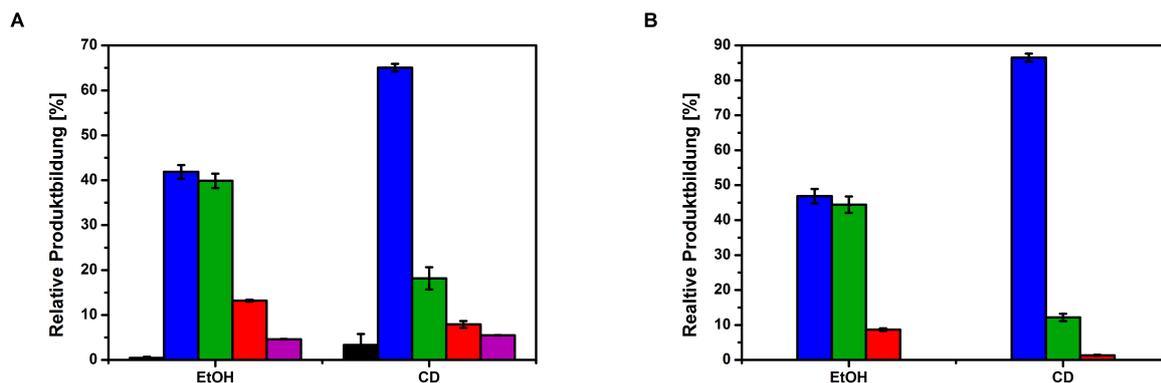


Abb. 3.26.: Einfluss von Ethanol bzw. Cyclodextrin. CYP11B2-abhängiger Umsatz von **A.** 11-Desoxycorticosteron und **B.** Corticosteron. Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 μ M CYP11B2, 20 μ M Adx, 0,5 μ M AdR und 400 μ M DOC bzw. B inkubiert. DOC: schwarz, Corticosteron: blau, 18OH-B: grün, Aldosteron: rot, 18OH-DOC: violett.

3.5.2.6. Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die humane Aldosteronsynthese erfolgte durch die Analyse der enzymatischen Aktivität im Fließgleichgewicht mit dem Substrat 11-Desoxycorticosteron. Dazu wurden *in vitro*-Rekonstitutionsassays mit steigender Substratkonzentration durchgeführt bis eine Substratsättigung erreicht wurde, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit nicht von der Substratkonzentration abhängt.

Gegenüber den in dieser Arbeit anderweitig durchgeführten Substratumsätzen, mussten für die kinetische Analyse einige Änderungen vorgenommen werden. Damit das Substrat nicht der limitierende Faktor ist, d. h. dass selbst bei der niedrigsten Konzentration noch Substrat übrig ist, musste die Reaktionszeit drastisch verkürzt werden (auf 1 min). Dadurch wurde eine vorausgehende Erwärmung des Reaktionsansatzes erforderlich, um die optimale Temperatur bereits beim Reaktionsstart zu gewährleisten. Um in den niedrigen Konzentrationen messbare Mengen aller Steroide zu erhalten, wurde das Volumen der Reaktion auf 1 ml erhöht. Da nicht alle Produkte bekannt und damit quantifizierbar sind, erfolgte die Berechnung der Produktbildung über den Substratverbrauch. Die Werte für K_M und V_{max} wurden durch hyperbolische Regression erhalten (siehe Abb. 3.27).

Für das Substrat 11-Desoxycorticosteron, das in Konzentrationen von 0 bis 300 μM eingesetzt wurde, konnte somit eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} von $237,95 \pm 8,25$ nmol Produkte/nmol hCYP11B2/min bestimmt werden. Die zugehörige Michaelis-Konstante K_M beträgt dabei $103,4 \pm 8,25$ μM .

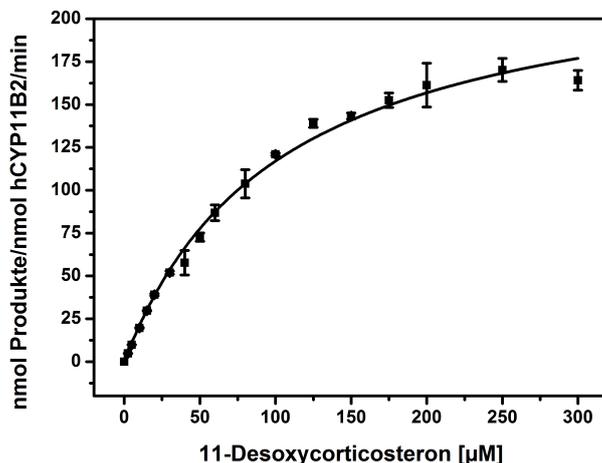


Abb. 3.27.: Kinetik des humanen CYP11B2. Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die humane Aldosteronsynthese ($0,5$ μM) erfolgte in Abhängigkeit steigender Substrat-Konzentrationen (0 - 300 μM) mit humanem Adx (20 μM) und humaner AdR ($0,5$ μM) als Elektronentransportsystem und einem NADPH-regenerierendem System. Die Reaktionen erfolgten für 1 Minute bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 800 UpM.

3.5.2.7. Umsatz verschiedener Substrate

Bei 11-Desoxycorticosteron handelt es sich um das natürliche Substrat der Aldosteronsynthese, welche daraus die Hauptprodukte Corticosteron, 18-Hydroxycorticosteron und das Endprodukt Aldosteron bildet. Darüberhinaus konnten einige Nebenprodukte identifiziert werden: 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron, das am stärksten gebildete Nebenprodukt, sowie 19-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron, welches allerdings weniger als 1 % der Gesamtmenge ausmacht (Abb. 3.28 A). Der Einsatz von Corticosteron als Substrat resultiert ebenfalls in der Bildung der beiden weiteren Produkte 18-Hydroxycorticosteron und Aldosteron (Abb. 3.28 B). Der Umsatz von 18-Hydroxycorticosteron in Aldosteron durch CYP11B2 konnte nicht beobachtet werden (Abb. 3.28 C). Abbildung 3.28 D zeigt, dass die Bildung der genannten Produkte nur in Anwesenheit des Enzyms stattfindet.

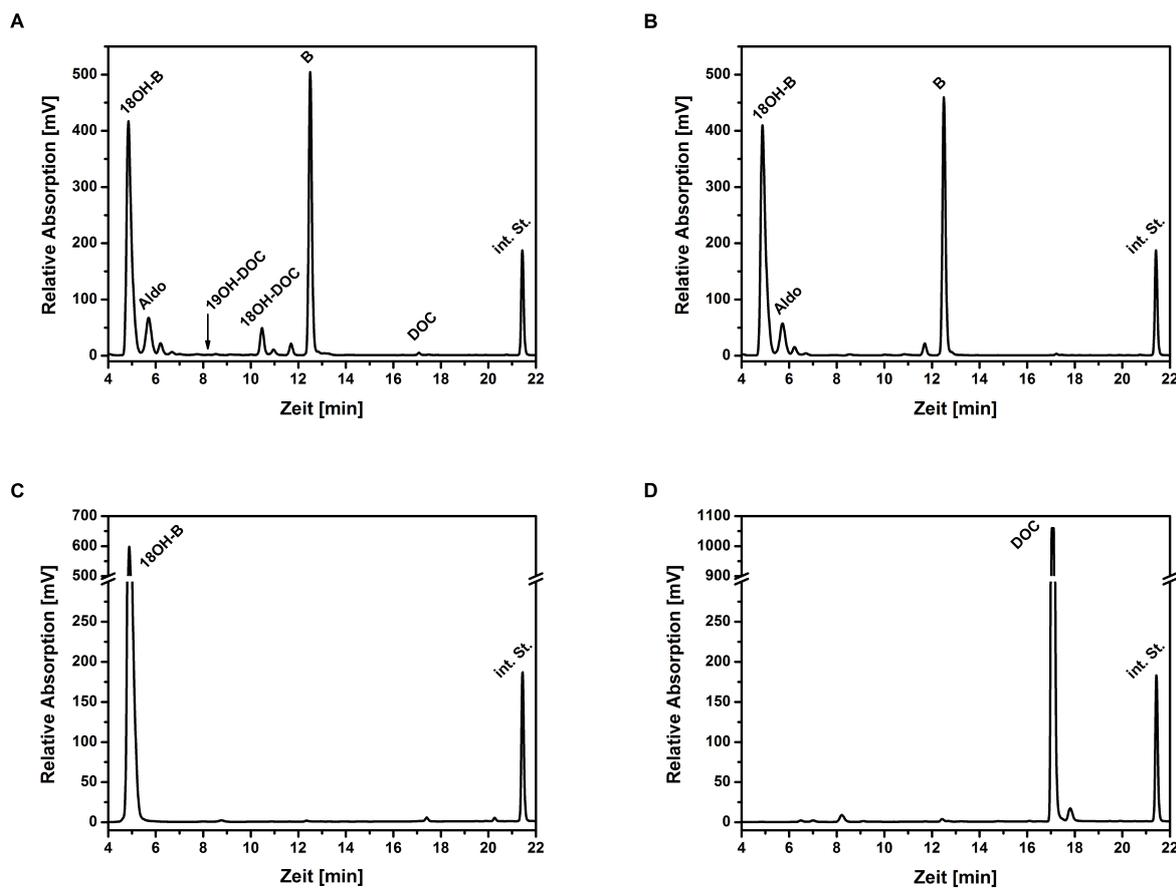


Abb. 3.28.: HPLC-Chromatogramme der hCYP11B2-abhängigen Reaktion ausgehend von verschiedenen Substraten: A. DOC, **B.** Corticosteron, **C.** 18OH-Corticosteron, **D.** Kontrolle: Reaktionsansatz mit DOC in Abwesenheit von hCYP11B2. Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 μ M CYP11B2, 20 μ M Adx, 0,5 μ M AdR und 400 μ M des jeweiligen Substrates inkubiert.

Betrachtet man den Umsatz von 11-Desoxycorticosteron und Corticosteron etwas genauer, so wird deutlich, dass ausgehend von Corticosteron zwar mehr 18-Hydroxycorticosteron gebildet wird, jedoch ist die Menge an gebildetem Aldosteron hier geringer als ausgehend von 11-Desoxycorticosteron (Abb. 3.29).

Die Aldosteronbildung verläuft möglicherweise auch über einen weiteren Reaktionsweg, bei dem zuerst eine 18-Hydroxylierung von 11-Desoxycorticosteron stattfindet mit der Bildung von 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron. Erst danach findet an diesem Intermediat die 11 β -Hydroxylierung und die 18-Oxidation statt. Um diese Möglichkeit der Aldosteronbildung zu überprüfen, wurde 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron als Substrat in einem Umsatz mit CYP11B2 eingesetzt (Abb. 3.30 B). Hier zeigte sich, dass zwar 18-Hydroxycorticosteron durch eine Hydroxylierung in Position 11 β entsteht, allerdings wird keine 18-Oxidation katalysiert, die zur Bildung von Aldosteron führt. Im Vergleich zu einem Umsatz mit 11-Desoxycorticosteron wird zudem wesentlich weniger Substrat umgesetzt (Abb. 3.30 A).

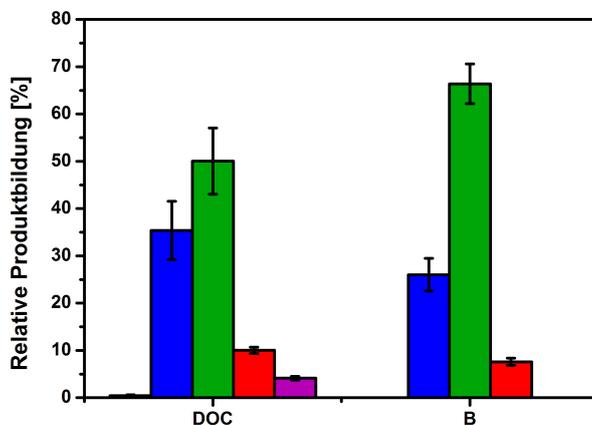


Abb. 3.29.: Vergleich der Produktbildung durch humanes CYP11B2 ausgehend von 11-Desoxycorticosteron bzw. Corticosteron. Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 μ M CYP11B2, 20 μ M Adx, 0,5 μ M AdR und 400 μ M DOC inkubiert. DOC: schwarz, Corticosteron: blau, 18OH-B: grün, Aldosteron: rot, 18OH-DOC: violett.

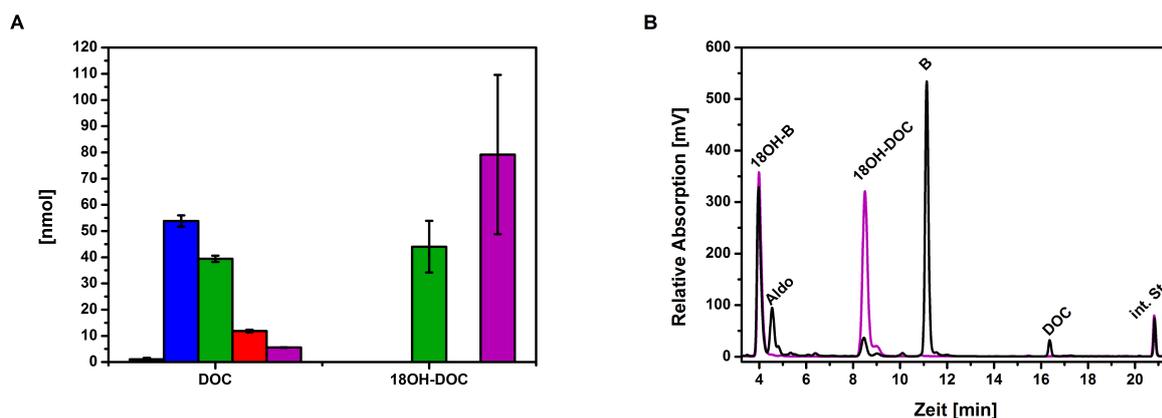


Abb. 3.30.: Vergleich der Produktbildung durch humanes CYP11B2 ausgehend von 11-Desoxycorticosteron bzw. 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron. **A.** Produktbildung ausgehend von 11-Desoxycorticosteron bzw. 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron. DOC: schwarz, Corticosteron: blau, 18OH-B: grün, Aldosteron: rot, 18OH-DOC: violett. **B.** HPLC-Chromatogramme der hCYP11B2-abhängigen Reaktion ausgehend 11-Desoxycorticosteron (schwarz) und 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron (violett). Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 μ M CYP11B2, 20 μ M Adx, 0,5 μ M AdR und 400 μ M des jeweiligen Substrates inkubiert.

3.5.2.8. Einfluss der Reaktions-Intermediate

Die Aldosteronsynthese erfolgt durch den Ablauf einer 3-Schritt-Reaktion und der Bildung von mehreren Intermediaten sowie des Endproduktes. Da diese Intermediate bzw. das Endprodukt möglicherweise eine regulatorische Wirkung auf die Reaktion haben, wurde deren Auswirkung auf die unterschiedlichen Reaktionsschritte untersucht. Dazu wurden Corticosteron, 18-Hydroxycorticosteron, Aldosteron und 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron in unterschiedlichen Konzentrationen einem Umsatz von 11-Desoxycorticosteron mit CYP11B2 zugesetzt. Die Konzentration des Substrates bei diesen Umsätzen betrug 200 μM . 18-Hydroxycorticosteron konnte aus Gründen der Verfügbarkeit nur bis zu einer Konzentration von 200 μM eingesetzt werden.

Die Analyse der Umsätze erfolgte durch die Bestimmung der absoluten Menge (nmol) der einzelnen Produkte. Durch die geringere Konzentration wird das Substrat in allen Fällen komplett verbraucht. Dies zeigt auch, dass die zugesetzten Steroide in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die 11- β -Hydroxylierung des 11-Desoxyxorticosteron haben.

Durch die Zugabe steigender Mengen Corticosteron, nimmt die Produktion sowohl von 18-Hydroxy-corticosteron als auch von Aldosteron leicht zu (Abb. 3.31 A). Dieser Effekt beruht auf der Tatsache, dass das Enzym nach dem Verbrauch von 11-Desoxycorticosteron bis zu einem gewissen Grad die 18-Hydroxylierung und 18-Oxidation am zugesetzten Corticosteron katalysiert. Steigende 18-Hydroxycorticosteron-Konzentrationen wirken sich nicht auf die Bildung von Aldosteron aus, aber sie führen zu etwas höheren Mengen an Corticosteron (Abb. 3.31 B). Die Zugabe des Endproduktes Aldosteron führt weder bei Corticosteron noch bei 18-Hydroxycorticosteron zu großen Veränderungen (Abb. 3.31 C). Einen überraschenden Einfluss auf die Reaktion, zeigt hingegen das Intermediat 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron, das sowohl zu höheren Mengen von Corticosteron als auch von 18-Hydroxycorticosteron führt (Abb. 3.31 D). Die Zunahme des 18-Hydroxycorticosterons ist auf die 11 β -Hydroxylierung des zugesetzten Intermediates zurückzuführen, welches nach Verbrauch von 11-Desoxycorticosteron als Substrat verwendet wird. Die erhöhten Corticosteron-Mengen werden möglicherweise durch eine Rückkopplung von 18-Hydroxycorticosteron auf den weiteren Verbrauch von Corticosteron, wie bereits oben beschrieben, verursacht. Die Aldosteronbildung nimmt bei 18OH-DOC-Zugabe etwas ab. Die Bildung von 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron bleibt durch die Zugabe der Intermediate und von Aldosteron unbeeinflusst.

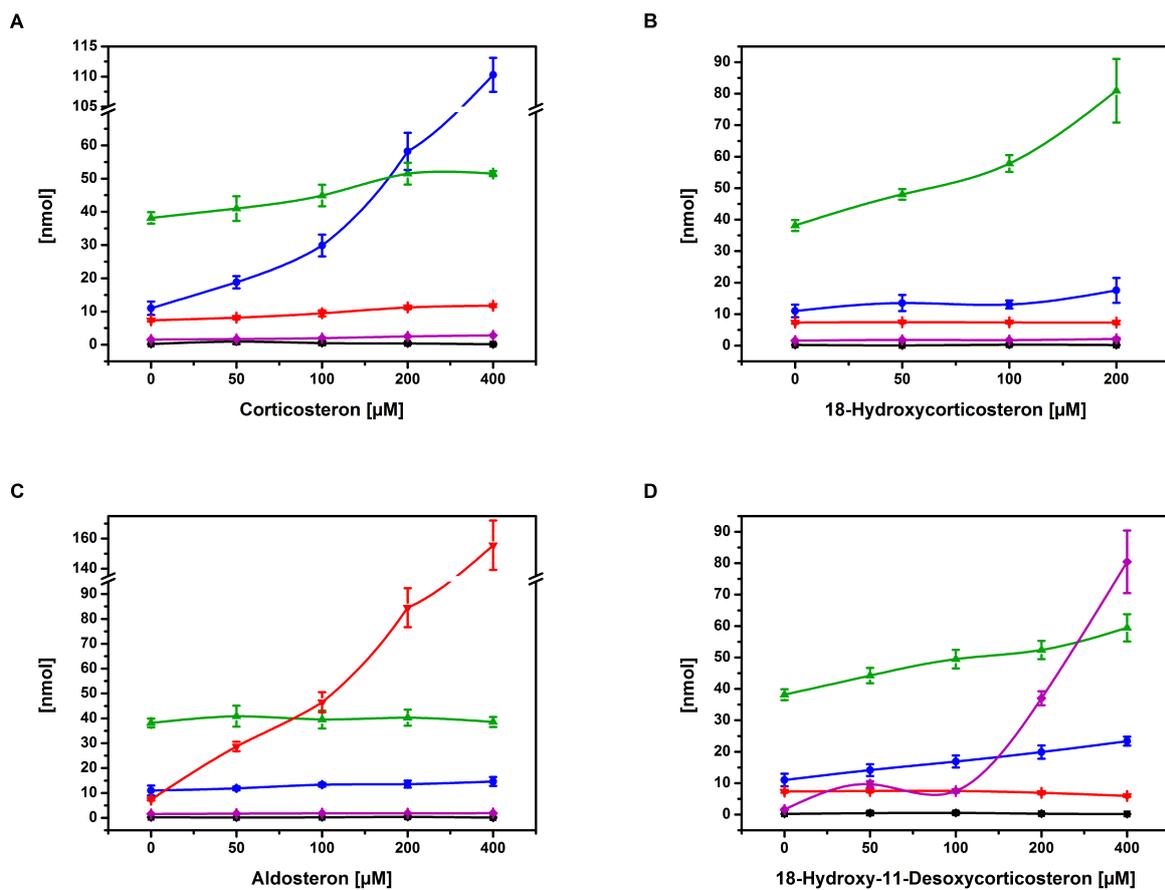


Abb. 3.31.: Einfluss von Intermediaten auf den Umsatz von 11-Desoxycorticosteron. Einfluss von A. Corticosteron, B. 18-Hydroxycorticosteron, C. Aldosteron und D. 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron auf den Umsatz von 11-Desoxycorticosteron durch CYP11B2 und die Bildung der einzelnen Produkte. Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 μM CYP11B2, 20 μM Adx, 0,5 μM AdR und 200 μM DOC, sowie 50 bis 400 μM Intermediat bzw. Endprodukt inkubiert. DOC: schwarz, Corticosteron: blau, 18OH-B: grün, Aldosteron: rot, 18OH-DOC: violett.

3.5.2.9. Einfluss verschiedener Inhibitoren

Eine mögliche Anwendung bietet das *in vitro*-System mit der humanen Aldosteronsynthese für die Analyse potentieller Inhibitoren. Es erlaubt die inhibitorische Wirkung verschiedener Substanzen auf die einzelnen Reaktionsschritte zu untersuchen. Um die Anwendbarkeit des Systems für diese Aufgabe zu zeigen, wurden bekannte Cytochrom P450-Inhibitoren in steigenden Konzentrationen einem Umsatz von 11-Desoxycorticosteron zugesetzt und die Produktbildung bestimmt.

Bei den Inhibitoren Miconazol und Ketoconazol handelt es sich um Azol-Derivate, die durch die Inhibition von Cytochromen P450 in Pilzen als antimykotische Wirkstoffe Anwendung finden (Yoshida, 1988). Darüber hinaus ist ihre inhibitorische Wirkung auch für humane Cytochrome P450 beschrieben (Schuster, 1985), die insbesondere für CYP11B1 und CYP11B2 in Zellkulturen gezeigt wurde (Denner und Bernhardt, 1998). Im *in vitro*-Umsatz inhi-

biert Miconazol in niedrigen Konzentration bis 1 μM zunächst die 18-Hydroxylase- und 18-Oxidase-Aktivität der Aldosteronsynthese (Abb. 3.32). Als Resultat ist die Menge an Corticosteron erhöht, da es nicht weiter umgesetzt wird. Die 11 β -Hydroxylase-Aktivität des Enzyms wird ab einer Miconazol-Konzentration von 1 μM inhibiert, so dass immer weniger 11-Desoxycorticosteron verbraucht wird und die Bildung von Corticosteron sinkt. Interessanterweise ist eine Abnahme des 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosterons erst ab einer Inhibitor-Konzentration von mehr als 1 μM zu beobachten. Das bedeutet, dass die Inhibition der 18-Hydroxylierung von 11-Desoxycorticosteron erst ab einer höheren Miconazol-Konzentration erfolgt als die der 18-Hydroxylierung von Corticosteron. Eine komplette Enzymhemmung liegt ab etwa 100 μM Miconazol vor.

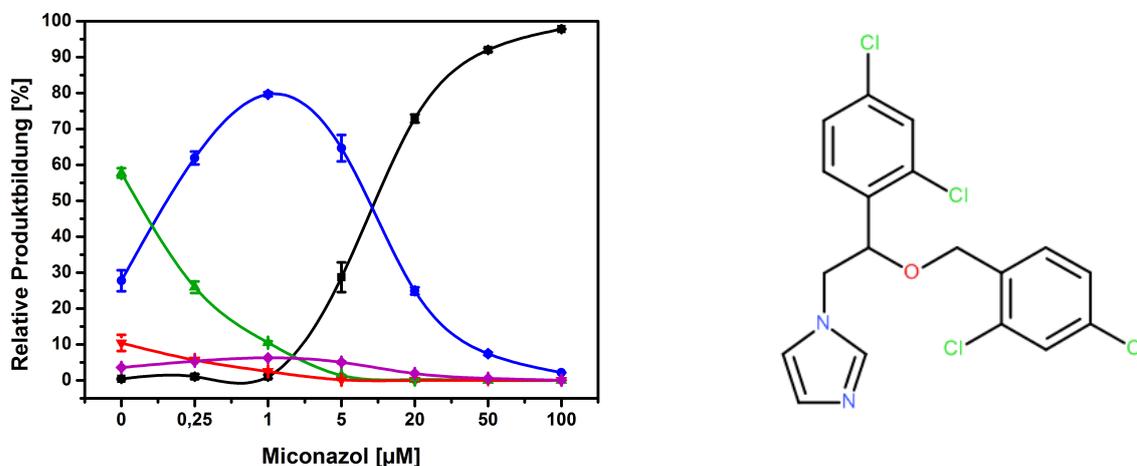


Abb. 3.32.: Einfluss des Inhibitors Miconazol auf den Substratverbrauch von 11-Desoxycorticosteron bzw. die Produktbildung durch CYP11B2. Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 μM CYP11B2, 20 μM Adx, 0,5 μM AdR, 200 μM DOC und Konzentrationen des Inhibitors durchgeführt. DOC: schwarz, Corticosteron: blau, 18OH-B: grün, Aldosteron: rot, 18OH-DOC: violett. Auf der rechten Seite ist die Struktur des Miconazols zu sehen.

Die Inhibition der Aldosteronsynthese durch Ketoconazol erfolgt ebenso wie bei Miconazol durch eine schrittweise Hemmung der verschiedenen Reaktionsschritte (Abb. 3.33). Dabei beträgt die erforderliche Konzentration an Ketoconazol für eine vollständige Hemmung der 18-Oxidase-Aktivität etwa 20 μM (Miconazol \sim 5 μM) und die der 18-Hydroxylase-Aktivität etwa 50 μM (Miconazol \sim 10 μM). Die Inhibition der 11 β -Hydroxylase-Aktivität beginnt unter Ketoconazol ab etwa 5 μM . Wie bereits oben beschrieben, wird die 18-Hydroxylase-Aktivität gegenüber 11-Desoxycorticosteron erst in höheren Ketoconazol-Konzentration inhibiert, im Gegensatz zur 18-Hydroxylase-Aktivität gegenüber Corticosteron, was durch die Abnahme von 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron ab etwa 10 μM gekennzeichnet ist. Die Enzymaktivität konnte durch die hier eingesetzte Menge an Ketoconazol nicht vollständig inhibiert werden.

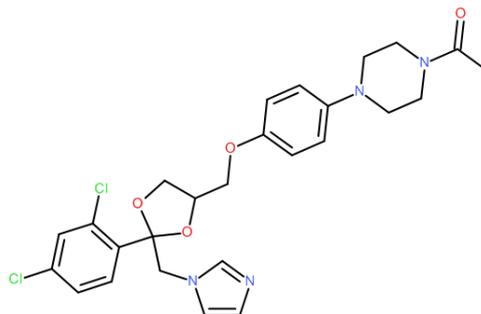
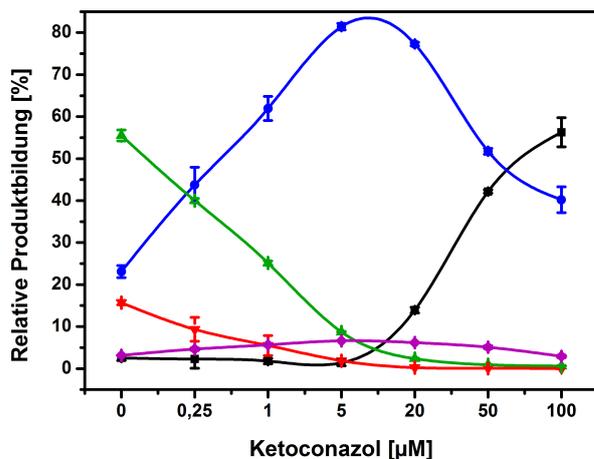


Abb. 3.33.: Einfluss der Inhibitors Ketoconazol auf den Substratverbrauch von 11-Desoxycorticosteron bzw. die Produktbildung durch CYP11B2. Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 µM CYP11B2, 20 µM Adx, 0,5 µM AdR, 200 µM DOC und Konzentrationen des Inhibitors durchgeführt. DOC: schwarz, Corticosteron: blau, 18OH-B: grün, Aldosteron: rot, 18OH-DOC: violett. Auf der rechten Seite ist die Struktur des Ketoconazols zu sehen.

Neben den beiden oben genannten Inhibitoren wurde eine weitere Substanz einem Substratumsatz hinzugefügt und ihre Auswirkung auf die Produktbildung analysiert. Es handelt sich dabei um Spironolacton, einen kompetitiven Antagonisten der Mineralocorticoide, der durch die Bindung an den Mineralocorticoid-Rezeptor die Wirkung des Aldosterons unterbindet. Wie bereits in Abschnitt 3.5.1 gezeigt, induziert Spironolacton einen Typ I-*Shift* und stellt somit möglicherweise ein Substrat der Aldosteronsynthese dar. Diese Annahme konnte durch die folgenden Ergebnisse bestätigt werden. Der Umsatz von 11-Desoxycorticosteron durch CYP11B2 in Anwesenheit von Spironolacton wies bei der Analyse der HPLC-Chromatogramme, neben dem Peak von Spironolacton, zwei zusätzliche Peaks auf (Abb. 3.34 A, rotes Chromatogramm). Die Durchführung eines CYP11B2-abhängigen Umsatzes mit Spironolacton als Substrat identifizierte diese Peaks als Produkte des Spironolactons, die nur in der Anwesenheit des Enzyms gebildet werden (Abb. 3.34 B, blaues Chromatogramm). Dadurch ist nicht nur eine kompetitive Wirkung des Spironolactons am Mineralocorticoid-Rezeptor möglich, sondern auch am Aldosteron-bildenden Enzym. Diese Wirkung wird durch die Analyse des 11-Desoxycorticosteron-Umsatzes, dem Spironolacton zugegeben wurde, bestätigt. Die Hemmung der 18-Oxidase-Aktivität beginnt bereits ab einer Konzentration von unter 1 µM Spironolacton und ist durch eine geringer werdende Bildung von Aldosteron gekennzeichnet (Abb. 3.35). Ab einer Konzentration von etwa 20 µM Spironolacton kommt es dann zu einer Abnahme des 18-Hydroxycorticosterons durch die Inhibition der 18-Hydroxylase-Funktion des Enzyms und folglich zu einem Anstieg von Corticosteron. Gleichzeitig ist ein leichter Anstieg des 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosterons zu beobachten. Mit den hier eingesetzten Mengen an Spironolacton konnte jedoch keine vollständige Enzyminhibition erreicht werden.

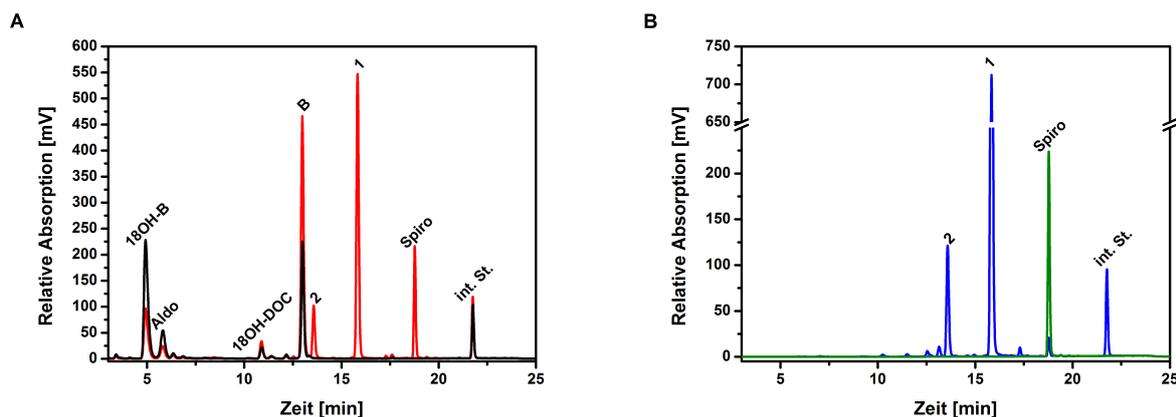


Abb. 3.34.: Einfluss von Spironolacton auf den Substratverbrauch von 11-Desoxycorticosteron bzw. die Produktbildung durch CYP11B2. A. HPLC-Chromatogramm nach CYP11B2-abhängigem *in vitro* Umsatz von 200 μM DOC (schwarz) bzw. DOC in Anwesenheit von 200 μM Spironolacton (rot). B. HPLC-Chromatogramm nach CYP11B2-abhängigem *in vitro* Umsatz von 200 μM Spironolacton (blau). HPLC-Chromatogramm des Standards von Spironolacton (grün). Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 μM CYP11B2, 20 μM Adx, 0,5 μM AdR, 200 μM DOC und Konzentrationen des Inhibitors durchgeführt.

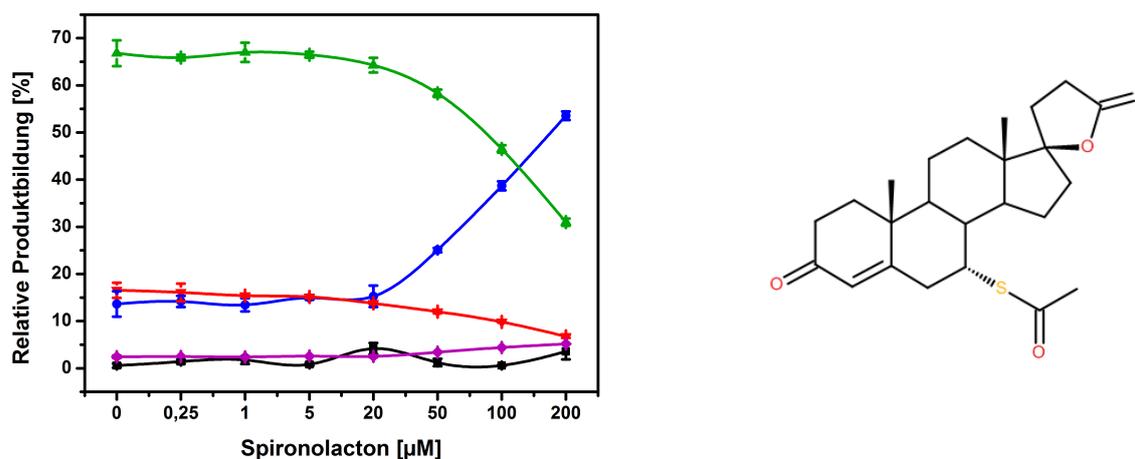


Abb. 3.35.: Einfluss von Spironolacton auf den Substratverbrauch bzw. die Produktbildung durch CYP11B2. DOC: schwarz, Corticosteron: blau, 18OH-B: grün, Aldosteron: rot, 18OH-DOC: violett. Die Umsätze wurden mit 200 μM DOC für 40 Minuten durchgeführt. Auf der rechten Seite ist die Struktur des Spironolactons zu sehen.

3.6. Bioinformatische Analysen

3.6.1. Homologie-Modellierung

Um die Struktur-Funktionsbeziehung des Enzyms zu untersuchen, wurden in der Vergangenheit mehrere Homologie-Modelle konstruiert. Diese Modelle beruhen auf einem bakteriellen (Belkina *et al.*, 2001), einem mikrosomalen (Ulmschneider *et al.*, 2005b) bzw. auf einem Hybrid-Template beider Klassen (Roumen *et al.*, 2007) und ergeben somit nur ein ungenaues Homologiemodell für CYP11B2. Da während der Arbeit an der vorliegenden Dissertation Strukturen von humanen, mitochondrialen bzw. an der Steroidbiosynthese beteiligten Cytochrome P450 aufgeklärt wurden, sollte ein neues Homologiemodell konstruiert werden. Dazu wurden zunächst die in der Protein-Datenbank (PDB) hinterlegten Strukturdaten von Cytochromen P450 durchsucht, um ein bestmögliches Template zu finden. Die Auswahl wurde dabei auf die Cytochrome P450 beschränkt, die in den Mitochondrien lokalisiert sind oder Steroide als Substrat aufweisen. Die Sequenzidentität dieser Proteine mit der Aldosteronsynthase wurde bestimmt, um ihre Eignung als Template für die Homologiemodellierung zu bewerten. Der Sequenzvergleich ist wichtig, um eine gute Vorhersage der Proteinstruktur und damit ein verlässliches Ergebnis des Homologiemodells zu erhalten. Bei einer Sequenzähnlichkeit unter 30 % spricht man von der sogenannten *Twilight zone* (Rost, 1999), in der die Sequenzen oft nicht korrekt aligniert werden und somit die Modellierung der Struktur zu falschen Vorhersagen führen kann.

Die für die Modellierung von CYP11B2 als Template in Frage kommenden Cytochrom P450-Strukturen sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Bei diesen handelt es sich jeweils um die humane Form der Proteine, die für die Kristallisation heterolog in *E. coli* exprimiert wurden.

Tab. 3.4.: Übersicht der Kristallstrukturen von Cytochromen P450, die als Templates für die Homologiemodellierung von CYP11B2 geeignet sind. Bei allen Proteinen handelt es sich um die menschliche Form, die heterolog in *E. coli* exprimiert wurde.

PDB ID	CYP450	Ligand	Identität mit CYP11B2	Referenz
3EQM	19A1	Androstendion	12 %	Ghosh <i>et al.</i> , 2009
2Q9F	46A1	Cholesterol-3-Sulfat	17 %	Mast <i>et al.</i> , 2008
3DAX	7A1	-	11 %	nicht publiziert
3NA0	11A1	20,22-Dihydroxy-Cholesterol	38 %	Strushkevich <i>et al.</i> , 2011

CYP7A1 ist ein mikrosomales Cytochrom P450, das ausschließlich in der Leber exprimiert wird. Es katalysiert die 7α -Hydroxylierung von Cholesterol und ist das Schlüsselenzym der Gallensäure-Synthese (Russell, 2003). CYP46A1 ist hauptsächlich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums von Neuronen lokalisiert und ist dort verantwortlich für die Hydroxylierung von Cholesterol zu $24S$ -Cholesterol (Russell *et al.*, 2009). Während diese beiden Enzyme in die Umwandlung von Cholesterol involviert sind, beteiligen sich CYP19A1 und CYP11A1 an der Synthese der Steroidhormone. Dabei katalysiert CYP19A1, auch Aromatase genannt, die Umwandlung der Androgene Androstendion und Testosteron zu Estron bzw. Estradiol. Das mikrosomale Cytochrom P450 wird dabei hauptsächlich in den Gonaden, in der Plazenta und im Fettgewebe exprimiert (Simpson *et al.*, 2002). Die zuletzt aufgeklärte Struktur ist die von CYP11A1. Dieses stammt aus der gleichen Familie wie die Aldosteronsynthase und ist, ebenso wie diese, an der Steroidhormonbildung in der inneren Mitochondrienmembran beteiligt. Somit stellt CYP11A1 mit einer Sequenzidentität von 38 % das bestmögliche Template für die Homologiemodellierung von CYP11B2 dar.

Das Alignment von CYP11B2 und CYP11A1 diente als Grundlage für die Homologiemodellierung mit SwissModel. Die Qualität des resultierenden Modells wurde mit Hilfe des Programms Ramachandran Plot 2.0 evaluiert. Dabei zeigte sich, dass das Modell mit 85 % der Residuen im erlaubten Bereich liegt und damit sogar einen etwas besseren Wert als die Template-Struktur aufweist, womit eine akzeptable Qualität des Modells angenommen wird (Abb. 3.36 und Tab. 3.5).

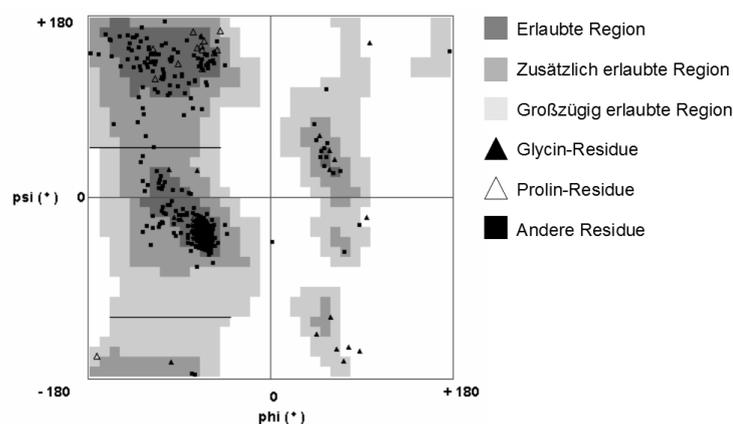


Abb. 3.36.: Ramachandran-Plot des Homologiemodells von CYP11B2 basierend auf CYP11A1.

Tab. 3.5.: Ergebnisse der statistischen Analyse des CYP11B2-Modells und des Templates CYP11A1 durch Ramachandran Plot 2.0.

	CYP11B2		CYP11A1	
	Residuen	%	Residuen	%
Erlaubte Region	392	84,67	388	82,91
Zusätzlich erlaubte Region	56	12,1	67	14,32
Großzügig erlaubte Region	10	2,16	7	1,5
Außerhalb der Region	5	1,08	6	1,28
α -Helix Region	289	73,72	291	75
β -Faltblatt Region	97	24,74	96	24,74
3-10 Helix Region	6	1,53	1	0,26

Das Homologiemodell des CYP11B2 weist eine relativ kompakte Struktur mit der für Cytochrome P450 charakteristischen Faltung auf. Ein Bündel bestehend aus den vier Helices D, E, I und L, sowie die Helices J und K bilden den strukturellen Kern des Proteins (Abb. 3.37 A). Im aktiven Zentrum des Proteins bilden die Carboxylat-Gruppen des Häms Wasserstoffbrücken mit den Seitenketten von R110, W137, R141, R384 und R448. Das in allen Cytochromen P450 hochkonservierte Cystein - in der Aldosteronsynthese an Position 450 - bindet das Eisen des Häms an der 5. Koordinationsstelle (Abb. 3.37 B).

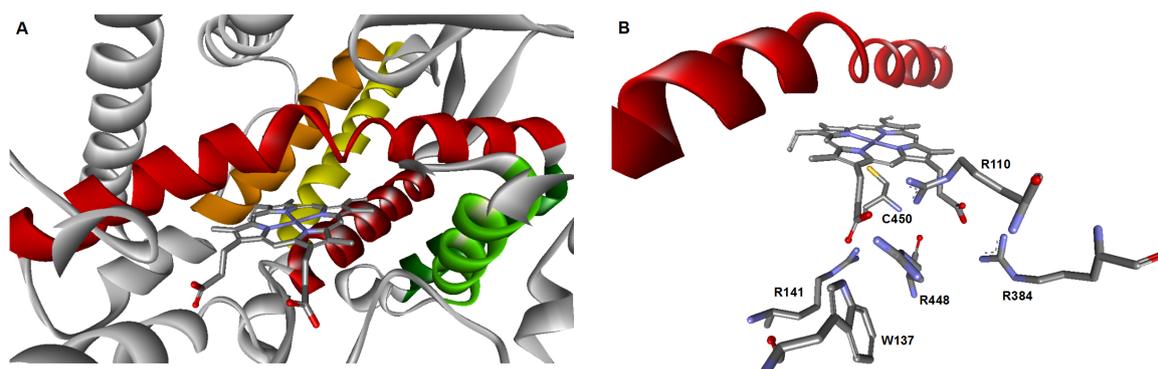


Abb. 3.37.: Blick in das aktive Zentrum des Homologiemodells der Aldosteronsynthese. **A.** Die Helices D (gelb), E (orange), I (rot) und L (dunkelrot), sowie J (dunkelgrün) und K (hellgrün) bilden den Kern des Proteins. **B.** Das Häm wird im aktiven Zentrum über die Residuen R110, W137, R141, R384 und R448, sowie durch C450 gebunden.

3.6.2. Molekulares Docking

Um die Bindung des Substrates, der Intermediate und des Endproduktes zu untersuchen und somit mögliche Rückschlüsse auf den Ablauf der Reaktion zu gewinnen, wurde molekulares Docking der verschiedenen Liganden durchgeführt. Die Dockingläufe zeigten bei den flexibel gehaltenen Residuen in der Nähe des Porphyrins, dass sich die Seitenketten von T318 und W116 nur wenig bewegen, während der Phenylring von F130 fast immer verdreht wird. Aus der Analyse der Dockingergebnisse geht hervor, dass die Residuen V378, G379, L380, F381 und L382 eine hydrophobe Kavität ausbilden, in der die Liganden stabilisiert werden. Zusätzlich werden die Liganden durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Residuen W116, F130, F231, F487 über dem Häm positioniert.

Das Substrat 11-Desoxycortico-steron liegt für die Bildung von Corticosteron mit der Keto-Gruppe am C3 in Richtung der Helix I, während die Hydroxygruppe am C21 mit F381 interagiert (Abb. 3.38). Durch diese Bindungen wird das C11 so über dem Häm positioniert (Abstand C11 zum FeO: 3,97 Å), dass dort die erste Hydroxylierung der Reaktion ablaufen kann, durch die Corticosteron entsteht.

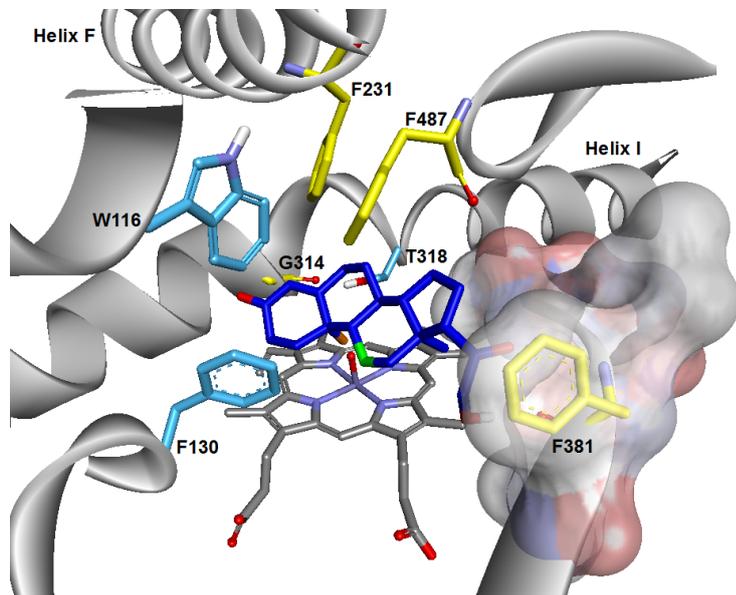


Abb. 3.38.: Mögliche Bindung des Substrates 11-Desoxycortico-steron (blau) im aktiven Zentrum von CYP11B2 zur Bildung von Corticosteron. Die hydrophobe Kavität ist im Bild rechts dargestellt, in der 11-Desoxycortico-steron zusätzlich über eine Wasserstoffbrückenbindung der C21-Hydroxygruppe mit F381 gebunden wird. Die C3-Ketogruppe zeigt Richtung Helix I. Zusätzlich wird DOC durch hydrophobe Wechselwirkungen mit W116, F130, F231 und F487 über dem Häm stabilisiert, so dass am C11 (grün) oder am C19 (orange) die Hydroxylierung stattfinden kann. Die Residuen W116, F130 und T318 (hellblau) wurden während des Dockings flexibel gehalten.

Für den nächsten Reaktionsschritt, die Hydroxylierung von Corticosteron an C18, wird das Intermediat im aktiven Zentrum so positioniert, dass nun die C21-Hydroxygruppe in Richtung der Helix I zeigt, wodurch eine Wasserstoffbrückenbindung der Hydroxygruppe mit E310 eingegangen wird (Abb. 3.39). Corticosteron wird zusätzlich durch die Lage der C3-Ketogruppe in der hydrophoben Kavität und einer möglichen Wasserstoffbrückenbindung zu L380 stabilisiert. Somit wird C18 mit einem Abstand von 2,52 Å zum FeO über dem Häm positioniert und 18-Hydroxycortico-steron gebildet.

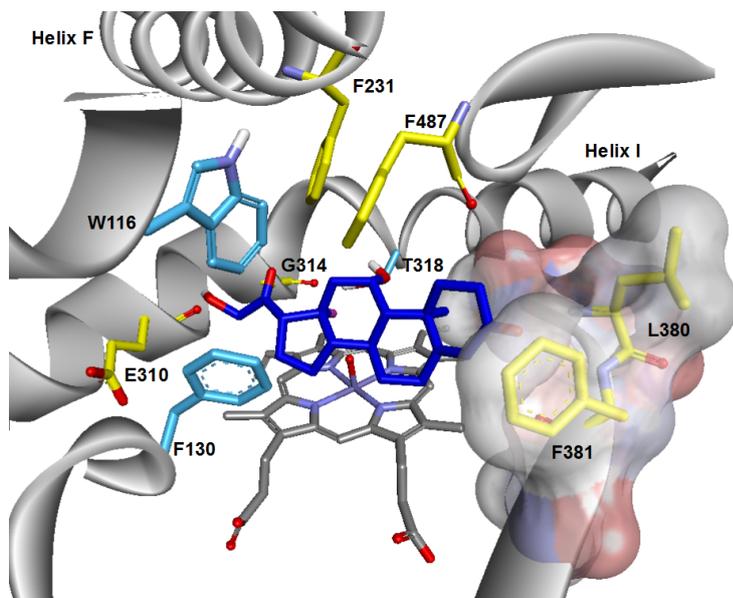


Abb. 3.39.: Mögliche Bindung des Intermediates Corticosteron (blau) im aktiven Zentrum von CYP11B2 zur Bildung von 18-Hydroxycorticosteron. Hierbei liegt die C3-Ketogruppe in der hydrophoben Kavität (rechts im Bild) und kann mit L380 interagieren. Die C21-Hydroxygruppe liegt in Richtung der Helix I und wechselwirkt dort mit E310. Zusätzlich wird Corticosteron durch hydrophobe Wechselwirkungen mit W116, F130, F231 und F487 über dem Häm stabilisiert, so dass am C18 (pink) die Hydroxylierung stattfinden kann. Die Residuen W116, F130 und T318 (hellblau) wurden während des Dockings flexibel gehalten.

In der gerade beschriebenen Position läuft schließlich auch die Oxidation des 18-Hydroxycorticosterons zu Aldosteron ab (Abstand von C18 zu FeO 2,56 Å, Abb. 3.40).

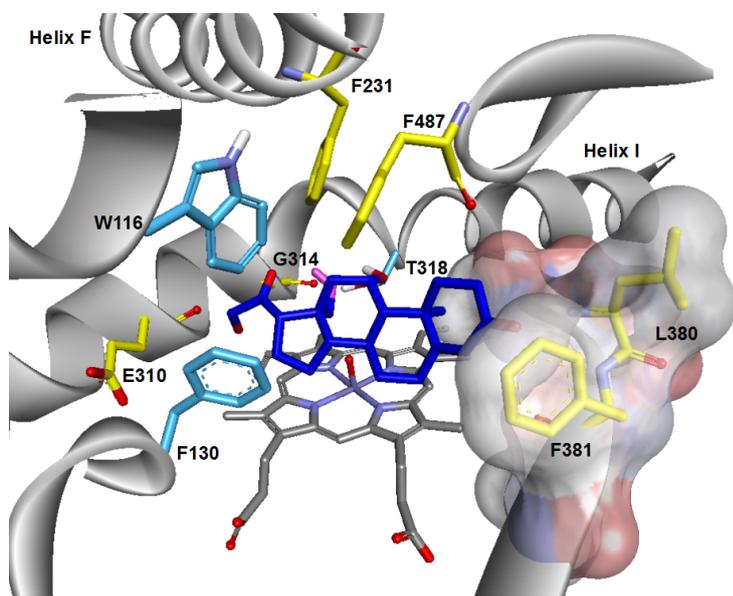


Abb. 3.40.: Mögliche Bindung des Intermediates 18-Hydroxycorticosteron (blau) im aktiven Zentrum von CYP11B2 zur Bildung von Aldosteron. Hierbei liegt die C3-Ketogruppe in der hydrophoben Kavität (rechts im Bild) und kann mit L380 interagieren. Die C21-Hydroxygruppe liegt in Richtung der Helix I und wechselwirkt dort mit E310. Zusätzlich wird 18-Hydroxycorticosteron durch hydrophobe Wechselwirkungen mit W116, F130, F231 und F487 über dem Häm stabilisiert, so dass an der Hydroxygruppe des C18 (pink) die Oxidation stattfinden kann. Die Residuen W116, F130 und T318 (hellblau) wurden während des Dockings flexibel gehalten.

Die HPLC- und GC-MS-Analyse ergab, dass ausgehend vom Substrat 11-Desoxycorticosteron zwei Nebenprodukte, 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron und 19-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron, gebildet werden. Dabei kann 19-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron aus der gleichen Docking-Position von 11-Desoxycorticosteron entstehen, aus der auch Corticosteron entsteht (Abb. 3.38). Der Abstand des C19 zum Sauerstoff des Häm-Eisens beträgt dabei 1,26 Å.

Für die Bildung von 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron muss das Substrat 11-Desoxycorticosteron so im aktiven Zentrum von CYP11B2 stabilisiert werden, dass sich das C18 für die

Hydroxylierung über dem Häm-Eisen befindet. Dies geschieht durch eine Wasserstoffbrückenbindung der Hydroxylgruppe des C21 mit E310 der Helix I und einer Bindung zwischen der C3-Ketogruppe mit L380 in der hydrophoben Kavität. In dieser Position steht C18 mit einem Abstand von 2,89 Å über dem FeO des Häms (Abb. 3.41).

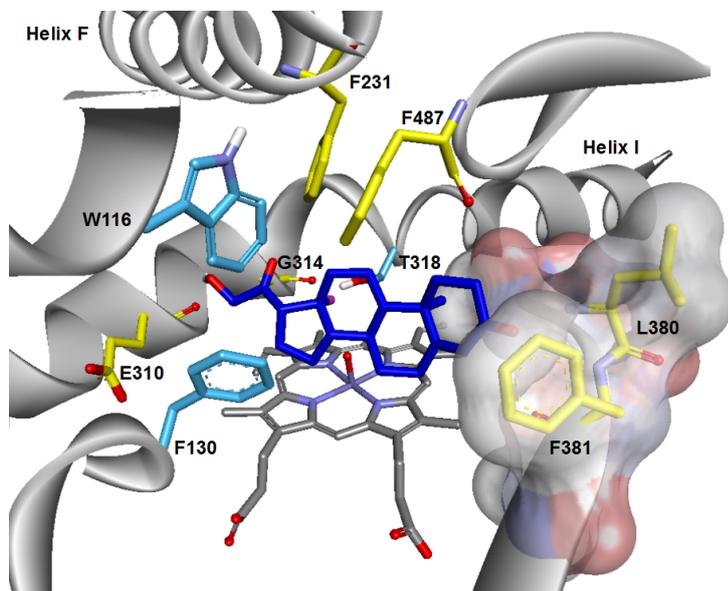


Abb. 3.41.: Mögliche Bindung des Substrates 11-Desoxycorticosteron (blau) im aktiven Zentrum von CYP11B2 zur Bildung von 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron.

Hierbei liegt die C3-Ketogruppe in der hydrophoben Kavität (rechts im Bild) und kann mit L380 interagieren. Die C21-Hydroxygruppe liegt in Richtung der Helix I und wechselwirkt dort mit E310. Zusätzlich wird 11-Desoxycorticosteron durch hydrophobe Wechselwirkungen durch W116, F130, F231 und F487 über dem Häm stabilisiert, so dass am C18 (pink) die Hydroxylierung stattfinden kann. Die Residuen W116, F130 und T318 (hellblau) wurden während des Dockings flexibel gehalten.

Für die weitere Reaktion von 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron zu 18-Hydroxycorticosteron muss eine 11β -Hydroxylierung erfolgen, bei der 18OH-DOC mit der C3-Ketogruppe in Richtung der Helix I liegt. Die C21-Hydroxygruppe bindet an F381 in der hydrophoben Kavität (Abb. 3.42), so dass das C11 einen Abstand von 3,19 Å zum Sauerstoff des Häm-Eisens hat.

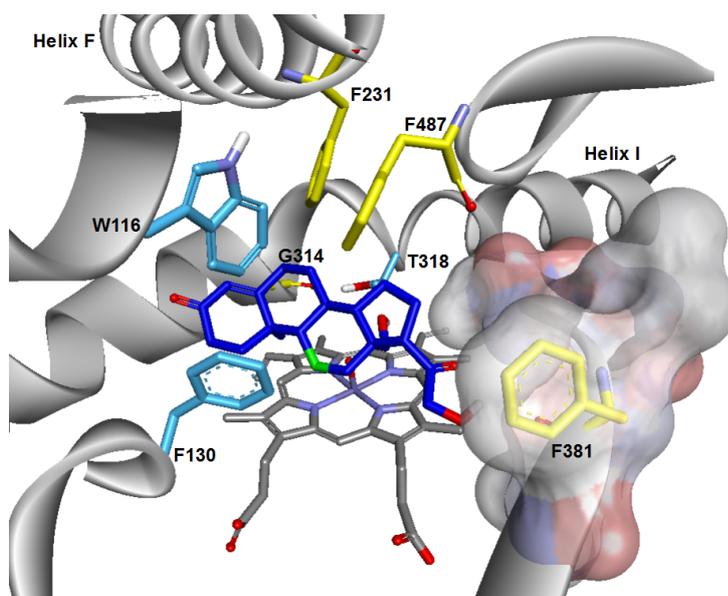


Abb. 3.42.: Mögliche Bindung des Intermediates 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron (blau) im aktiven Zentrum von CYP11B2 zur Bildung von 18-Hydroxycorticosteron.

Hierbei liegt die C3-Ketogruppe der Helix I zugewandt. Die C21-Hydroxygruppe interagiert mit F381 in der hydrophoben Kavität (rechts im Bild). Zusätzlich wird 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron durch hydrophobe Wechselwirkungen durch W116, F130, F231 und F487 über dem Häm stabilisiert, so dass am C11 (grün) die Hydroxylierung stattfinden kann. Die Residuen W116, F130 und T318 (hellblau) wurden während des Dockings flexibel gehalten.

Ein weiteres mögliches Nebenprodukt, welches bisher nicht nachgewiesen werden konnte, ist 19-Hydroxycorticosteron. Dieses könnte durch die Hydroxylierung des C19 aus Corticosteron entstehen, wenn dieses mit der C3-Ketogruppe der Helix I zugewandt ist und die C21-Hydroxygruppe in der hydrophoben Kavität liegt. In dieser Position steht das C19 mit einem Abstand von 1,48 Å über dem FeO.

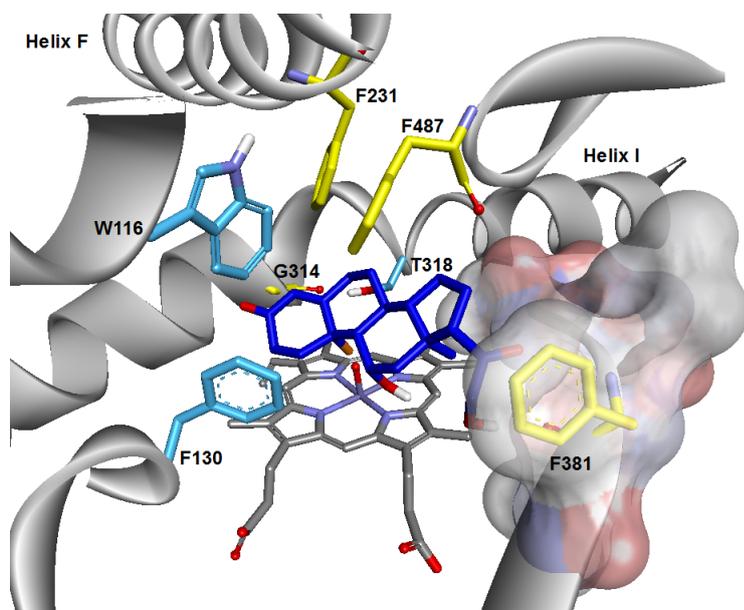


Abb. 3.43.: Mögliche Bindung des Intermediates Corticosteron (blau) im aktiven Zentrum von CYP11B2 zur Bildung von 19-Hydroxycorticosteron. Hierbei liegt die C3-Ketogruppe der Helix I zugewandt. Die C21-Hydroxygruppe interagiert mit F381 in der hydrophoben Kavität (rechts im Bild). Zusätzlich wird Corticosteron durch hydrophobe Wechselwirkungen mit W116, F130, F231 und F487 über dem Häm stabilisiert, so dass am C19 (orange) die Hydroxylierung stattfinden kann. Die Residuen W116, F130 und T318 (hellblau) wurden während des Dockings flexibel gehalten.

3.6.3. Berechnung der Wasserstoffabstraktionsenthalpie

Für den Ablauf der einzelnen Reaktionsschritte spielt nicht nur die Lage der Liganden im aktiven Zentrum eine Rolle, sondern auch die Aktivierungsenergie, die überwunden werden muss, damit eine Reaktion ablaufen kann. Die Aktivierungsenthalpie, die mit der Hydroxylierung durch Cytochrome P450 einhergeht, kann durch die Berechnung mittels linearer Regression abgeschätzt werden, in dem ein *p*-Nitrosophenoxy-Radikal als Stellvertreter für die reaktive Form des Cytochroms P450 verwendet wird (Mayeno *et al.*, 2009). Dementsprechend abgeleitete Enthalpien können somit als maximal benötigte Aktivierungsenergien interpretiert werden, die nur von der jeweiligen Verbindung abhängig sind. Die Berechnungen zeigten, dass eine Hydroxylierung einer Methylgruppe (-CH₃) eine höhere Aktivierungsenthalpie benötigt (mindestens 3 kcal/mol) als diejenige einer Methylen-Gruppe (-CH₂-). Das Substrat 11-Desoxycorticosteron kann an drei verschiedenen Positionen hydroxyliert werden, wobei die 11 β -Hydroxylierung, aus der man Corticosteron erhält, die geringste Aktivierungsenergie benötigt. Eine Hydroxylierung an Position 19 ist energetisch gesehen am ungünstigsten. Die hydroxylierten Zwischenprodukte Corticosteron und 18OH-Corticosteron weisen niedrigere Aktivierungsbarrieren auf als DOC, so dass diese Redoxreaktionen genügend Energie für die Oxidation des 18OH-B zu Aldosteron liefern, die eine höhere Aktivierungsenergie verlangt.

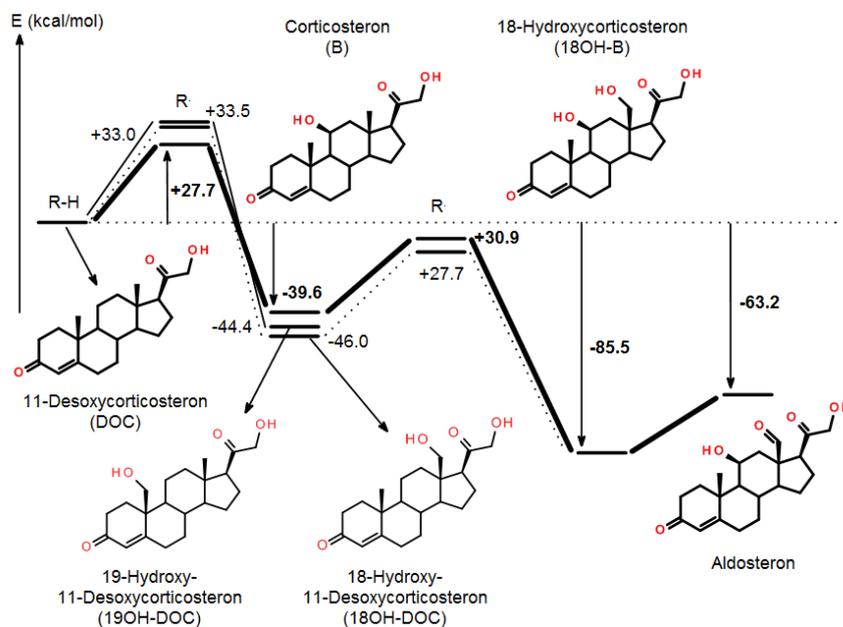


Abb. 3.44.: Aktivierungsenergie für die Wasserstoffabstraktion. Berechnete energetische Differenzen der Steroidliganden relativ zum Ausgangssubstrat 11-Desoxycorticosteron und geschätzte Aktivierungsbarrieren für die Wasserstoffabstraktion. Diese Energien wurden berechnet, indem das *p*-Nitrosophenoxy-Radikal als Ersatz für die reaktive Sauerstoffspezies des Cytochroms P450 betrachtet wird und deshalb nur von den Komponenten selbst abhängig sind. Der putative Reaktionsweg der Hauptprodukte (11 β -Hydroxylierung, 18-Hydroxylierung) zeigt eine geringere Barriere für den ersten Schritt und ist durch eine stärkere Linie hervorgehoben. Der alternative Pfad (18-Hydroxylierung, 11-Hydroxylierung) ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.

3.7. Analyse von CYP11B2-Mutanten

Die Analyse der Dockingergebnisse ließ vermuten, dass die beiden Residuen W116 und F130 möglicherweise eine besondere Rolle bei der Funktion des CYP11B2 ausüben. Die Residuen mussten für das Docking flexibel behandelt werden, um die Bindung der Liganden im aktiven Zentrum zu ermöglichen, wo sie insbesondere bei der Stabilisierung der Liganden eine Rolle spielen. Diese Residuen sind möglicherweise auch an der Elektronenübertragung innerhalb des Proteins beteiligt, da sie aromatische Seitenketten besitzen, bei denen die delokalisierten π -Elektronen als Donoren und Akzeptoren wirken können (Straub *et al.*, 1993). Um die Funktion dieser Residuen zu überprüfen, wurden Mutanten der Aldosteronsynthese erstellt. Dabei wurde das Tryptophan an Position 116 durch Phenylalanin bzw. durch Tyrosin ersetzt, um den aromatischen Charakter dieser Position zu erhalten. An Position 130 wurde Phenylalanin gegen das nicht aromatische Alanin ausgetauscht, um durch den Verlust der Aromatizität die Bedeutung der Residuen zu bestimmen.

Im COD-Spektrum zeigten die Mutanten jedoch eine relativ schnellen Abnahme (innerhalb von etwa 5 Minuten) des 450 nm Peaks und einen Anstieg bei 420 nm. Im Vergleich zum Wildtyp scheinen die Mutanten daher weniger stabil zu sein (Abb. 3.46).

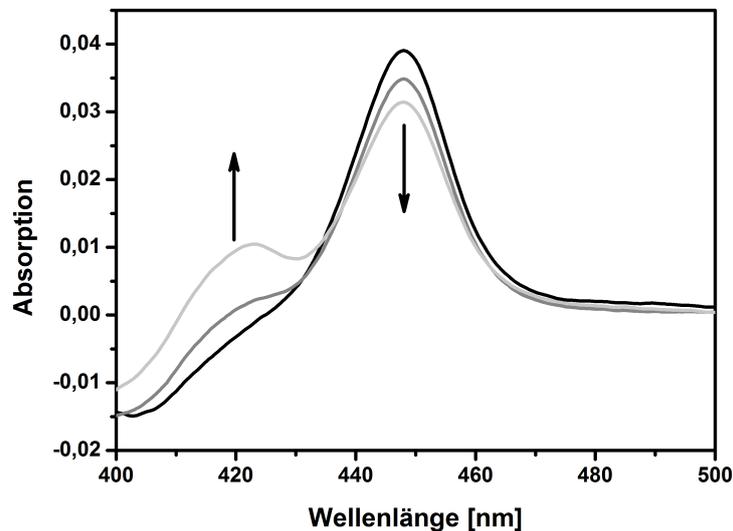


Abb. 3.46.: CO-Differenzspektrum der Mutante CYP11B2 W116Y. Durch die Richtung der Pfeile gekennzeichnet ist die Abnahme des charakteristischen Peaks bei 450 nm und der Anstieg des Peaks bei 420 nm. Dieser Peak ist typisch bei inaktiven Cytochromen P450.

3.7.2. Substratumsatz

Der Substratumsatz von 11-Desoxycorticosteron zeigte, dass alle drei Mutanten nicht in der Lage sind, Aldosteron zu bilden, d. h. die 18-Oxidase-Funktion des Enzyms ist nicht mehr gegeben (Abb. 3.47 B). Zudem zeigen sie eine stark reduzierte 18-Hydroxylase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp, die sich in einer sehr geringen Mengen 18-Hydroxycorticosteron widerspiegelt. Nichtsdestotrotz bleibt die Bildung von 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron hiervon unbeeinflusst. Der größte Anteil des Substrates wird aufgrund der beschriebenen Aktivitätsverluste zu Corticosteron umgesetzt, was bedeutet, dass die Mutationen nicht die 11 β -Hydroxylase-Aktivität beeinflussen.

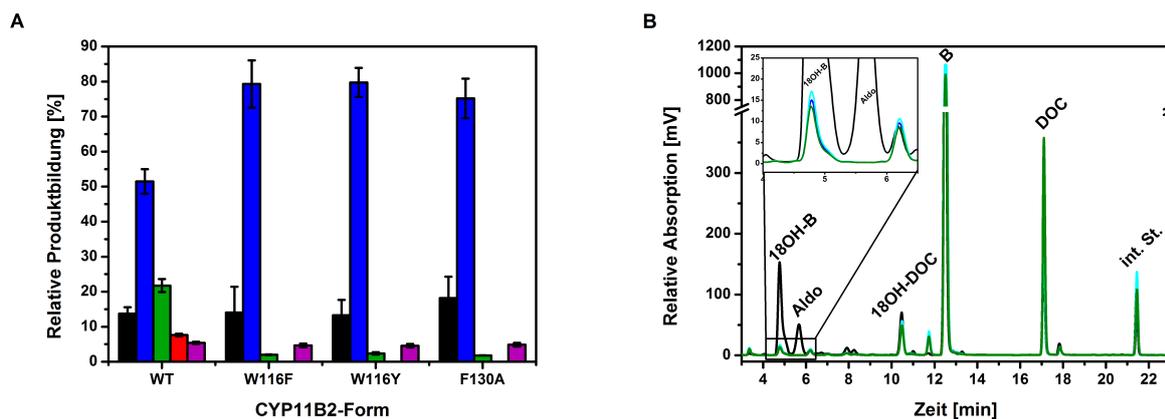


Abb. 3.47.: *In vitro*-Umsatz von 11-Desoxycorticosteron. **A.** Vergleich der Produktbildung durch humanes CYP11B2 und der generierten Mutanten. 11-Desoxycorticosteron (schwarz), Corticosteron: blau, 18OH-Corticosteron: grün, Aldosteron: rot, 18OH-11-Desoxycorticosteron: violett. **B.** HPLC-Chromatogramme eines 11-Desoxycorticosteron-Umsatzes durch CYP11B2 WT (schwarz), CYP11B2 W116F (blau), CYP11B2 W116Y (türkis) und CYP11B2 F130A (grün). Die Reaktionen wurden bei 800 UpM und 37 °C für 40 Minuten mit 0,5 μ M der jeweiligen CYP11B2-Form, 20 μ M Adx, 0,5 μ M AdR und 400 μ M des jeweiligen Substrates inkubiert.

3.7.3. Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die geringe Aktivität bezüglich der 18-Hydroxylase- und 18-Oxidase-Aktivität kann, wie oben beschrieben, einerseits durch den negativen Einfluss der Mutationen auf den Elektronenfluss innerhalb des Enzyms verursacht werden. Andererseits können diese Mutationen auch zu einer schwächeren Bindung des Substrates bzw. der Intermediate führen, so dass diese nicht mehr zur Bildung von Aldosteron im aktiven Zentrum verbleiben. Um hier besser differenzieren zu können, wurde durch Differenzspektroskopie die Dissoziationskonstante jeder Mutante für das Substrat 11-Desoxycorticosteron bestimmt (Abb. 3.48). Im Vergleich zum Wildtyp ($2,38 \pm 0,06 \mu\text{M}$, siehe Abschnitt 3.5.1) zeigen alle Mutanten eine schwächere Bindung des Substrates. Dabei unterscheiden sich die beiden Mutanten an Position 116 mit K_D -Werten von $12,88 \pm 0,6 \mu\text{M}$ und $11,5 \pm 0,59 \mu\text{M}$ recht wenig voneinander. Die Bindung von 11-Desoxycorticosteron durch die Mutante F130A ist dagegen noch etwas schwächer ($K_D = 19,03 \pm 1,16 \mu\text{M}$).

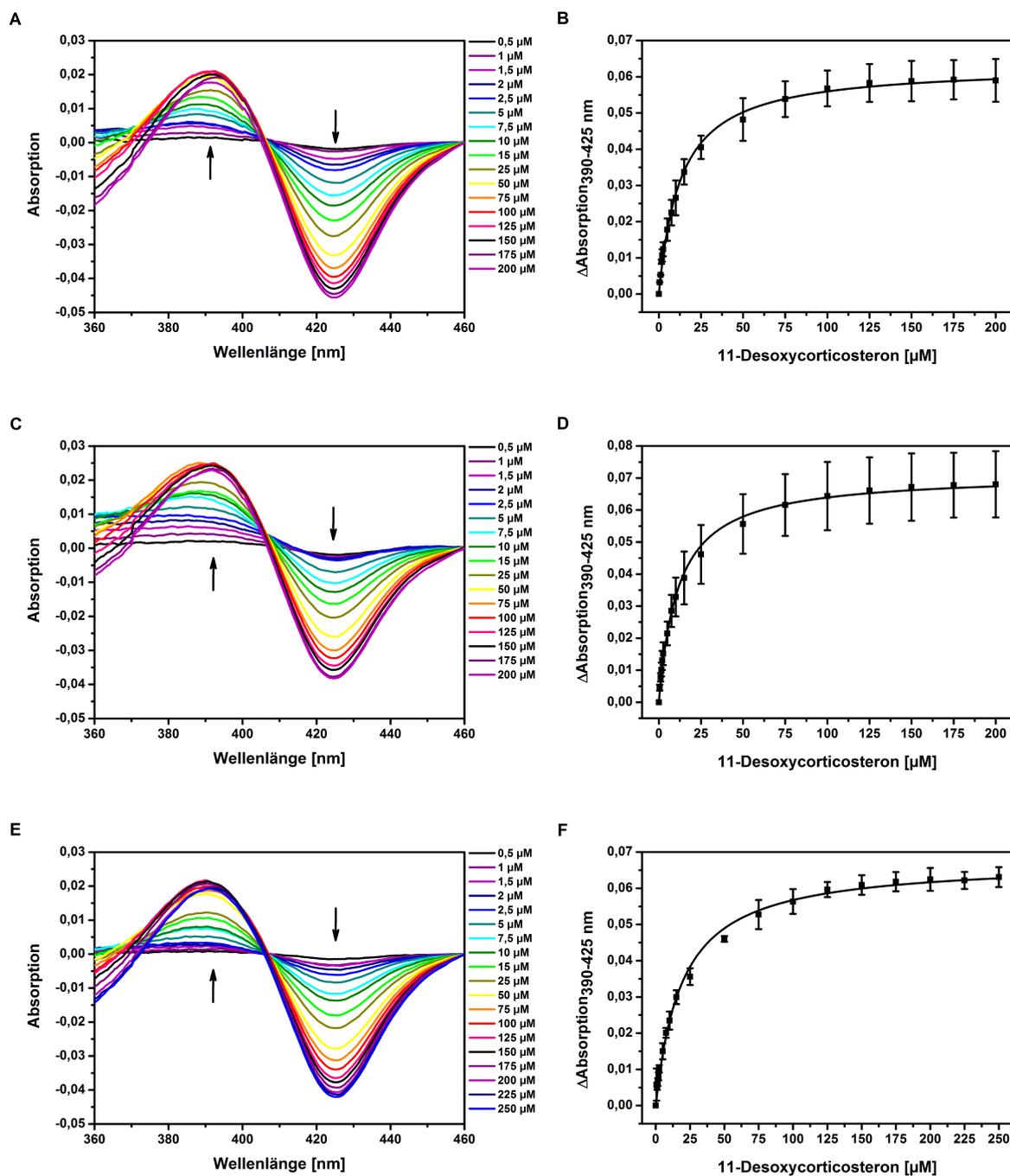


Abb. 3.48.: Differenzspektren der CYP11B2-Mutanten. A. W116F, **C.** W116Y und **E.** F130A. Das Substrat 11-Desoxycorticosteron wurde jeweils in steigenden Mengen zur Enzymlösung (2 μM CYP11B2 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20 % Glycerol, 0,5 % Na-Cholat, 0,05 % Tween 20) zugegeben und die Differenzspektren nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten bei RT aufgenommen. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde die Differenz des Maximums und des Minimums jedes Spektrums gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen und die Daten mittels hyperbolischer Regression ausgewertet: **B.** CYP11B2_W116F, **D.** CYP11B2_W116Y, **F.** CYP11B2_F130A.

Die Dissoziationskonstante für Corticosteron konnte für keine der drei Mutanten bestimmt werden. Zwar wurde durch das Intermediat ein *Spin-Shift* induziert, jedoch erst bei sehr hohen Konzentrationen von Corticosteron, so dass die notwendige Sättigung des Enzyms für die Bestimmung des K_D -Wertes nicht erreicht werden konnte. Die K_D -Werte der Mutanten gegenüber des Substrates 11-Desoxycorticosteron sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Residuen W116 und F130 eine essentielle Funktion in der Bindung und, damit einhergehend, bei der Umsetzung des Substrates übernehmen.

Tab. 3.6.: Übersicht der Dissoziationskonstanten und Regressionskoeffizienten der CYP11B2-Mutanten.

CYP11B2	Substanz	K_D [μM]	R^2
W116F	DOC	$12,88 \pm 0,6$	0,997
W116Y	DOC	$11,5 \pm 0,59$	0,996
F130A	DOC	$19,03 \pm 1,16$	0,995

4. Diskussion

Die humane Aldosteronsynthese wird in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde exprimiert und katalysiert dort die Biosynthese des wichtigsten Mineralocorticoids Aldosteron. Dieses Steroidhormon vermittelt die Aufrechterhaltung der Salz-Wasser-Homöostase im Körper und ist im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren, die das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) bilden, an der Regulation des Blutdrucks beteiligt.

Die übermäßige Sekretion von Aldosteron (Hyperaldosteronismus) führt zu Bluthochdruck, der die häufigste Todesursache weltweit darstellt (7,5 Mio. Todesfällen (12,8 %) im Jahr 2004) und von dem etwa 25 % der Erwachsenen betroffen sind (World Health Organization, 2009, Fagard, 2011). Des Weiteren tragen chronisch erhöhte Aldosteronwerte sowohl zur Entstehung von myokardialer Fibrose und Herzinsuffizienz bei, als auch zur Verschlechterung der Krankhaftigkeit und der Sterblichkeit, die mit diesen Erkrankungen verbunden ist (Marney und Brown, 2007, Gekle und Grossmann, 2009). Diese Aspekte machen die Aldosteronsynthese zu einem interessanten Drug Target, weshalb sie in den letzten Jahren zunehmend das Interesse der Forschung und vor allem der pharmazeutischen Industrie geweckt hat.

Demgegenüber stehen allerdings auch Erkrankungen, die durch eine Defizienz der Aldosteronsynthese verursacht werden und in schweren Fällen ebenfalls bis hin zum Tod führen können. Der Mangel an Aldosteron (Hypoaldosteronismus) ist bereits in den ersten Lebenstagen und -wochen durch mehrere Symptome (Erbrechen, Dehydrierung, Tachykardie, Hypotonie) gekennzeichnet und kann unbehandelt in Folge einer Salzverlustkrise (Hyponatriämie und Hyperkaliämie) lebensbedrohliche Ausmaße annehmen (White, 2004).

Da die Aldosteronsynthese ein so wichtiges Enzym darstellt, ist das Verständnis ihrer Funktion ein entscheidendes Kriterium für die Entwicklung von Wirkstoffen. Bisher erfolgt die Untersuchung der humanen Aldosteronsynthese überwiegend in Zellkultur durch die Expression in nicht-humanen Säugerzelllinien (z. B. COS-1 (Böttner *et al.*, 1996), COS-7 und V79 (Denner *et al.*, 1995a)) bzw. in humanen Nebennierenrindenkarzinomzellen (z. B. NCI-H295R (Müller-Vieira *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2012)). Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Enzymaktivität besteht durch die heterologe Expression in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* (Bureik *et al.*, 2002). Die verschiedenen Expressionssysteme werden je nach Eignung für unterschiedliche Analysen bezüglich der Aldosteronsynthese eingesetzt, wobei eine genaue Enzymkonzentration meist nicht bekannt oder bestimmbar ist.

Die heterologe Expression des humanen CYP11B2 in *E. coli* und die Reinigung des Proteins

ermöglichen neuerdings eine detaillierte Analyse der Funktion auf molekularer Ebene (Hobler *et al.*, 2012). Die *in vitro*-Untersuchung in einem rekonstituierten System mit den beiden Elektronentransferproteinen Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase gestattet dabei die Analyse der Substratumsetzung und des Produktmusters in Abhängigkeit von definierten Enzymkonzentrationen. Mit dem gereinigten Protein können zudem Dissoziationskonstanten von Substraten bestimmt werden, die Aufschluss über die Stärke der Bindung geben. Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe der *in vitro*-Substratumsätze und Bestimmung der Ligandenbindung eine umfassende Charakterisierung der humanen Aldosteronsynthase zu erstellen. Die Entwicklung eines neuen Homologiemodells für CYP11B2 sollte zusätzliche zum Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehung des Enzyms beitragen. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.1. Expression von CYP11B2 und seiner Redoxpartner

4.1.1. Optimierung der CYP11B2-Expression

Die heterologe Expression der humanen Aldosteronsynthase in Prokaryoten und ihre Reinigung blieb lange Zeit erfolglos. Erst 20 Jahre nach der Klonierung der cDNA konnte das Protein rekombinant her- und für die Charakterisierung bereitgestellt werden (Hobler, 2008). Die Expression der humanen Aldosteronsynthase (CYP11B2) in *E. coli* erfolgt dabei fast identisch zur Expression der humanen 11 β -Hydroxylase (CYP11B1) (Zöllner *et al.*, 2008). Bei diesen zu 93 % identischen Proteinen handelt es sich um Membranproteine, deren Expression in Prokaryoten durch das Fehlen membranbegrenzter Organellen erschwert wird. Abhilfe schafft hier die Co-Expression der Chaperone GroEL und GroES, die die richtige Faltung der Proteine während der Expression unterstützen (Nishihara *et al.*, 1998). Trotz der Verwendung eines für die Expression von Membranproteinen entwickelten *E. coli*-Stammes (C43 (DE3)) für die Expression des CYP11B2, liegt der Expressionslevel (~ 60 nmol/L Kultur) deutlich unter dem des CYP11B1 (~ 400 nmol/L Kultur, Expression in *E. coli* BL21(DE3)). Um genügend CYP11B2 für die umfangreichen Untersuchungen zur Charakterisierung des Enzyms bereitzustellen, war ein Ziel dieser Arbeit die Optimierung der CYP11B2-Expression.

Die humane Aromatase weist bei der Expression in *E. coli* eine Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums (Kagawa, 2011) auf, bei der die besten Expressionslevel um pH 7,0 erreicht werden. Dieser Umstand konnte auch bei der CYP11B2-Expression beobachtet werden, allerdings bei pH-Werten zwischen 7,2 und 7,8. Da der pH-Wert des Mediums nach Induktion zunächst absinkt, bestand eine Idee darin, durch ein stärker gepuffertes Medium den pH-Wert auf einem geeigneteren Niveau für die Proteinexpression zu halten. Die Verwendung eines

Mediums mit stärkerer Pufferkapazität (2xTB), sowie die Erhöhung der Konzentration des Expressionsinduktors IPTG führten dabei in Kombination zu einer Erhöhung des Expressionslevels auf 90 nmol/L Kultur. Die Bestimmung des Verlauf der CYP11B2-Expression erfolgte daraufhin durch die Probenahme zu verschiedenen Zeitpunkten und der Bestimmung des Expressionslevels und pH-Wertes des Mediums (Abb. 4.1). Hierbei ist eine Korrelation zwischen der exprimierten Proteinmenge und dem pH-Wert zu beobachten. Aufgrund der Ergebnisse anfänglicher CYP11B2-Expressionen wurde dieses meist bei einem pH-Wert von etwa 7,5 beendet. Wie der Verlauf der CYP11B2-Expression jedoch zeigt, ist bei höheren pH-Werten noch mit einem Anstieg der Aldosteronsynthese-Expression zu rechnen. Diese Tatsache führt zwar zu längeren Expressionszeiten, ist aber angesichts höherer Ausbeuten des Proteins für weitere Expressionen zu beachten.

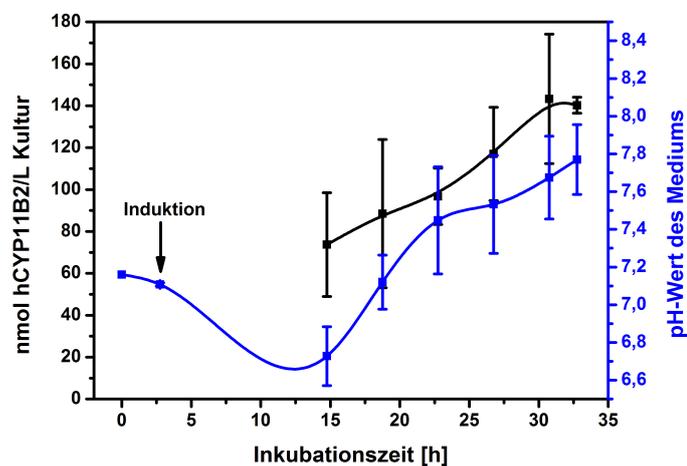


Abb. 4.1.: Expression von humanem CYP11B2. Verlauf des Expressionslevels der humanen Aldosteronsynthese (schwarz) und des pH-Wertes in 2xTB-Medium mit 1 mM IPTG. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Induktion der Proteinexpression an.

Weitere Versuche die Expression zu verbessern, führten zu keinem positiven Effekt. Ganz im Gegenteil lieferte die Expression in Anwesenheit des Substrates 11-Desoxycorticosteron, das zur Stabilisierung des Proteins dienen sollte, wie bei der Expression des CYP11B2 aus Ratte (Nonaka *et al.*, 1998), zu wesentlichen schlechteren Ausbeuten.

Die Verwendung einer für *E. coli* codon-optimierten cDNA für CYP11B2 erbrachte bei ansonsten identischen Expressionsbedingungen nur etwa ein Drittel der Ausbeute gegenüber der nativen cDNA. Möglicherweise müssen hier andere Expressionbedingungen (z. B. Temperatur) gewählt werden, die in dieser Arbeit aber nicht weiter überprüft wurden.

Eine weitere Expression erfolgte in Auto-Induktionsmedium, bei der die Induktion der Proteinexpression in Abhängigkeit vom Zellmetabolismus geschieht (Studier, 2005). Die positiven Ergebnisse aus einer Diplomarbeit zur Entwicklung eines Ganzzellsystems mit CYP11B2 in *E. coli* konnten hier nicht bestätigt werden (Anderko, 2012). Der Verlauf des pH-Wertes sowie der Zelldichte in 2xTB-Medium und Auto-Induktionsmedium zeigte keine großen Un-

terschiede. Die Analyse der Expressionslevel zeigt jedoch, dass diese in beiden Medien mit der Inkubationsdauer ansteigen. Möglicherweise braucht die Expression des Proteins in Auto-Induktionsmedium länger, unabhängig vom pH-Wert, und sollte durch eine längere Expressionsdauer überprüft werden. Nichtsdestrotz lieferte die Expression in 2xTB-Medium in gleicher Zeit eine höhere Proteinmenge als in Auto-Induktionsmedium, weshalb für weitere Expressionen das erst-genannte Medium verwendet wurde.

4.1.2. Expression und Reinigung der Redoxpartner

Die möglichst nah am natürlichen System durchzuführende Charakterisierung der humanen Aldosteronsynthase verlangte nach den entsprechenden Redoxpartnern für die Elektronenversorgung in den *in vitro*-Rekonstitutionsassays. Hierzu erfolgte die Expression und Reinigung des humanen Adrenodoxins und der Adrenodoxin-Reduktase nach den in der Arbeitsgruppe etablierten Methoden für die bovinen Proteine. Damit führte die Expression des humanen Adrenodoxin zu einer Ausbeute von 10 mg gereinigtem Protein. Der Einbau des [2Fe-2S]-Cluster während der Expression konnte durch ein charakteristisches Spektrum mit einem Maximum bei 414 nm und einer Schulter bei 455 nm bestätigt werden. Eine in der Literatur beschriebene vergleichbare Expression des Adx führte ebenso zu 10 mg Protein, die durch eine aufwendige Rekonstitution des Clusters auf 30 mg erhöht werden konnte (Xia *et al.*, 1996). Da die Ausbeute an humanem Adx mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode zufriedenstellend ist, wurde auf eine weitere Optimierung verzichtet.

Die Expression der humanen Adrenodoxin-Reduktase erfolgte im für die Membranproteinexpression-optimierten *E. coli*-Stamm C43(DE3) mit der Co-Expression der Chaperone GroEL und GroES. Diese Kombination führte zu einer Ausbeute von 7 mg gereinigter AdR pro L Kultur und stellt somit eine immense Steigerung (70fach) gegenüber der Methode von Brandt und Vickery dar (Brandt und Vickery, 1992), die keiner weiteren Optimierung bedarf. Das Protein zeigte im UV-Vis-Spektrum die charakteristischen Maxima bei 376 nm und 450 nm, sowie einer Schulter bei 475 nm.

Die Aktivität der beiden Proteine bezüglich der Elektronenübertragung auf Cytochrome P450 wurde durch *in vitro*-Substratumsätze mit CYP11B2 bestätigt.

4.2. Reaktionsbedingungen im *in vitro*-System

Zur Etablierung des *in vitro*-Systems für die humane Aldosteronsynthase wurden verschiedene Bedingungen getestet, die Einfluss auf das Produktmuster haben. Die Substrate werden

standardmäßig in Ethanol gelöst, wodurch je nach eingesetzter Substratkonzentration der Anteil an Ethanol im Reaktionsansatz beachtet werden muss, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. Dazu ist es wichtig, eine Toleranzgrenze festzulegen, die den Umsatz des Substrates möglichst wenig beeinflusst. Zusätzlich muss die Löslichkeit der Steroide in Ethanol beachtet werden und Stocklösungen müssen eine möglichst hohe Konzentration haben, die aber noch zu pipettieren ist. Der Ansatz von 10 mM Steroid leistet hier gute Dienste. In dieser Konzentration sind alle verwendeten Steroide löslich und führen bei einer eingesetzten Konzentration von 400 μM zu 4 % Ethanolgehalt. Bei höheren Ethanolkonzentrationen ist ein nicht vertretbarer Verlust der Enzymaktivität zu beobachten, der in besonderem Maße die 18-Hydroxylase und 18-Oxidase-Aktivität betrifft. Eine Abschwächung der 11 β -Hydroxylase-Aktivität ist selbst bei einem Ethanolgehalt von 10 % kaum wahrzunehmen.

Der Ersatz von Ethanol durch Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin als Lösemittel für die relativ hydrophoben Steroide brachte keinen Erfolg. Möglicherweise wechselwirkt die Aldosteronsynthese selbst mit dem Cyclodextrin, so dass die Funktionalität des Enzyms beeinflusst wird, wovon aber aufgrund der Größenverhältnisse eher nicht auszugehen ist. Eine weitere Grund könnte die Komplexbildung des Substrates in der hydrophoben Kavität sein, die das Substrat dem Enzym unzugänglich macht. Im Falle des 11-Desoxycorticosteron kann das allerdings nicht der Fall sein, da 11-Desoxycorticosteron zu 95 % umgesetzt wird und überwiegend Corticosteron gebildet wird. Corticosteron hingegen könnte aufgrund seiner schwachen Bindung im Enzym eher eine Affinität für die hydrophobe Kavität des Cyclodextrins zeigen, wodurch die nachfolgenden Reaktionsschritte unterbunden werden. Tatsächlich wird Corticosteron als Substrat (gelöst in CD) nur zu etwa 15 % umgesetzt. Somit ist Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin in diesem Fall nicht als Lösemittel für die Substrate geeignet. Das Substrat 11-Desoxycorticosteron wird für den Umsatz in einer Konzentration von 400 μM eingesetzt, da damit auch Abnahmen in der 18-Oxidase-Funktion, die ohnehin wenig Aldosteron liefert, beobachtet werden können. Das Substrat 11-Desoxycorticosteron, sowie Intermediate, die als Substrat eingesetzt wurden, liegen somit in einem 800fachen Überschuss zum Enzym vor, so dass auch Substrate mit hohem K_D -Wert und schlechter Bindung umgesetzt werden sollten.

Ein weiterer Faktor, der die Produktbildung im *in vitro*-System beeinflusst, ist der pH-Wert des Reaktionspuffers. Bei pH-Werten $< 7,4$ und $> 8,0$ kommt es zu einer starken Beeinträchtigung der 18-Hydroxylase und 18-Oxidase-Aktivität. Zwischen pH 7,4 und 8,0 gibt es dagegen nur geringe Unterschiede in der Produktbildung. Der pH-Wert der inneren mitochondrialen Matrix beträgt etwa 7,7 bis 7,8 (Porcelli *et al.*, 2005). Trotzdem wurde der Reaktionspuffer auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, da hier die Aldosteronbildung am höchsten und damit am besten geeignet ist für die Analysen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden.

Zur Solubilisierung der beiden Membranproteine, CYP11B2 und AdR, wurde Tween 20, das in den Umsätzen in meiner Masterarbeit verwendet wurde, durch Dilauroylphosphatidyl-

cholin (DLPC) ersetzt. DLPC dient durch Mizellenbildung zur Imitierung der natürlichen Mitochondrienmembran, die eine Mischung verschiedener Phospholipide enthält (Phosphatidylglycerin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin u. a. (Kim und Hoppel, 2013). Im Gegensatz zu Tween 20 wird durch DLPC die 18-Hydroxylase- und die 18-Oxidase-Aktivität nicht gehemmt.

4.3. Charakterisierung der humanen Aldosteronsynthase

4.3.1. Substratbindung

Die spektralen Änderungen, die durch die Bindung eines Substrates oder Inhibitors im aktiven Zentrum eines Cytochroms P450 hervorgerufen werden, dienen zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D , die eine Aussage über die Bindungsstärke der Substanz erlaubt. In der Masterarbeit erfolgte die Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Substrates 11-Desoxycorticosteron für die humane Aldosteronsynthase anhand von nur sechs Messpunkten und einer linearen Regression mittels Lineweaver-Burk. Damit kann es jedoch bei Messfehlern in niedrigen Substratkonzentrationen zu großen Ungenauigkeiten kommen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Substanzen bis zur Sättigung titriert und die Dissoziationskonstante durch hyperbolische Regression bestimmt.

Mit dieser Methode konnte die Dissoziationskonstante des Substrates in dieser Arbeit bestätigt werden ($2,38 \pm 0,06 \mu\text{M}$). Von weiterem Interesse war die Untersuchung der Bindungsstärke der Intermediate einer CYP11B2-Reaktion. Während die Bindung des Substrates 11-Desoxycorticosteron relativ stark ist, konnte für das erste Zwischenprodukt der Reaktion (Corticosteron) eine fast 50fach höhere Dissoziationskonstante ($115,08 \pm 5,97 \mu\text{M}$) bestimmt werden. Dies bedeutet eine wesentlich schlechtere Bindung des Corticosterons an das Enzym, die sich auf die Umsetzung des Intermediates auswirkt. Während das Substrat 11-Desoxycorticosteron *in vitro* nahezu vollständig umgesetzt wird, bleibt etwa ein Drittel des eingesetzten Corticosterons zurück.

Das Intermediat 18-Hydroxycorticosteron konnte selbst in hohen Konzentrationen (1 mM) keinen spektralen *Shift* des Enzyms induzieren, wodurch auf eine sehr schwache Bindung an das Enzym geschlossen werden kann. Dieser Aspekt korreliert sehr gut mit der Tatsache, dass nur etwa 10 % des 11-Desoxycorticosterons zu Aldosteron überführt werden. Der größte Teil des Substrates wird entweder zu Corticosteron oder 18-Hydroxycorticosteron hydroxyliert, bedingt durch die Freisetzung aus dem aktiven Zentrum aufgrund der schwachen Bindung. Für 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron, ein Nebenprodukt der Reaktion, konnte ein *Shift* beobachtet werden, jedoch konnte keine Sättigung erreicht werden. Aus den gewonnenen Dis-

soziationskonstanten kann die Bindung der für die Reaktion der Aldostersynthese relevanten Steroide folgendermaßen angegeben werden:

$$\text{DOC} > \text{B} > 18\text{OH-DOC} > 18\text{OH-B} > \text{Aldo}$$

Die humane Aromatase erlaubt bei der Bildung von Estron ausgehend von Androstenedion während der Reaktion die Dissoziation der 19-Hydroxy- und 19-Aldehyd-Intermediate vom aktiven Zentrum. Dieser dissoziative Charakter des Enzym ist gekennzeichnet durch gering ansteigende K_D -Werte der Intermediate und damit einer hohen Affinität für das Enzym (Sohl und Guengerich, 2010). Dadurch wird eine Re-Bindung der Intermediate für die weitere Reaktion zur Produktbildung ermöglicht. Aufgrund der stark abnehmenden Bindungsstärke in Richtung des Endproduktes ist im Falle der humanen Aldosteronsynthese anzunehmen, dass die Intermediate nach Dissoziation aus dem Enzym nicht wieder im aktiven Zentrum binden können. Damit muss die katalysierte Reaktion prozessiv verlaufen, d. h. die Bildung von Aldosteron erfolgt ohne Freisetzung der Intermediate während der Reaktion. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Imai *et al.* bestätigt, die die sukzessive Bildung von Aldosteron durch bovines CYP11B1 ohne Dissoziation der Intermediate zeigten (Imai *et al.*, 1998).

4.3.2. Einfluss der Redoxpartner Adx und AdR

Die Bildung von Aldosteron erfolgt durch eine Drei-Schritt-Reaktion mit einer 11β -Hydroxylierung, einer 18-Hydroxylierung und einer 18-Oxidation am Steroidgerüst von 11-Desoxycorticosteron, die von der humanen Aldosteronsynthese katalysiert werden. Mit dem gereinigten Enzym wurden *in vitro*-Umsätze von 11-Desoxycorticosteron durchgeführt und die Produktbildung in Abhängigkeit von unterschiedlichen Faktoren untersucht.

Ein wichtiger Bestandteil des rekonstituierten Systems, mit dem der Substratumsatz erfolgt, sind die beiden Redoxpartner Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase. Während der Reaktionen sorgen sie für die Bereitstellung der notwendigen Elektronen, indem AdR die Elektronen von NADPH aufnimmt, sie an das Adx abgibt, welches seinerseits die Elektronen auf das Cytochrom P450 überträgt. Der genaue Mechanismus der Elektronenübertragung konnte trotz intensiver Bemühung noch nicht endgültig geklärt werden und es werden mehrere Modelle diskutiert (Ewen *et al.*, 2011). Zum einen kann Adx als mobiler Elektronenüberträger zwischen AdR und dem Cytochrom P450 fungieren (*Shuttle Mechanismus*) (Hanukoglu *et al.*, 1981, Lambeth *et al.*, 1982). Zum anderen wird eine Komplexbildung zwischen AdR, Adx und CYP450 angenommen, entweder im Verhältnis 1:1:1 (Kido und Kimura, 1979) oder

1:2:1 (Hara und Takeshima, 1994). Zudem ist auch eine Kombination des *Shuttle*-Modells und des Komplex-Modells durch die Bildung funktioneller Adx-Dimere vorstellbar (Pikuleva *et al.*, 2000, Beilke *et al.*, 2002).

Die enzymatische Charakterisierung der humanen Aldosteronsynthese erfolgte mit den humanen Redoxpartnern, deren Klonierung in Expressionsvektoren für die Expression in *E. coli* und die anschließende Reinigung der Proteine im Rahmen dieser Arbeit erfolgte. Die bovinen Form des Adx und der AdR sind in der Lage, Elektronen auf das humane Cytochrom P450 zu übertragen und wurden zur Untersuchung der funktionellen Aktivität der humanen 11 β -Hydroxylase eingesetzt (Zöllner *et al.*, 2008). Die umgesetzte Menge an 11-Desoxycorticosteron ist unabhängig von der Verwendung des humanen oder bovinen Redoxsystems. Jedoch wird ein größerer Teil des Corticosterons mit den humanen Elektronentransferproteinen umgesetzt, so dass ähnliche 18-Hydroxycorticosteronwerte ($44,94 \pm 3,8$ nmol/Umsatz (human) bzw. $45,11 \pm 1,7$ nmol/Umsatz (bovin)) und leicht erhöhte Aldosteronwerte ($13,29 \pm 1,3$ nmol/Umsatz (human) bzw. $11,83 \pm 0,5$ nmol/Umsatz (bovin)) zu beobachten sind. Sowohl die beiden Adx- als auch AdR-Formen zeigen untereinander eine Sequenzidentität von 88 %. Die Unterschiede in der Sequenz betreffen nicht die Aminosäuren, die an der Wechselwirkung von bovinem Adx (D72, E73, D76 und D79) und boviner AdR (R239 und R243) beschrieben sind (Grinberg *et al.*, 2000, Vickery, 1997). Diese Aminosäuren sind in humanem Adx und humaner AdR konserviert, so dass hier ebenfalls eine elektrostatische Wechselwirkung der beiden Proteine stattfinden kann. Möglicherweise unterscheidet sich die Interaktion der Redoxpartner mit CYP11B2, so dass das humane Redoxsystem besser darauf angepasst ist. Stopped flow-Experimente für das humane CYP11B1 wiesen drei Phasen bei der Elektronenübertragung von Adx auf das Enzym auf, die möglicherweise auf drei unterschiedliche Adx-Bindestellen hindeuten oder auf Umlagerungen während der Reaktion, die zu unterschiedlichen Reduktionsraten führen (Zöllner *et al.*, 2008).

Für die humane Aldosteronsynthese konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von Cytochrom P450 zu Adx und AdR in den *in vitro*-Umsätzen Auswirkungen auf die Produktbildung hat. Das Verhältnis von CYP450 zu AdR wurde konstant gehalten, während Adx variiert wurde, so dass die Verhältnisse zwischen 1:1:1 und 1:40:1 lagen (CYP450:Adx:AdR). Dabei zeigte sich, dass im Verhältnis von 1:1:1 und 1:2:1 überwiegend Corticosteron und mit steigender Menge an Adx vermehrt 18-Hydroxycorticosteron und Aldosteron gebildet werden. Somit bewirkt das Verhältnis von Adx zum CYP11B2 eine Änderung des Produktmusters. Ähnliche Beobachtungen konnten für CYP11B2 bei Umsätzen in Zellkulturen gemacht werden, bei denen die Erhöhung von Adx zu einer gesteigerten Aktivität des Enzyms führte (Cao und Bernhardt, 1999). Diese Ergebnisse korrelieren gut mit der Tatsache, dass für die Synthese des Aldosterons sechs Elektronen benötigt werden, die von Adx auf das Enzym übertragen werden. Aus diesem Grund wäre die Existenz von Adx-Dimeren oder von mehreren Interaktionsstellen für Adx auch im Falle der Aldosteronsynthese durchaus plausibel.

4.3.3. Die CYP11B2-katalysierte Substratumsetzung

Im Folgenden sollen die Substratumsetzung und Produktbildung durch die humane Aldosteronsynthese ausführlich diskutiert werden. Zum besseren Verständnis sind dazu in Abb. 4.2 die vom Enzym katalysierten Reaktionen und die dadurch entstehenden Produkte dargestellt.

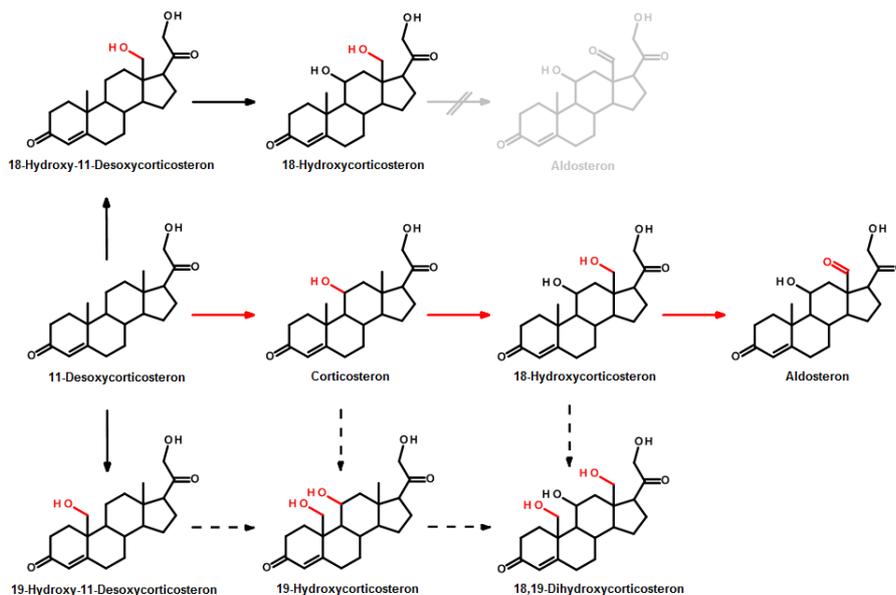


Abb. 4.2.: Katalysierte Reaktion der humanen Aldosteronsynthese *in vitro* ausgehend vom Substrat 11-Desoxycorticosteron. Die Pfeile kennzeichnen die Reaktionswege, durch die Modifikationen an verschiedenen Positionen des Steroidgerüsts katalysiert werden und so zur Entstehung der angegebenen Produkte führen. Der Hauptweg zur Bildung von Aldosteron ist durch rote Pfeile gekennzeichnet. Die gestrichelten Pfeile kennzeichnen Reaktionswege, die noch nicht geklärt sind, deren Produkte aber in dieser Arbeit identifiziert wurden.

Die humane Aldosteronsynthese setzt das Substrat 11-Desoxycorticosteron *in vitro* zu den bereits bekannten Intermediaten Corticosteron und 18-Hydroxycorticosteron, sowie letztlich zum Endprodukt Aldosteron um. Ein weiteres Intermediat/Produkt konnte mittels Referenzsubstanz durch HPLC- sowie GC-MS-Messungen als 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron identifiziert werden. Dieses Intermediat bildet einen nicht zu vernachlässigenden Teil des umgesetzten Substrates. Des Weiteren konnten geringe Mengen 19-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron gemessen werden. Die genannten Produkte konnten bereits bei der Expression des humanen Enzyms in Zellkulturen bestimmt werden (Kawamoto *et al.*, 1990a).

Zusätzlich lieferte die GC-MS-Analyse einen wichtigen Anhaltspunkt für die Bildung von 19-Hydroxycorticosteron. Im Gegensatz zur Aldosteronsynthese aus der Ratte (Nonaka und Okamoto, 1991), ist das humane Enzym in der Lage, 19-hydroxylierte Produkte zu bilden. Diese Fähigkeit wird durch die Ergebnisse der Docking-Studien untermauert, die C19 in einer favorisierten Position über dem Häm zeigen und so die Hydroxlierung ermöglicht, sowie durch die Berechnung der Wasserstoff-Abstraktionenthalpie. Aus diesen Gründen ist

auch ein weiteres Nebenprodukt, 18,19-Dihydroxycorticosteron, möglich, welches bereits im Urin von Patienten mit primärem Aldosteronismus nachgewiesen werden konnte (Godzsa *et al.*, 1989). Die 19-hydroxylierten Produkte spielen möglicherweise eine Rolle als Vorstufe der 19-Normineralocorticoide, wie z. B. 19-Nor-DOC, 19-Noraldoosteron, die sowohl eine Mineralocorticoid-Wirkung als auch eine hypertensinogene Aktivität besitzen und deshalb in Zusammenhang mit primärem Aldosteronismus stehen (Perrone *et al.*, 1981, Gorsline und Morris, 1985, Takeda *et al.*, 1990).

Um die Bildung des Aldosterons besser zu verstehen, wurde nicht nur 11-Desoxycorticosteron als Substrat eingesetzt, sondern auch die Intermediate der Reaktion. Corticosteron stellt ein schlechtes Substrat für die Aldosteronsynthese dar, da nur etwa 75 % umgesetzt werden, im Gegensatz zu 11-Desoxycorticosteron, das nahezu komplett umgesetzt wird. Dies ist vermutlich auf die schlechtere Bindung des Intermediates zurückzuführen, dessen K_D -Wert fast 50fach höher ist als der des eigentlichen Substrates.

Gleiches gilt für 18-Hydroxycorticosteron, bei dem eine noch schlechtere Bindung an das Enzym angenommen wird, da es selbst bei 1 mM (bei 2 μ M Enzym) keinen spektralen Shift induzieren konnte. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass beim Einsatz von 18-Hydroxycorticosteron als Substrat in einem 800fachen Überschuss keine Bildung von Aldosteron zu beobachten ist. Eine besonders interessante Feststellung konnte für 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron gemacht werden. Wird dieses Intermediat als Substrat eingesetzt, so wird durch die Aldosteronsynthese nur 18-Hydroxycorticosteron (durch 11 β -Hydroxylierung) gebildet, aber kein Aldosteron. Vermutlich kommt es zu einer Bildung eines zyklischen Hemiketals zwischen der OH-Gruppe am C18 und der Ketogruppe des C20 (Roy *et al.*, 1976), so dass die Oxidation am C18 zur Bildung von Aldosteron nicht stattfinden kann. Möglicherweise spielt diese Hemiketal-Bildung nur *in vitro* eine Rolle, da Umsätze von 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron mit humaner Aldosteronsynthese in Zellkulturen geringe, aber messbare Aldosteronmengen zeigten (Fisher *et al.*, 2001).

Die aus diesen Ergebnisse abgeleiteten Reaktionen, die von der humanen Aldosteronsynthese *in vitro* katalysiert werden, sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

Eine mögliche Feedback-Regulation der Aldosteronsynthese über die Intermediate oder das Endprodukte der Reaktion wurde durch die Zugabe dieser Substanzen zu einem Substratumsatz untersucht. Eine Endprodukt-Hemmung ist relativ unwahrscheinlich, da Aldosteron keine Einwirkung auf die Reaktionsschritte zeigt. Eine mögliche Regulation geschieht durch 18-Hydroxycorticosteron, das bei der Zugabe zu erhöhten Corticosteron-Werten führt, da dieses vermutlich durch das bereits vorhandene 18-Hydroxycorticosteron nicht weiterumgesetzt wird. Diese Auswirkung ist auch bei der Zugabe von 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron zu beobachten, da es dort zu erhöhten 18-Hydroxycorticosteron- und, damit verbunden, zu erhöhten Corticosteron-Werten kommt. Interessant ist hier, wie die mögliche Regulation durch

18-Hydroxycorticosteron realisiert wird, da es aufgrund der schlechten Bindung das aktive Zentrum nicht besetzen kann, um die weitere Bildung von Corticosteron zu hemmen.

Für die kinetische Analyse der humanen Aldosteronsynthese bezüglich der 11-Desoxycorticosteron-Umsetzung erfolgte die Berechnung der Produktbildung anhand des Substratverbrauchs, da nicht alle Produkte bekannt und quantifizierbar waren. Somit bezieht sich die Analyse der Reaktionsgeschwindigkeit auf die Hydroxylierung von 11-Desoxycorticosteron in 11 β -, 18- oder 19-Position. Die Auswertung nach Michaelis-Menten lieferte einen V_{max} von $237,95 \pm 8,25$ nmol Produkte/nmol hCYP11B2/min und $K_M = 103,4 \pm 8,25$ μ M. Der Vergleich mit anderen Cytochromen P450 fällt aufgrund der gewählten Reaktionsbedingungen relativ schwer. Im Vergleich zum humanen CYP11B1, weist das humane CYP11B2 eine stärkere Affinität zu 11-Desoxycorticosteron auf und setzt dieses auch wesentlich schneller um (Zöllner *et al.*, 2008). Gegen Ende dieser Arbeit wurde von Strushkevich *et al.* eine Untersuchung der humanen Aldosteronsynthese veröffentlicht, die unter anderem die enzymatische Aktivität des Enzyms beschreibt. Fraglich ist hierbei, ob die Aktivität anhand einer Kinetik bestimmt wurde, da keine K_M -Werte angegeben wurden. Eher wahrscheinlich ist, dass die Enzymaktivität aus einem Umsatz gemittelt wurde (Produkte pro Minute). Der V_{max} bezüglich 11-Desoxycorticosteron und der 11 β -Hydroxylierung lag dabei bei $37,6 \pm \text{min}^{-1}$, d. h. der Wert ist um etwa ein 6faches geringer als in der vorliegenden Arbeit (Strushkevich *et al.*, 2013). Dieser immense Unterschied ist sehr wahrscheinlich auf das Verhältnis der Redoxpartner, vor allem Adx, zurückzuführen. Das Verhältnis von CYP11B2:Adx:AdR betrug in der von Strushkevich durchgeführten Messung 1:8:2. Damit ist die Menge an Adx 5 mal geringer als in der Kinetik dieser Arbeit, bei der ein Verhältnis von 1:40:1 verwendet wurde und führt dadurch zu einer geringeren Aktivität der Aldosteronsynthese wie es bereits in Zellkulturen gezeigt wurde (Cao und Bernhardt, 1999).

Wie bereits erwähnt, wurde die Produktbildung über den Substratverbrauch berechnet, da nicht alle Produkte quantifiziert werden konnten. Mittlerweile kann jedoch 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron, das einen wichtigen Anteil an den gebildeten Produkten hat, anhand eines Referenzstandards quantifiziert werden. Somit können die kinetischen Parameter für die einzelnen Aktivitäten des CYP11B2 ungefähr bestimmt werden (unter Vernachlässigung einiger minderer Nebenprodukte) (Abb. 4.3 und Tab. 4.1). Für die Bestimmung einer Aktivität wurden die Mengen aller Produkte summiert, die durch die jeweilige Aktivität entstanden sind, d. h. für die 11 β -Hydroxylierung wurde Corticosteron, 18-Hydroxycorticosteron und Aldosteron summiert.

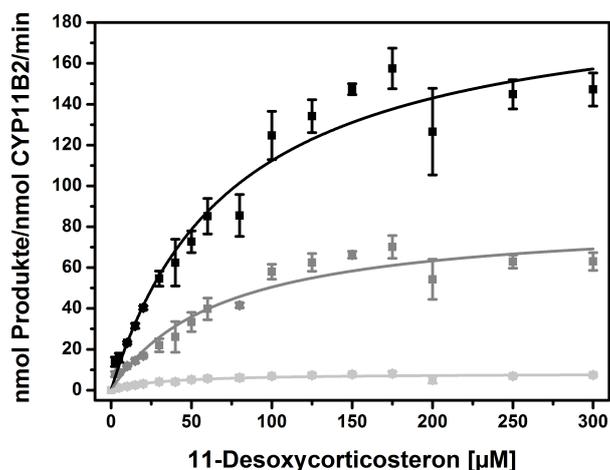


Abb. 4.3.: Kinetik der humanen CYP11B2-Aktivitäten. schwarz: 11 β -Hydroxylierung, dunkelgrau: 18-Hydroxylierung, hellgrau: 18-Oxidation.

Tab. 4.1.: Kinetische Parameter der einzelnen CYP11B2-Aktivitäten. Die Werte sind als apparente Werte angegeben, da die Bestimmung des V_{max} und K_M nach Michaelis-Menten für einzelne Aktivitäten nicht erlaubt ist.

Aktivität	$V_{max,app}$ [nmol Produkte/ nmol hCYP11B2/min]	$K_{M,app}$ [μ M]	R^2
11 β -Hydroxylierung	196,68 \pm 13,01	75,1 \pm 12,98	0,962
18-Hydroxylierung	84,89 \pm 6,48	68,29 \pm 14,05	0,945
18-Oxidation	8,26 \pm 0,49	31,06 \pm 6,7	0,924

Der Unterschied des $V_{max,app}$ der 11 β -Hydroxylierung zum V_{max} der allgemeinen Kinetik entsteht dadurch, dass 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron hier nicht in die Produktbildung eingeht. Die 18-Oxidation stellt die langsamste Reaktion dar, die durch eine geringe Bildung von Aldosteron gekennzeichnet ist.

4.4. Homologiemodell und Docking

Da die Kristallstruktur von CYP11B2 zu Beginn dieser Arbeit und während der experimentellen Phase nicht verfügbar war, wurde ein Homologie-Modell konstruiert, um ein Docking verschiedener Liganden durchführen zu können und so einen besseren Einblick in die Struktur-Funktionsbeziehung des Enzyms zu erhalten. Frühere Homologie-Modelle des humanen CYP11B2 wurden bereits von Belkina *et al.* (2001), Ulmschneider *et al.* (2005)

und Roumen *et al.* (2007) konstruiert. Als Template musste dabei auf CYP450-Strukturen zurückgegriffen werden, die zu dieser Zeit verfügbar waren. Aus diesem Grund wurden bei erstgenanntem Modell ausschließlich bakterielle Cytochrome P450 (CYP102 (*Bacillus megaterium*) und CYP108 (*Pseudomonas sp.*)) als Template für die Modellierung von CYP11B1 verwendet, auf dessen Struktur dann das Homologiemodell für CYP11B2 aufgebaut wurde. Damit wurden die Unterschiede zwischen CYP11B1 und CYP11B2 untersucht, die hauptsächlich auf die Orientierung des Häms und des Häm-bindenden Loops zurückzuführen sind (Belkina *et al.*, 2001). Das zweite Modell basiert auf der Struktur des humanen CYP2C9 und wurde zur Charakterisierung der Wechselwirkung neu entwickelter Inhibitoren mit dem Protein genutzt (Ulmschneider *et al.*, 2005a). Zuletzt wurde ein Hybrid-Template zwischen dem bakteriellen CYP101 (*Pseudomonas putida*) und dem mikrosomalen CYP2C5 (*Oryctolagus cuniculus*) konstruiert, mit dem Homologiemodelle von CYP11B1 und CYP11B2 entwickelt wurden. Diese Modelle dienen zur Durchführung von Dockingstudien und der Untersuchung der Ligandenbindung von Reaktionsintermediaten und Inhibitoren (Roumen *et al.*, 2007). Für die Homologiemodellierung in dieser Arbeit wurden Cytochrom P450-Strukturen aus Säugetieren auf ihre Eignung als Template getestet, da sie höhere Sequenzidentitäten zu CYP11B2 aufwiesen als die früheren Templates und es sich, wie bei CYP11B2, um Membranproteine handelt. Bei den getesteten Strukturen handelte es sich um humanes CYP7A1 (3DAX), CYP24A1 aus der Ratte (3K9V), sowie humanes CYP11A1 (3NA0). In den Modellen, die mit den beiden ersten Strukturen erhalten wurden, mussten sterische Konflikte des Häm gelöst werden, die durch F130 und W116 verursacht wurden. Darüberhinaus konnten keine geeigneten Aminosäurereste in der Nähe der Carboxylat-Gruppen des Häms gefunden werden, die mit diesen Wasserstoffbrückenbindungen eingehen, um deren negative Ladungen zu kompensieren.

Das humane CYP11A1, dessen Struktur erst 2011 veröffentlicht wurde, hat eine Sequenzidentität von 38 % mit humanem CYP11B2 und liegt damit als einziges über der *Twilight zone*. Das damit erstellte Homologiemodell zeigte keine sterischen Konflikte und die Carboxylat-Gruppen des Häms sind Teil eines komplexen Wasserstoffbrücken-Netzwerkes. Außerdem zeigt dieses Modell eine höhere stereochemische Qualität aufgrund der geeigneteren Template-Struktur als die vorherigen Modelle. Die Docking-Studien ergaben, dass sich das Substrat nach der 11 β -Hydroxylierung repositioniert und für die weiteren Reaktionsschritte in umgekehrter Richtung im aktiven Zentrum liegt. Diese Vorhersage ist sehr kritisch zu betrachten angesichts der Größe des aktiven Zentrums und der Tatsache, dass die Intermediate für die Bildung von Aldosteron im aktiven Zentrum verbleiben müssen.

Die Analyse der an der Bindung beteiligten Residuen ergab, dass die Liganden durch eine Reihe hydrophober Wechselwirkungen im aktiven Zentrum stabilisiert werden. Durch die Residuen V378, G379, L380, F381 und L382 entsteht eine hydrophobe Kavität, die gegenüber der Helix I liegt und die Liganden somit optimal über dem Häm plziert. Diese Residuen liegen zwischen Helix K und dem β -Faltblatt 1-4 und es ist davon auszugehen, dass diese Residuen

die SRS 5 der Aldosteronsynthese bilden. Zusätzlich werden die Liganden durch hydrophobe Interaktionen mit weiteren Residuen im aktiven Zentrum stabilisiert. Dazu zählen unter anderem die Aminosäurereste W116 und F130, die während des Dockings flexibel behandelt wurden, um sterische Konflikte mit dem Häm zu vermeiden. Um eine mögliche Funktion dieser Residuen bei der Elektronenübertragung zu untersuchen, wurden Mutationen eingeführt (W116F, W116Y und F130A) und deren Auswirkung auf den Substratumsatz und die Substratbindung analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die einzelnen Mutationen jeweils zum Verlust der 18-Oxidase-Funktion und einer drastisch reduzierten 18-Hydroxylase-Aktivität führen, wobei die 11 β -Hydroxylase-Funktion jedoch mit der des Wildtyps vergleichbar ist. Die dadurch verminderte Bildung von Aldosteron und 18-Hydroxycorticosteron durch die Mutanten wird vermutlich durch die schwächere Bindung des Substrates verursacht, die sich in einer etwa 5fach (W116F, W116Y) bzw. etwa 8fach (F130A) höheren Dissoziationskonstanten gegenüber dem Wildtyp-Enzym äußert. Die schlechtere Substratbindung ist vermutlich auf die Änderung der Seitenkettengröße (W116F, F130A) und auf den Verlust von hydrophoben Eigenschaften der Seitenkette (W116Y) zurückzuführen. Beide Aminosäuren sind in den verschiedenen CYP11B-Isoformen hochkonserviert (Abb. 4.4), so dass ihre Funktion im aktiven Zentrum zur Stabilisierung des Substrates vermutlich essentiell ist.

	116	130
	↓	↓
P19099 C11B2_HUMAN	LEP W VAYRQHRGHKCGV F LLNGPEWR	LEP W VAYRQHRGHKCGV F LLNGPEWR
P15538 C11B1_HUMAN	LEP W VAYRQHRGHKCGV F LLNGPEWR	LEP W VAYRQHRGHKCGV F LLNGPEWR
P15393 C11B1_RAT	LEP W VAHRELRLRRLRGV F LLNGADWR	LEP W VAHRELRLRRLRGV F LLNGADWR
P30099 C11B2_RAT	LEP W VAHRELRLRRLRGV F LLNGAEWR	LEP W VAHRELRLRRLRGV F LLNGAEWR
P15539 C11B2_MOUSE	LEP W VAHRELRLRRLRGV F LLNGPEWR	LEP W VAHRELRLRRLRGV F LLNGPEWR
P97720 C11B1_MESAU	LEP W VAHREHRLSRGV F LLNGPEWR	LEP W VAHREHRLSRGV F LLNGPEWR
Q64658 C11B2_MESAU	LEP W VAHREHRLSRGV F LLNGPEWR	LEP W VAHREHRLSRGV F LLNGPEWR
Q29527 C11B1_PAPHU	LEP W VAYRQHRGHKCGV F LLNGPEWR	LEP W VAYRQHRGHKCGV F LLNGPEWR
Q64408 C11B1_CAVPO	LEP W MAYREHRRQNLGV F LLNGPEWL	LEP W MAYREHRRQNLGV F LLNGPEWL
P15150 C11B1_BOVIN	LEP W LAYRQARGHKCGV F LLNGPQWR	LEP W LAYRQARGHKCGV F LLNGPQWR
Q29552 C11B1_PIG	PGP W LAYRHLRGHKCGV F LLNGPTWR	PGP W LAYRHLRGHKCGV F LLNGPTWR
P51663 C11B1_SHEEP	LEP W LAYRQARGHKCGV F LLNGPQWR	LEP W LAYRQARGHKCGV F LLNGPQWR
Q92104 CP11B_LITCT	ME A W S KHRELNRNHKQGV F LLNGEAWR	ME A W S KHRELNRNHKQGV F LLNGEAWR
	. * : * . *	***** *

Abb. 4.4.: Alignment der verschiedenen CYP11B-Formen im Bereich der Aminosäuren W116 und F130. human = Mensch, Rat = Ratte, Mouse = Maus, Mesau = Goldhamster, Paphu = Pavian, Cavpo = Meerschweinchen, Bovin = Rind, Pig = Schwein, Sheep = Schaf, Litct = Ochsenfrosch.

Die Seitenkette der Aminosäure T318 wurde während des Dockings ebenfalls flexibel behandelt, zeigte aber keine große Veränderung der Seitenkettenlage. Dieser Aminosäurerest spielt eine wichtige Rolle im aktiven Zentrum, obwohl er nicht direkt mit den Liganden interagiert. Es handelt es sich dabei um das absolut konservierte Threonin in der I-Helix, welches eine Rolle bei der Orientierung des Sauerstoffmoleküls über dem Häm spielt und den Protonentransfer während des Reaktionszykluses erleichtert (Meunier und Bernadou, 2000). Möglicherweise steht diese Funktion in Verbindung mit einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung, die die Seitenkette des T318 zum G314 im Homologiemodell ausbildet.

Diese Annahme wird bestärkt durch die Untersuchung einer Mutation, die bei einem Patienten mit CMO II Defizienz auftrat. Die Mutation T318M resultierte in einer drastisch verringerten Aktivität, die nur noch ein Viertel des Aldosterons produziert im Vergleich zum Wildtyp (Zhang *et al.*, 1995) und zeigt somit, dass dieses Threonin eine entscheidende Rolle für die Aldosteronsyntheseaktivität spielt.

Die Kristallstruktur der humanen Aldosteronsynthase wurde mit dem Substrat 11-Desoxycorticosteron und dem Inhibitor Fadrozol Anfang 2013 publiziert. Vergleicht man das in dieser Arbeit erstellte Homologie-Modell mit der Kristallstruktur durch Überlagerung, so liegt der größte Unterschied der Strukturen in einer Helix, die am N-Terminus des Proteins liegt und die Aminosäuren 49-59 umfasst. Die unterschiedliche Lage dieser A'-Helix ist möglicherweise auf ihre Beteiligung an der Ausbildung des Zugangskanals zum aktiven Zentrum zurückzuführen. In der Kristallstruktur, die in Anwesenheit des Substrates vermessen wurde, liegt die A'-Helix nahe der F- und G'-Helix und schließt damit den Zugang zum aktiven Zentrum. Im Homologie-Modell dreht sich die A'-Helix von Helix F und G' weg und bildet damit eine offene Konformation des Zugangskanals (Abb. 4.5). Damit wären im Fall der Aldosteronsynthese nicht nur die Helices F und G' an der Ausbildung des Substratzugangskanals beteiligt, sondern auch eine zusätzliche Helix in Form von A'.

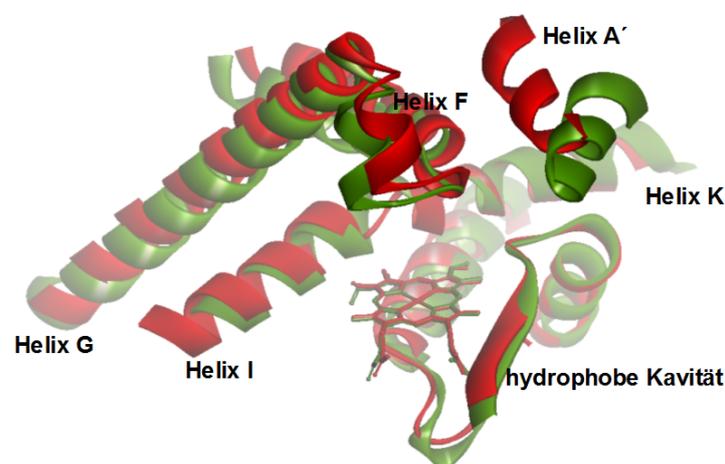


Abb. 4.5.: Vergleich der Lage der Helix A' in der Kristallstruktur und im Homologiemodell. Überlagerung des Modells (grün) und der Kristallstruktur (rot, PDB-Eintrag 3NA0) im Bereich des Substratzugangskanals, der durch die Helices F, G und A' gebildet wird.

Weitere Abweichungen zeigen sich in leichten Verschiebungen von Sekundärstrukturen und Loop-Bereichen. Die für die Reaktion des Enzyms wichtige Struktur um das aktive Zentrum und die Ausrichtung des Häms stimmen beim Homologiemodell und der tatsächlichen Struktur gut überein (Abb. 4.6). Lediglich das Häm liegt etwas versetzt und es gibt eine kleine Abweichung im Knick der I-Helix, der das oben genannte, konservierte Threonin enthält.

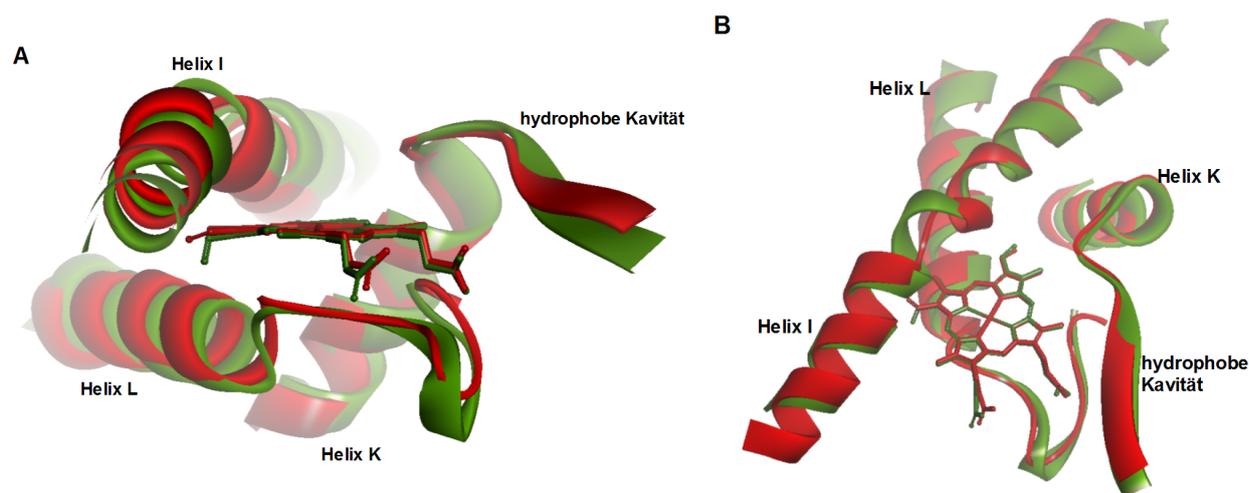


Abb. 4.6.: Vergleich der Kristallstruktur und des Homologiemodells. Überlagerung des Modells (grün) und der Kristallstruktur (rot, PDB-Eintrag 3NA0) im Bereich der Bindetasche zwischen Helix I und der hydrophoben Kavität und Helix K, sowie Helix L mit dem anschließenden Häm-bindenden Loop. Blick in das aktive Zentrum **A.** auf Häm-Ebene und **B.** Aufsicht auf das Häm.

Die humane Aldosteronsynthese wurde in Anwesenheit von 11-Desoxycorticosteron kristallisiert (Strushkevich *et al.*, 2013). Die Analyse der Substratbindung zeigt, dass die C21-Hydroxygruppe mit der Seitenkette des F381 eine Wasserstoffbrückenbindung bildet und die C3-Ketogruppe in Richtung der I-Helix gerichtet ist. Darüberhinaus gewährleisten die Seitenketten von W116, F130 und F487 die Positionierung über dem Häm, wodurch das Substrat in einem Winkel von etwa 60° zur Porphyrin-Ebene steht und die C18- und C19-Methylgruppe in Richtung des Häms zeigen. Damit stimmen die Ergebnisse des Dockings von 11-Desoxycorticosteron in das Homologie-Modell mit der tatsächlichen Bindung des Substrates in der Kristallstruktur sehr gut überein und unterstreichen die Qualität des erstellten Modells. Allerdings ist die Lage des 11-Desoxycorticosteron im Vergleich zum Modell mehr in Richtung der I-Helix verschoben (Abb. 4.7 A). Dadurch wird die C19-Methylgruppe nicht, wie im Modell, direkt über dem Häm-Eisen plaziert ($1,26 \text{ \AA}$), sondern liegt in der Nähe der G314-Seitenkette. Der Abstand zum Häm-Eisen ist zwar in der tatsächlichen Struktur auch für die C19-Methylgruppe mit 4 \AA am kürzesten (Fe-C11 $4,2 \text{ \AA}$, Fe-C18 $4,9 \text{ \AA}$), allerdings liegt sie durch die Nähe zu G314 in einer ungünstigen Lage für die Hydroxylierung. Basierend auf den Berechnungen für die Wasserstoffabstraktion, ist eine Hydroxylierung an Position C19 energetisch gesehen am ungünstigsten gegenüber einer Hydroxylierung an C11 oder C18. Damit lassen sich letztendlich auch die geringen Mengen an 19-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron im Substratumsatz erklären. Die Hydroxylierung des 11-Desoxycorticosterons findet somit an der kinetisch günstigeren C11-Position statt, wobei auch ein Teil des Substrates an C18 hydroxyliert wird, bestätigt durch die Anwesenheit des Produktes 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron (Strushkevich *et al.*, 2013).

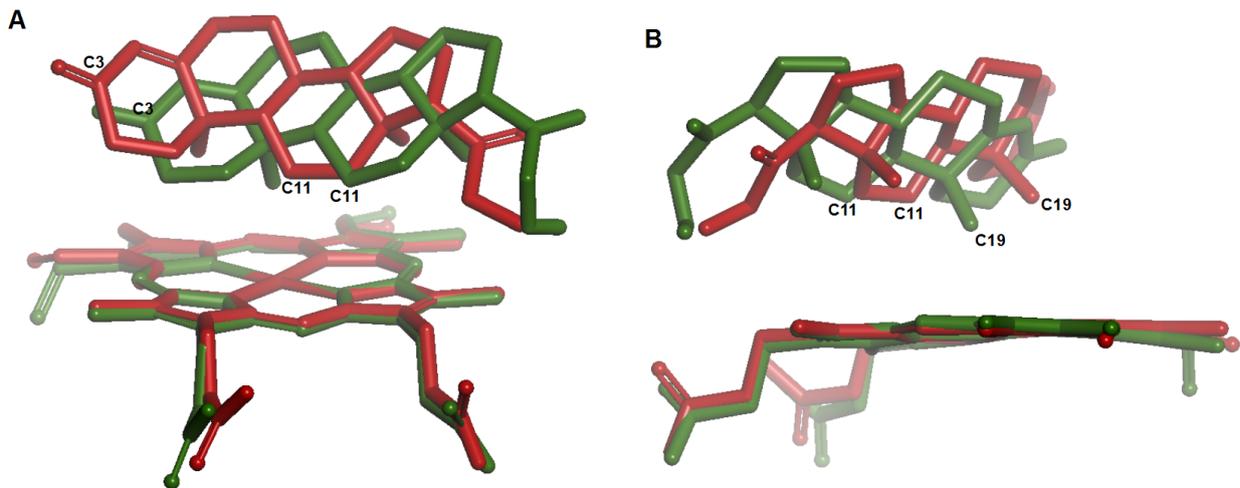


Abb. 4.7.: Vergleich der 11-Deoxycorticosteron-Position im aktiven Zentrum. Überlagerung der Position des 11-Deoxycorticosterons durch Docking in das Homologie-Modell (grün) und durch Kristallisation mit CYP11B2 (rot). **A.** Deutlich ist eine Verschiebung des 11-Deoxycorticosterons der Kristallstruktur nach links zu erkennen, wodurch das Substrat näher zur I-Helix liegt. **B.** Der Winkel von etwa 60° zur Häm-Ebene und die Positionierung der C19-Methylgruppe über dem Häm-Eisen in der Kristallstruktur bestätigen die erhaltene Dockingposition des Substrates im Homologie-Modell zur 11β -Hydroxylierung.

4.5. Potentielle Anwendungsmöglichkeiten des *in vitro*-Systems

Das *in vitro*-System der humanen Aldosteronsynthese, welches in dieser Arbeit etabliert wurde, kann nicht nur für die Untersuchung des Substratumsatzes und der Produktbildung des rekombinanten Enzyms unter verschiedenen Bedingungen verwendet werden, sondern es bietet auch eine Reihe weiterer Anwendungsmöglichkeiten, die in den nächsten Abschnitten vorgestellt werden sollen.

4.5.1. Untersuchung potentieller Inhibitoren

Die Entwicklung blutdrucksenkender Wirkstoffe schreitet weiter voran, da sich die Behandlung von Bluthochdruck trotz zahlreicher Wirkstoffe und Strategien bei vielen Patienten schwierig gestaltet (Unger *et al.*, 2011; Laurent *et al.*, 2012). Oftmals müssen mehrere Wirkstoffe kombiniert werden, um einen Effekt zu erzielen, wobei die Kombinationen auf die Begleiterkrankungen und speziellen Umstände der Patienten angepasst sein müssen. Blutdrucksenkende Wirkstoffe werden verschiedenen Klassen zugeordnet (ACE-Inhibitoren, AT1- und AT2-Rezeptorblocker, Aldosteron-Antagonisten, β -Blocker u.a.) und es befinden sich ständig neue Wirkstoffe in den verschiedenen Phasen der Entwicklung. Seit Mitte der 90er Jahre

wird die Aldosteronsynthase als Drug Target in Zusammenhang mit Bluthochdruck, Herzinsuffizienz und myokardialer Fibrose propagiert (Johnston *et al.*, 1995; Denner *et al.*, 1995b; Hartmann *et al.*, 2003), um die Aldosteronkonzentration zu verringern und Nebeneffekte, die über eine genomische bzw. nicht-genomische Wirkung des Aldosterons entstehen, zu vermeiden (Laurent *et al.*, 2012). Bisher wurde jedoch noch kein selektiver Inhibitor der Aldosteronsynthase zugelassen. LCI699 war der erste oral aktive Aldosteronsynthase-Inhibitor für die Behandlung von Bluthochdruck. Aufgrund von Auswirkungen auf die Cortisol-Biosynthese, möglicherweise verursacht durch die inhibitorische Wirkung der Substanz gegenüber der 11β -Hydroxylase, wurde die weitere Entwicklung des Wirkstoffs 2010 beendet, um spezifischere Inhibitoren zu finden (Unger *et al.*, 2011). Die Selektivität von Inhibitoren für die Aldosteronsynthase ist ein notwendiges Kriterium, um Auswirkungen auf die Biosynthese weiterer Steroidhormone, die durch ähnliche Cytochrome P450 entstehen, zu vermeiden. Dies gilt in besonderem Maße für die 11β -Hydroxylase, die zu 93 % identisch zur Aldosteronsynthase ist und die Bildung von Cortisol katalysiert.

In letzter Zeit wurden einige Aldosteronsynthase-Inhibitoren synthetisiert und auf ihre Aktivität und Selektivität hin untersucht. Dazu wurden in Kulturen von *S. pombe* sowie in Zellkulturen, die die 11β -Hydroxylase bzw. Aldosteronsynthase exprimieren, Substratumsätze in Anwesenheit des potentiellen Inhibitors durchgeführt und die Inhibition der Produktbildung analysiert. Die Untersuchung der Selektivität erfolgte in Zellkulturen gegenüber CYP11B1, CYP17 und CYP19 (Ulmschneider *et al.*, 2005a; Ulmschneider *et al.*, 2005b; Voets *et al.*, 2006).

In Zusammenhang mit der Entwicklung selektiver Inhibitoren bietet das in dieser Arbeit etablierte *in vitro*-System mit der humanen Aldosteronsynthase optimale Voraussetzungen für die Analyse ihrer Wirkung. Wie für die allgemeinen Cytochrom P450-Inhibitoren Miconazol und Ketoconazol gezeigt werden konnte, lässt sich die inhibitorische Wirkung einer Substanz auf die einzelnen Reaktionsschritte beobachten. Die Selektivität kann durch Substratumsätze mit der humanen 11β -Hydroxylase, die ebenfalls in diesem System eingesetzt werden kann, untersucht werden. Zusätzlich kann die Bindungsstärke von Inhibitoren bezüglich der humanen Aldosteronsynthase anhand von Differenzspektroskopie mit dem gereinigten Enzym bestimmt werden. Diese geschieht durch die Titration des Proteins mit steigenden Mengen der Substanz und der Bestimmung der Dissoziationskonstanten, wie es für Miconazol und Ketoconazol gezeigt wurde. Die Bestimmung der Bindungsstärke eines Inhibitors anhand der spektralen Änderung ist in ganzen Zellen nicht möglich und trägt somit zur weiteren Charakterisierung der Substanzen bei.

Des Weiteren zeigte die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Miconazol und Ketoconazol im *in vitro*-Umsatz zum ersten Mal, dass sich die Inhibition auf die einzelnen Enzymaktivitäten der Aldosteronsynthase auswirkt. Dabei wird mit steigender Inhibitor-konzentration zunächst die 18-Oxidase-, dann die 18-Hydroxylase- und schließlich die 11-Hydroxylase-Funktion des Enzyms inhibiert. Eine weiterführende Untersuchung dieses Me-

chanismus kann von großer Bedeutung für die Entwicklung von Inhibitoren sein.

Im Fall des Aldosteron-Antagonisten Spironolacton sind ebenfalls weitere Untersuchungen wünschenswert. Spironolacton zeigte einen Typ I-*Shift* des Enzyms und wurde vom Enzym umgesetzt. Hierdurch stellt sich nun die Frage, ob die Blockade des Mineralocorticoid-Rezeptors von Spironolacton selbst oder von einem der daraus gebildeten Produkte verursacht wird.

Damit bietet das *in vitro*-System entscheidende Vorteile gegenüber den Zellkulturexperimenten, die durch eine einfachere Handhabung und schnellere Durchführung gekennzeichnet sind. Im Gegensatz zu den Substratumsätzen in Zellkulturen, erfolgt die Analyse der Enzymaktivität in Anwesenheit eines möglichen Inhibitors direkt auf Proteinebene. Somit kann die Inhibitor-Wirkung in Abhängigkeit von definierten Enzym- und Substratkonzentrationen untersucht werden, ohne den Einfluss verschiedener Parameter wie sie normalerweise in einem Substratumsatz im Zellkulturen auftreten (Expressionslevel des Proteins, Substrataufnahme der Zellen) berücksichtigen zu müssen. In Kombination mit dem Screening-System in *S. pombe* (Hakki *et al.*, 2011) könnte die Anwendung der gereinigten Aldosteronsynthase in Substratumsätzen und Bindungsstudien zur Entwicklung und Verbesserung selektiver Inhibitoren beitragen.

4.5.2. Funktionelle Analyse von Enzymvarianten

Ein weitere Anwendungsmöglichkeit der gereinigten Aldosteronsynthase besteht in der Analyse möglicher Enzymvarianten, die bei Patienten mit einem Defekt dieses Enzyms vorliegen. Die Aldosteronsynthase-Defizienz ist unterteilt in Typ I und II und wird aus historischen Gründen auch als Corticosteron-Methyloxidase Defizienz (CMO I und CMO II) bezeichnet. Die Defizienz wirkt sich auf die beiden letzten Reaktionsschritte der Aldosteronsynthese aus, entweder auf die 18-Hydroxylase- oder die 18-Oxidase-Aktivität des Enzyms. In beiden Fällen ist der Aldosteronlevel im Blutplasma der betroffenen Patienten sehr niedrig oder sogar nicht messbar, wobei die Vorläufer der Aldosteronsynthese, 11-Desoxycorticosteron und Corticosteron aufgrund der Enzymblockade und des dadurch verursachten Rückstaus erhöht sind. Zur Unterscheidung der Typ I und II Defizienz dient der Plasmalevel des 18-Hydroxycorticosterons, der bei Typ I niedrig bis normal und bei Typ II drastisch erhöht ist (Ulick *et al.*, 1992; Shizuta *et al.*, 1995; Peter *et al.*, 1999).

Mehrere CYP11B2-Varianten, die in Zusammenhang mit einer CMO-Defizienz stehen, wurden bereits in der Literatur beschrieben, wobei deren Auswirkung auf die Aldosteronsynthese in Zellkulturen untersucht wurde (Pascoe *et al.*, 1992; Portrat-Doyen *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 2010). Die Expression der Aldosteronsynthase und Analyse der Biotransformation mit dem rekombinanten Enzym wird jedoch erschwert durch das Vorhandensein eines en-

dogenen CYPoms der verwendeten Säugerzellen. Die heterologe Expression der Mutanten in *S. pombe* ermöglicht eine günstige und schnelle Untersuchung der enzymatischen Aktivität der CYP11B2-Varianten. Die Spalthefe besitzt keine eigenen Steroidhydroxylasen und mitochondrialen Cytochrome P450, die die Substratumsetzung beeinflussen, aber sie verfügt über ein endogenes Redoxsystem, welches für den Substratumumsatz mit heterolog exprimiertem CYP11B2 genutzt werden kann (Bureik *et al.*, 2002; Tin *et al.*, 2011). Damit kann die enzymatische Aktivität zwar ohne aufwendige Reinigung der Mutanten erfolgen, allerdings ist eine Untersuchung mit definierten Enzymkonzentrationen und die Analyse auf molekularer Ebene nicht möglich. Eine Charakterisierung verschiedener Mutanten, die bei Patienten mit CMO-Defizienz identifiziert wurden, erfolgte durch Herrn Jens Neunzig im Rahmen einer Diplomarbeit. Dabei wurden die Mutationen durch ortsgerichtete Mutagenese in die Wildtyp-Sequenz der humanen Aldosteronsynthase eingeführt und die Mutanten anschließend in *E. coli* exprimiert und gereinigt, wie es bereits für das Wildtyp-Protein gezeigt wurde. Anschließend wurden für die gereinigten Mutanten die Dissoziationskonstanten bezüglich des Substrates 11-Desoxycorticosteron ermittelt und die Produktbildung in *in vitro*-Umsätzen analysiert (Neunzig, 2009). Damit konnten die Auswirkungen der Mutationen auf die verschiedenen Reaktionsschritte der Aldosteronsynthese untersucht werden und tragen somit zur Charakterisierung der Mutationen auf molekularer Ebene bei.

Die Analyse weiterer Mutanten ist hier wünschenswert, da insbesondere Varianten der Aldosteronsynthase bekannt sind, die erst in Kombination mit weiteren Mutationen des Enzyms einen Einfluss auf die Aldosteronsynthese ausüben.

4.6. Ausblick

Für die humane Aldosteronsynthase wurde in dieser Arbeit ein rekonstituiertes *in vitro*-System mit den humanen Redoxpartnern Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase etabliert, mit dem die Produktbildung ausgehend vom Substrat 11-Desoxycorticosteron untersucht wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass verschiedene Faktoren des Systems (z. B. pH-Wert des Reaktionspuffers, Dauer des Umsatzes) sich auf das Produktmuster auswirken. Für die weitere Untersuchung der Aldosteronsynthese wurden Parameter gewählt, die mögliche Veränderungen im Produktmuster aufgrund verschiedener Einflüsse auf die unterschiedlichen Reaktionsschritte erlaubt. Dies spielt insbesondere bei der Analyse der in geringem Maße produzierten Mengen von Aldosteron und 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron eine Rolle.

Das Produktmuster der humanen Aldosteronsynthase wurde unter Einfluss der Reaktionsintermediate analysiert, um eine mögliche Feedback-Regulation der Aldosteronbildung nachzuweisen. Einzig 18-Hydroxycorticosteron stellt einen möglichen Regulator dar. Jedoch kann

te die Untersuchung aus Mangel an diesem Intermediat als Reinsubstanz nicht detailliert untersucht werden. Das Intermediat wurde maximal in einem Verhältnis von 1:1 zum Substrat 11-Desoxycorticosteron eingesetzt. Da der Plasmalevel von 18-Hydroxycorticosteron gegenüber 11-Desoxycorticosteron jedoch höher ist (Krone, 2005) und zudem die Bindung von 18-Hydroxycorticosterone schwächer im Vergleich zum Substrat, wäre eine detaillierte Untersuchung der Aldosteronbildung in Abhängigkeit von der 18-Hydroxycorticosteron-Konzentration wünschenswert. Dies könnte einen entscheidenden Hinweis auf die Regulation der Aldosteronsynthese durch das Intermediat liefern.

Die Analyse der Produkte der *in vitro*-Umsätze von 11-Desoxycorticosteron mit CYP11B2 lieferte einen Anhaltspunkt für die Entstehung 19-hydroxylierter Produkte. Welchen Einfluss diese Nebenprodukte auf die Aldosteronsynthese haben, bleibt zu klären. In einem einmalig durchgeführten Umsatz von 11-Desoxycorticosteron mit CYP11B2 konnte durch die Zugabe von 19-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron eine verminderte 18-Hydroxycorticosteron- und Aldosteronbildung beobachtet werden. Dabei wurde aber der Anstieg eines anderen Peaks beobachtet, bei dem es sich, entsprechend der GC-MS-Analyse, vermutlich um 19-Hydroxycorticosteron handelt (Abb. 4.8). Damit wäre zu klären, ob die verminderte Endproduktbildung auf einer stärkeren Bindung des Nebenproduktes beruht. Auch im Falle des 19-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron konnten aus Mangel an verfügbarer Substanz keine weiteren Studien durchgeführt werden.

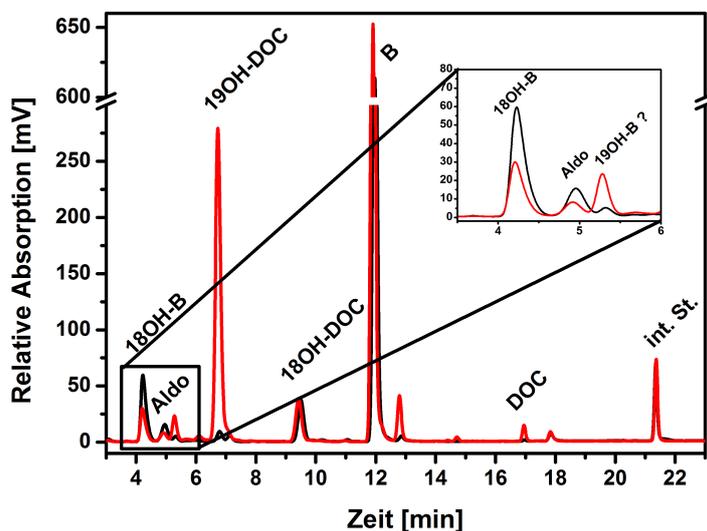


Abb. 4.8.: Vergleich des Umsatzes von 11-Desoxycorticosteron durch humanes CYP11B2 (schwarz) und des Umsatzes in Anwesenheit des Nebenproduktes 19-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron (rot).

Eine weitere wichtige Rolle bei der Regulation der Aldosteronsynthese übernimmt möglicherweise Adrenodoxin. Für die Steroidhormonbiosynthese in der Nebennierenrinde sind drei Cytochrome P450 in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert: CYP11A1, CYP11B1 und CYP11B2. Dabei findet eine räumliche Trennung der Glucocorticoid- und Mineralocorticoid-

synthese in den verschiedenen Schichten des adrenalen Cortex statt, indem CYP11B1 in der *Zona reticularis* und *Zona fasciculata* exprimiert wird und CYP11B2 in der *Zona glomerulosa*. Das CYP11A1, welches den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Steroidhormonbiosynthese katalysiert, wird dagegen in allen drei Zonen exprimiert (Bernhardt und Waterman, 2007). Die Versorgung der für die Katalyse der Cytochrom P450-Reaktionen notwendigen Elektronen übernimmt in allen drei Fällen das Adrenodoxin, welches die Elektronen von der Adrenodoxin-Reduktase auf die Cytochrome P450 verteilt (Abb. 4.9). Dabei ist die Lokalisierung des humanen Adrenodoxins in der Nebenniere bisher nicht untersucht worden. In bovinen Nebennieren konnte Adrenodoxin überwiegend in der *Zona reticularis* und *Zona fasciculata* detektiert werden, während in der *Zona glomerulosa* nur wenig Adrenodoxin lokalisiert ist (Ichikawa *et al.*, 1978; Mitani *et al.*, 1979).

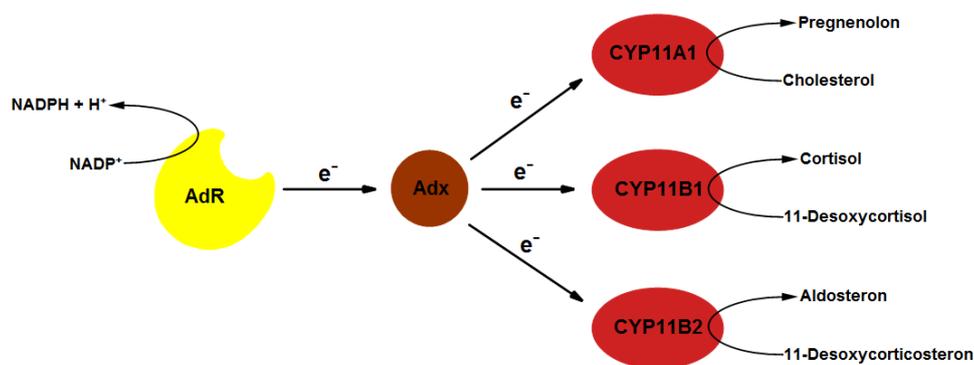


Abb. 4.9.: Mitochondriales Steroidhydroxylase-System. Adrenodoxin ist verantwortlich für die Elektronenübertragung von der Adrenodoxin-Reduktase auf die drei mitochondrialen Cytochrome P450 11A1, 11B1 und 11B2 (nach Hakki und Bernhardt, 2006).

Die Aldosteronsynthese zeigte in den *in vitro*-Umsätzen eine Abhängigkeit gegenüber der Adrenodoxin-Konzentration, die in einer höheren Aldosteronbildung resultiert, je mehr Elektronen geliefert werden. Damit besteht eine mögliche Regulation der Aldosteronsynthese *in vivo* durch eine kontrollierte Versorgung mit Elektronen durch unterschiedliche Mengen des Adrenodoxins in der *Zona glomerulosa*. Zusätzlich kommt es durch die Lokalisierung des CYP11A1 in der *Zona glomerulosa* zu einem Konkurrenzkampf um die Interaktion mit Adrenodoxin und damit um die Versorgung mit Elektronen (Cao und Bernhardt, 1999). Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Adrenodoxin und CYP11A1 bzw. CYP11B2 könnte zu einem besseren Verständnis dieses möglichen Regulationsweges führen. Deshalb wäre ein nächster Schritt bei der Charakterisierung der humanen Aldosteronsynthese die Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationsraten des Adx zu CYP11B2 mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR, *surface plasmon resonance*).

Abschließend ist zu sagen, dass in dieser Arbeit eine umfangreiche Analyse der enzymatischen Aktivität der humanen Aldosteronsynthase durchgeführt wurde. Hervorzuheben ist hierbei die Tatsache, dass es einen starken Zusammenhang zwischen dem Umsatz des Substrates zur Bildung von Aldosteron und der Stärke der Bindung des Substrates bzw. der Intermediate gibt. Die Analyse der modellierten Struktur, basierend auf der Struktur eines mitochondrialen Cytochroms P450, und der Dockingstudien verschiedener Liganden führte zur Identifizierung essentieller Aminosäurereste für die Substratbindung im aktiven Zentrum. Für die Reinigung der humanen Aldosteronsynthase konnte die heterologe Expression in *E. coli* deutlich erhöht werden. Damit stehen ausreichende Mengen gereinigten Proteins zur Verfügung, die zur Validierung von potentiellen Inhibitoren im *in vitro*-Umsatz oder zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten eingesetzt werden können.

Referenzen

- Amar, L., Azizi, M., Menard, J., Peyrard, S., Watson, C., und Plouin, P.-F. (2010). Aldosterone synthase inhibition with LCI699: a proof-of-concept study in patients with primary aldosteronism. *Hypertension*, 56(5), 831–838.
- Anderko, S. (2012). Untersuchungen zur biotechnologischen Anwendung der humanen Cytochrome CYP11B1 und CYP11B2 im rekombinanten Ganzzellensystem als Biokatalysatoren und als Screeningsystem für die molekulare Evolution. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Annalora, A. J., Goodin, D. B., Hong, W.-X., Zhang, Q., Johnson, E. F., und Stout, C. D. (2010). Crystal Structure of CYP24A1, a Mitochondrial Cytochrome P450 Involved in Vitamin D Metabolism. *Journal of Molecular Biology*, 396(2), 441–451.
- Aragones, A., Gros, E. G., Lantos, C. P., und Locascio, G. A. (1978). Less polar forms and derivatives of 18 hydroxy-corticosterone. *Journal of Steroid Biochemistry*, 9(2), 175–180.
- Arase, M., Waterman, M. R., und Kagawa, N. (2006). Purification and characterization of bovine steroid 21-hydroxylase (P450c21) efficiently expressed in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(1), 400–405.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., und Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2), 195–201.
- Arriza, J. L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T. M., Handelin, B. L., Housman, D. E., und Evans, R. M. (1987). Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, 237(4812), 268–275.
- Azizi, M., Amar, L., und Menard, J. (2013). Aldosterone synthase inhibition in humans. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(1), 36–43.
- Bassett, M. H., Suzuki, T., Sasano, H., White, P. C., und Rainey, W. E. (2004). The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. *Molecular Endocrinology*, 18(2), 279–290.
- Beilke, D., Weiss, R., Löhr, F., Pristovsek, P., Hannemann, F., Bernhardt, R., und Rüterjans,

- H. (2002). A new electron transport mechanism in mitochondrial steroid hydroxylase systems based on structural changes upon the reduction of adrenodoxin. *Biochemistry*, 41(25), 7969–7978.
- Belkina, N. V., Lisurek, M., Ivanov, A. S., und Bernhardt, R. (2001). Modelling of three-dimensional structures of cytochromes P450 11B1 and 11B2. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 87(4), 197–207.
- Berg, J. M., Stryer, L., und Tymoczko, J. L. (2003). *Biochemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 5. edition.
- Bernhardt, R. (1996). Cytochrome P450: Structure, function, and generation of reactive oxygen species. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (pp. 137–221). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.
- Bernhardt, R. (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology*, 124(1), 128–145.
- Bernhardt, R. und Waterman, M. R. (2007). Cytochrome P450 and Steroid Hormone Biosynthesis. In A. Sigel, H. Sigel, und R. K. O. Sigel (Eds.), *The Ubiquitous Roles of Cytochrome P450 Proteins* (pp. 361–396). Chichester and UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Boon, W. C., Roche, P. J., Butkus, A., McDougall, J. G., Jeyaseelan, K., und Coghlan, J. P. (1997). Functional and expression analysis of ovine steroid 11 β -hydroxylase (cytochrome P450_{11 β}). *Endocrine Research*, 23(4), 325–347.
- Böttner, B., Schrauber, H., und Bernhardt, R. (1996). Engineering a mineralocorticoid-to a glucocorticoid-synthesizing cytochrome P450. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(14), 8028–8033.
- Brandt, M. E. und Vickery, L. E. (1992). Expression and characterization of human mitochondrial ferredoxin reductase in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 294(2), 735–740.
- Brilla, C. G. (2000). Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz*, 25(3), 299–306.
- Bülow, H. E. und Bernhardt, R. (2002). Analyses of the *CYP11B* gene family in the guinea pig suggest the existence of a primordial *CYP11B* gene with aldosterone synthase activity. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 269(15), 3838–3846.
- Bureik, M., Hübel, K., Dragan, C.-A., Scher, J., Becker, H., Lenz, N., und Bernhardt, R. (2004). Development of test systems for the discovery of selective human aldosterone synthase (CYP11B2) and 11 β -hydroxylase (CYP11B1) inhibitors. Discovery of a new lead

- compound for the therapy of congestive heart failure, myocardial fibrosis and hypertension. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 217(1-2), 249–254.
- Bureik, M., Schiffler, B., Hiraoka, Y., Vogel, F., und Bernhardt, R. (2002). Functional Expression of Human Mitochondrial CYP11B2 in Fission Yeast and Identification of a New Internal Electron Transfer Protein, etp1. *Biochemistry*, 41(7), 2311–2321.
- Cao, P. R. und Bernhardt, R. (1999). Interaction of CYP11B1 (cytochrome P-450_{11β}) with CYP11A1 (cytochrome P-450_{scc}) in COS-1 cells. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 262(3), 720–726.
- Chen, C.-K., Leung, S. S. F., Guilbert, C., Jacobson, M. P., McKerrow, J. H., Podust, L. M., und Geary, T. G. (2010). Structural Characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* Bound to the Antifungal Drugs Posaconazole and Fluconazole. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(4), e651.
- Coghlan, V. M. und Vickery, L. E. (1989). Expression of human ferredoxin and assembly of the [2Fe-2S] center in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(3), 835–839.
- Cojocaru, V., Winn, P. J., und Wade, R. C. (2007). The ins and outs of cytochrome P450s. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770(3), 390–401.
- Connell, J. M. C. (2005). The new biology of aldosterone. *Journal of Endocrinology*, 186(1), 1–20.
- Connell, J. M. C., MacKenzie, S. M., Freel, E. M., Fraser, R., und Davies, E. (2007). A Lifetime of Aldosterone Excess: Long-Term Consequences of Altered Regulation of Aldosterone Production for Cardiovascular Function. *Endocrine Reviews*, 29(2), 133–154.
- Degtyarenko, K. N. und Archakov, A. I. (1993). Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS Letters*, 332(1-2), 1–8.
- Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., und Schlichting, I. (2005). Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical Reviews*, 105(6), 2253–2277.
- Denisov, I. G., Shih, A. Y., und Sligar, S. G. (2012). Structural differences between soluble and membrane bound cytochrome P450s. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 108, 150–158.
- Denner, K. und Bernhardt, R. (1998). Inhibition Studies of steroid conversions mediated by human CYP11B1 and CYP11B2 expressed in cell culture. In Y. Ishimura, H. Shimada, und M. Suematsu (Eds.), *Oxygen homeostasis and its dynamics* (pp. 231–236). Tokyo and New York: Springer.

- Denner, K., Doehmer, J., und Bernhardt, R. (1995a). Cloning of CYP11B1 and CYP11B2 from normal human adrenal and their functional expression in COS-7 and V79 Chinese hamster cells. *Endocrine Research*, 21(1-2), 443–448.
- Denner, K., Vogel, R., Schmalix, W., Doehmer, J., und Bernhardt, R. (1995b). Cloning and stable expression of the human mitochondrial cytochrome P45011B1 cDNA in V79 Chinese hamster cells and their application for testing of potential inhibitors. *Pharmacogenetics*, 5(2), 89–96.
- DeVore, N. M. und Scott, E. E. (2012). Structures of cytochrome P450 17A1 with prostate cancer drugs abiraterone and TOK-001. *Nature*, 482(7383), 116–119.
- Domalik, L. J., Chaplin, D. D., Kirkman, M. S., Wu, R. C., Liu, W. W., Howard, T. A., Seldin, M. F., und Parker, K. L. (1991). Different isozymes of mouse 11 β -hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. *Molecular Endocrinology*, 5(12), 1853–1861.
- Dooley, R., Harvey, B. J., und Thomas, W. (2012). Non-genomic actions of aldosterone: From receptors and signals to membrane targets. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 350(2), 223–234.
- Ehmer, P. B., Bureik, M., Bernhardt, R., Müller, U., und Hartmann, R. W. (2002). Development of a test system for inhibitors of human aldosterone synthase (CYP11B2): screening in fission yeast and evaluation of selectivity in V79 cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 81(2), 173–179.
- Estabrook, R. W., Cooper, D. Y., und Rosenthal, O. (1963). The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochemische Zeitschrift*, 338, 741–755.
- Ewen, K. M., Kleser, M., und Bernhardt, R. (2011). Adrenodoxin: The archetype of vertebrate-type [2Fe–2S] cluster ferredoxins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1814(1), 111–125.
- Fagard, R. H. (2011). Resistant hypertension. *Heart*, 98(3), 254–261.
- Fisher, A., Friel, E. C., Bernhardt, R., Gomez-Sanchez, C., Connell, J. M., Fraser, R., und Davies, E. (2001). Effects of 18-hydroxylated steroids on corticosteroid production by human aldosterone synthase and 11 β -hydroxylase. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(9), 4326–4329.
- Frenkel, L. und Bremer, H. (1986). Increased amplification of plasmids pBR322 and pBR327 by low concentrations of chloramphenicol. *DNA*, 5(6), 539–544.

- Funder, J. W., Pearce, P. T., Smith, R., und Smith, A. I. (1988). Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*, 242(4878), 583–585.
- Garfinkel, D. (1958). Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 77(2), 493–509.
- Gekle, M. und Grossmann, C. (2009). Actions of aldosterone in the cardiovascular system: the good, the bad, and the ugly? *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 458(2), 231–246.
- Ghosh, D., Griswold, J., Erman, M., und Pangborn, W. (2009). Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature*, 457(7226), 219–223.
- Godzsa, J., Vecsei, P., Iwuanyanwu, T., und Harnik, M. (1989). 18, 19-Dihydroxycorticosterone: a new metabolite in human urine. *Endocrine Research*, 15(1-2), 151–157.
- Gopalakrishnan, K., Sowmiya, G., Sheik, S. S., und Sekar, K. (2007). Ramachandran plot on the web (2.0). *Protein and Peptide Letters*, 14(7), 669–671.
- Gorsline, J. und Morris, D. J. (1985). The hypertensinogenic activity of 19-nor-deoxycorticosterone in the adrenalectomized spontaneously hypertensive rat. *Journal of Steroid Biochemistry*, 23(4), 535–536.
- Gotoh, O. (1992). Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(1), 83–90.
- Grinberg, A. V., Hannemann, F., Schiffler, B., Müller, J., Heinemann, U., und Bernhardt, R. (2000). Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins*, 40(4), 590–612.
- Hakki, T. und Bernhardt, R. (2006). CYP17- and CYP11B-dependent steroid hydroxylases as drug development targets. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(1), 27–52.
- Hakki, T., Hübel, K., Waldmann, H., und Bernhardt, R. (2011). The development of a whole-cell based medium throughput screening system for the discovery of human aldosterone synthase (CYP11B2) inhibitors: old drugs disclose new applications for the therapy of congestive heart failure, myocardial fibrosis and hypertension. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125(1-2), 120–128.
- Hanahan, D. (1985). In D. M. Glover (Ed.), *DNA cloning. Volume 1, A practical approach* (pp. 109–135). Oxford: IRL Press.
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M., und Bernhardt, R. (2007). Cytochrome P450

- systems–biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770(3), 330–344.
- Hanukoglu, I., Privalle, C. T., und Jefcoate, C. R. (1981). Mechanisms of ionic activation of adrenal mitochondrial cytochromes P-450_{sc} and P-450_{11β}. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(9), 4329–4335.
- Hara, T. und Takeshima, M. (1994). Conclusive evidence of a quaternary cluster model for cholesterol side chain cleavage reaction catalyzed by cytochrome P450_{sc}. In M. C. Lechner (Ed.), *Cytochrome P450* (pp. 417–420). Montrouge and France: John Libbey Eurotext.
- Harper, J., Easton, C., und Lincoln, S. (2000). Cyclodextrins to Increase the Utility of Enzymes in Organic Synthesis. *Current Organic Chemistry*, 4(4), 429–454.
- Hartmann, R. W., Müller, U., und Ehmer, P. B. (2003). Discovery of selective CYP11B2 (aldosterone synthase) inhibitors for the therapy of congestive heart failure and myocardial fibrosis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38(4), 363–366.
- Hasler, J. A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, C., Falck, J. R., Farrell, G., Kaminsky, L. S., Spivack, S. D., Boitier, E., und Beaune, P. (1999). Human cytochromes P450. *Molecular Aspects of Medicine*, 20(1-2), 1–137.
- Hayaishi, O. und Nozaki, M. (1969). Nature and mechanisms of oxygenases. *Science*, 164(3878), 389–396.
- Hobler, A. (2008). Human Aldosterone Synthase (CYP11B2): Expression in *E. coli*, Purification and Functional Characterization. Masterarbeit, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Hobler, A., Kagawa, N., Hutter, M. C., Hartmann, M. F., Wudy, S. A., Hannemann, F., und Bernhardt, R. (2012). Human aldosterone synthase: Recombinant expression in *E. coli* and purification enables a detailed biochemical analysis of the protein on the molecular level. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 132(1-2), 57–65.
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., und Goodsell, D. S. (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, 28(6), 1145–1152.
- Hypercube Inc. (1999). HyperChem, version 6.02.
- Ichikawa, Y., Ichikawa, M., Ishigami, S., Hiwatashi, A., und Okuno, T. (1978). Localization of cytochrome P-450-linked mixed function oxidase and steroid hydroxylations within zones of bovine adrenocortices. *Biochimica et Biophysica Acta*, 529(2), 263–269.

- Imai, T., Yamazaki, T., und Kominami, S. (1998). Kinetic studies on bovine cytochrome p450_{11 β} catalyzing successive reactions from deoxycorticosterone to aldosterone. *Biochemistry*, 37(22), 8097–8104.
- Inoue, H., Nojima, H., und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28.
- Jefcoate, C. R. (1978). Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy. *Methods in Enzymology*, 52, 258–279.
- Johnston, J. O., Wright, C. L., und Holbert, G. W. (1995). Enzyme-activated inhibitors of steroidal hydroxylases. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 52(1), 17–34.
- Kagawa, N. (2011). Efficient expression of human aromatase (CYP19) in *E. coli*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 705, 109–122.
- Kagawa, N., Hori, H., Waterman, M. R., und Yoshioka, S. (2004). Characterization of stable human aromatase expressed in *E. coli*. *Steroids*, 69(4), 235–243.
- Kawamoto, T., Mitsuuchi, Y., Ohnishi, T., Ichikawa, Y., Yokoyama, Y., Sumimoto, H., Toda, K., Miyahara, K., Kuribayashi, I., und Nakao, K. (1990a). Cloning and expression of a cDNA for human cytochrome P-450aldo as related to primary aldosteronism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173(1), 309–316.
- Kawamoto, T., Mitsuuchi, Y., Toda, K., Miyahara, K., Yokoyama, Y., Nakao, K., Hosoda, K., Yamamoto, Y., Imura, H., und Shizuta, Y. (1990b). Cloning of cDNA and genomic DNA for human cytochrome P-450_{11 β} . *FEBS Letters*, 269(2), 345–349.
- Kido, T. und Kimura, T. (1979). The formation of binary and ternary complexes of cytochrome P-450_{sec} with adrenodoxin and adrenodoxin reductase•adrenodoxin complex. The implication in ACTH function. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(23), 11806–11815.
- Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L., und Schwede, T. (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), D387–92.
- Kim, J. und Hoppel, C. L. (2013). Comprehensive approach to the quantitative analysis of mitochondrial phospholipids by HPLC–MS. *Journal of Chromatography B*, 912, 105–114.
- Kleine, B. und Rossmannith, W. (2009). *Hormone und Hormonsystem: Lehrbuch der Endokrinologie*. Springer.

- Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75(2), 376–386.
- Krone, N. (2005). Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 11-Hydroxylase Deficiency: Functional Characterization of Two Novel Point Mutations and a Three-Base Pair Deletion in the *CYP11B1* Gene. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(6), 3724–3730.
- Krone, N., Dhir, V., Ivison, H. E., und Arlt, W. (2007). Congenital adrenal hyperplasia and P450 oxidoreductase deficiency. *Clinical Endocrinology*, 66(2).
- Lambeth, J. D., Seybert, D. W., Lancaster, J. R., Salerno, J. C., und Kamin, H. (1982). Steroidogenic electron transport in adrenal cortex mitochondria. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 45(1), 13–31.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., und Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948.
- Laurent, S., Schlaich, M., und Esler, M. (2012). New drugs, procedures, and devices for hypertension. *Lancet*, 380(9841), 591–600.
- Lavoie, J. L. und Sigmund, C. D. (2003). Minireview: overview of the renin-angiotensin system—an endocrine and paracrine system. *Endocrinology*, 144(6), 2179–2183.
- LeHoux, J. G., Mason, J. I., Bernard, H., Ducharme, L., LeHoux, J., Véronneau, S., und Lefebvre, A. (1994). The presence of two cytochrome P450 aldosterone synthase mRNAs in the hamster adrenal. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 49(2-3), 131–137.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. *Nature*, 460(7257), 831–838.
- Lin, D. (1990). Cloning and Sequence of the Human Adrenodoxin Reductase Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(21), 8516–8520.
- Lösel, R. und Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 4(1), 46–56.
- Macherey-Nagel (2013). NUCLEODUR® C₁₈ Isis. <http://www.mn-net.com/HPLCStart/NUCLEODURphases/NUCLEODURC18Isis/tabid/7120/language/de-DE/Default.aspx>.
- Marney, A. M. und Brown, N. J. (2007). Aldosterone and end-organ damage. *Clinical Science*, 113(6), 267.
- Mast, N., Annalora, A. J., Lodowski, D. T., Palczewski, K., Stout, C. D., und Pikuleva, I. A.

- (2011). Structural basis for three-step sequential catalysis by the cholesterol side chain cleavage enzyme CYP11A1. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(7), 5607–5613.
- Mast, N., White, M. A., Bjorkhem, I., Johnson, E. F., Stout, C. D., und Pikuleva, I. A. (2008). Crystal structures of substrate-bound and substrate-free cytochrome P450 46A1, the principal cholesterol hydroxylase in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(28), 9546–9551.
- Matsukawa, N., Nonaka, Y., Ying, Z., Higaki, J., Ogihara, T., und Okamoto, M. (1990). Molecular cloning and expression of cDNAs encoding rat aldosterone synthase: variants of cytochrome P-450_{11 β}). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 169(1), 245–252.
- Mayeno, A. N., Robinson, J. L., Yang, R. S. H., und Reisfeld, B. (2009). Predicting activation enthalpies of cytochrome-P450-mediated hydrogen abstractions. 2. Comparison of semiempirical PM3, SAM1, and AM1 with a density functional theory method. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(7), 1692–1703.
- Meunier, B. und Bernadou, J. (2000). Active Iron-Oxo and Iron-Peroxo Species in Cytochromes P450 and Peroxidases; Oxo-Hydroxo Tautomerism with Water-Soluble Metalloporphyrins. In B. Meunier (Ed.), *Metal-Oxo and Metal-Peroxo Species in Catalytic Oxidations*, volume 97 of *Structure and Bonding* (pp. 1–35). Berlin and Heidelberg: Springer-Verlag.
- Miller, W. L. und Auchus, R. J. (2011). The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews*, 32(1), 81–151.
- Miroux, B. und Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, 260(3), 289–298.
- Mitani, F., Ishimura, Y., Izumi, S., und Watanabe, K. (1979). Immunohistochemical localization of adrenodoxin and adrenodoxin reductase in bovine adrenal cortex. *Acta Endocrinologica*, 90(2), 317–327.
- Mornet, E., Dupont, J., Vitek, A., und White, P. C. (1989). Characterization of two genes encoding human steroid 11 β -hydroxylase (P-450_{11 β}). *The Journal of Biological Chemistry*, 264(35), 20961–20967.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., und Olson, A. J. (1998). Automated Docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function. *Journal of Computational Chemistry*, 19, 1639–1662.
- Moura, A. M. und Worcel, M. (1984). Direct action of aldosterone on transmembrane ²²Na efflux from arterial smooth muscle. Rapid and delayed effects. *Hypertension*, 6(3), 425–430.

- Müller-Vieira, U., Angotti, M., und Hartmann, R. W. (2005). The adrenocortical tumor cell line NCI-H295R as an *in vitro* screening system for the evaluation of CYP11B2 (aldosterone synthase) and CYP11B1 (steroid-11 β -hydroxylase) inhibitors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 96(3-4), 259–270.
- Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., und Levin, W. (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA*, 6(1), 1–11.
- Nelson, D. R. (2011). Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814(1), 14–18.
- Neunzig, J. (2009). Analyse natürlicher, Kortikosteron-Methyloxidase Defizienz verursachender Varianten des humanen CYP11B2. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Nguyen, H.-H., Hannemann, F., Hartmann, M. F., Malunowicz, E. M., Wudy, S. A., und Bernhardt, R. (2010). Five novel mutations in *CYP11B2* gene detected in patients with aldosterone synthase deficiency type I: Functional characterization and structural analyses. *Molecular Genetics and Metabolism*, 100(4), 357–364.
- Nguyen, K. T., Virus, C., Günnewich, N., Hannemann, F., und Bernhardt, R. (2012). Changing the regioselectivity of a P450 from C15 to C11 hydroxylation of progesterone. *Chem-biochem*, 13(8), 1161–1166.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H., und Yura, T. (1998). Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), 1694–1699.
- Nishimoto, K., Nakagawa, K., Li, D., Kosaka, T., Oya, M., Mikami, S., Shibata, H., Itoh, H., Mitani, F., Yamazaki, T., Ogishima, T., Suematsu, M., und Mukai, K. (2010). Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(5), 2296–2305.
- Nogueira, E. F. und Rainey, W. E. (2010). Regulation of aldosterone synthase by activator transcription factor/cAMP response element-binding protein family members. *Endocrinology*, 151(3), 1060–1070.
- Nonaka, Y., Fujii, T., Kagawa, N., Waterman, M. R., Takemori, H., und Okamoto, M. (1998). Structure/function relationship of CYP11B1 associated with Dahl's salt-resistant rats—expression of rat CYP11B1 and CYP11B2 in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 258(2), 869–878.
- Nonaka, Y. und Okamoto, M. (1991). Functional expression of the cDNAs encoding rat

- 11 β -hydroxylase [cytochrome P450(11 β)] and aldosterone synthase [cytochrome P450(11 β , ald)]. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 202(3), 897–902.
- Nonaka, Y., Takemori, H., Halder, S. K., Sun, T., Ohta, M., Hatano, O., Takakusu, A., und Okamoto, M. (1995). Frog cytochrome P-450 (11 β , ald), a single enzyme involved in the final steps of glucocorticoid and mineralocorticoid biosynthesis. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 229(1), 249–256.
- Ogishima, T., Mitani, F., und Ishimura, Y. (1989). Isolation of two distinct cytochromes P-450_{11 β} with aldosterone synthase activity from bovine adrenocortical mitochondria. *Journal of Biochemistry*, 105(4), 497–499.
- Omura, T. (2005). Heme-thiolate proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 404–409.
- Omura, T. und Sato, R. (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 237, 1375–1376.
- Omura, T. und Sato, R. (1964a). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 2370–2378.
- Omura, T. und Sato, R. (1964b). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 2379–2385.
- Ortiz de Montellano, P. R. (2010). Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Reviews*, 110(2), 932–948.
- Ortiz Montellano, P. R. d. (2005). *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 3 edition.
- Otyepka, M., Skopalík, J., Anzenbacherová, E., und Anzenbacher, P. (2007). What common structural features and variations of mammalian P450s are known to date? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770(3), 376–389.
- Pascoe, L., Curnow, K. M., Slutsker, L., Rösler, A., und White, P. C. (1992). Mutations in the human *CYP11B2* (aldosterone synthase) gene causing corticosterone methyl oxidase II deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(11), 4996–5000.
- Peitsch, M. C. (1995). Protein Modeling by E-mail. *Nature Biotechnology*, 13(7), 658–660.
- Perrone, R. D., Schwartz, J. H., Bengel, H. H., Dale, S. L., Melby, J. C., und Alexander,

- E. A. (1981). Mineralocorticoid activity of 19-nor-DOC and 19-OH-DOC in toad bladder. *The American Journal of Physiology*, 241(5), E406–9.
- Peter, M., Dubuis, J. M., und Sippell, W. G. (1999). Disorders of the aldosterone synthase and steroid 11 β -hydroxylase deficiencies. *Hormone Research*, 51(5), 211–222.
- Peter, M., Nikischin, W., Heinz-Erian, P., Fussenegger, W., Kapelari, K., und Sippell, W. G. (1998). Homozygous deletion of arginine-173 in the *CYP11B2* gene in a girl with congenital hypoaldosteronism. Corticosterone methyloxidase deficiency type II. *Hormone Research*, 50(4), 222–225.
- Peterson, J. A. und Graham, S. E. (1998). A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes P450. *Structure*, 6(9), 1079–1085.
- Pezzi, V., Clyne, C. D., Ando, S., Mathis, J. M., und Rainey, W. E. (1997). Ca²⁺-regulated expression of aldosterone synthase is mediated by calmodulin and calmodulin-dependent protein kinases. *Endocrinology*, 138(2), 835–838.
- Picado-Leonard, J., Voutilainen, R., Kao, L. C., Chung, B. C., Strauss, J. F. I., und Miller, W. L. (1988). Human adrenodoxin: cloning of three cDNAs and cycloheximide enhancement in JEG-3 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(7), 3240–3244.
- Pikuleva, I. A., Tesh, K., Waterman, M. R., und Kim, Y. (2000). The tertiary structure of full-length bovine adrenodoxin suggests functional dimers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1), 44–55.
- Pitt, B., Remme, W., Zannad, F., Neaton, J., Martinez, F., Roniker, B., Bittman, R., Hurley, S., Kleiman, J., und Gatlin, M. (2003). Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 348(14), 1309–1321.
- Pitt, B., Zannad, F., Remme, W. J., Cody, R., Castaigne, A., Perez, A., Palensky, J., und Wittes, J. (1999). The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *The New England Journal of Medicine*, 341(10), 709–717.
- Podust, L. M., Kries, J. P. v., Eddine, A. N., Kim, Y., Yermalitskaya, L. V., Kuehne, R., Ouellet, H., Warriar, T., Altekoster, M., Lee, J.-S., Rademann, J., Oschkinat, H., Kaufmann, S. H. E., und Waterman, M. R. (2007). Small-Molecule Scaffolds for CYP51 Inhibitors Identified by High-Throughput Screening and Defined by X-Ray Crystallography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 3915–3923.
- Porcelli, A. M., Ghelli, A., Zanna, C., Pinton, P., Rizzuto, R., und Rugolo, M. (2005). pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326(4), 799–804.

- Portrat-Doyen, S., Tourniaire, J., Richard, O., Mulatero, P., Aupetit-Faisant, B., Curnow, K. M., Pascoe, L., und Morel, Y. (1998). Isolated aldosterone synthase deficiency caused by simultaneous E198D and V386A mutations in the *CYP11B2* gene. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(11), 4156–4161.
- Poulos, T. L., Finzel, B. C., Gunsalus, I. C., Wagner, G. C., und Kraut, J. (1985). The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(30), 16122–16130.
- Pralong, W. F., Hunyady, L., Várnai, P., Wollheim, C. B., und Spät, A. (1992). Pyridine nucleotide redox state parallels production of aldosterone in potassium-stimulated adrenal glomerulosa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(1), 132–136.
- Rauhut, G., Alex, A., Chandrasekhar, J., Steinke, T., Sauer, W., Beck, B., Hutter, M., Gedeck, P., und Clark, T. (1997). VAMP, version 6.5, Oxford Molecular, Erlangen, Germany.
- Rogerson, F. M., Brennan, F. E., und Fuller, P. J. (2004). Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 217(1-2), 203–212.
- Rost, B. (1999). Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein engineering*, 12(2), 85–94.
- Roumen, L., Sanders, M. P. A., Pieterse, K., Hilbers, P. A. J., Plate, R., Custers, E., Gooyer, M. d., Smits, J. F. M., Beugels, I., Emmen, J., Ottenheijm, H. C. J., Leysen, D., und Hermans, J. J. R. (2007). Construction of 3D models of the CYP11B family as a tool to predict ligand binding characteristics. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 21(8), 455–471.
- Roy, A. K., Ramirez, L. C., und Ulick, S. (1976). Structure and mechanism of formation of the two forms of 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone. *Journal of Steroid Biochemistry*, 7(2), 81–87.
- Russell, D. W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 137–174.
- Russell, D. W., Halford, R. W., Ramirez, D. M. O., Shah, R., und Kotti, T. (2009). Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 1017–1040.
- Sagara, Y., Wada, A., Takata, Y., Waterman, M. R., Sekimizu, K., und Horiuchi, T. (1993). Direct expression of adrenodoxin reductase in *Escherichia coli* and the functional characterization. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 16(7), 627–630.

- Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3 edition.
- Sanner, M. F. (1999). Python: a programming language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 17(1), 57–61.
- Santos, P. C. J. L., Krieger, J. E., und Pereira, A. C. (2012). Renin-angiotensin system, hypertension, and chronic kidney disease: pharmacogenetic implications. *Journal of Pharmacological Sciences*, 120(2), 77–88.
- Schenkman, J. B. (1970). Studies on the nature of the type I and type II spectral changes in liver microsomes. *Biochemistry*, 9(10), 2081–2091.
- Schuster, I. (1985). The interaction of representative members from two classes of antimycotics—the azoles and the allylamines—with cytochromes P-450 in steroidogenic tissues and liver. *Xenobiotica*, 15(6), 529–546.
- Seifert, A. und Pleiss, J. (2009). Identification of selectivity-determining residues in cytochrome P450 monooxygenases: a systematic analysis of the substrate recognition site 5. *Proteins*, 74(4), 1028–1035.
- Sheftel, A. D., Stehling, O., Pierik, A. J., Elsasser, H.-P., Muhlenhoff, U., Webert, H., Hobler, A., Hannemann, F., Bernhardt, R., und Lill, R. (2010). Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11775–11780.
- Shizuta, Y., Kawamoto, T., Mitsuuchi, Y., Miyahara, K., Rösler, A., Ulick, S., und Imura, H. (1995). Inborn errors of aldosterone biosynthesis in humans. *Steroids*, 60(1), 15–21.
- Siegenthaler, W. (2006). *Klinische Pathophysiologie*. Thieme Georg Verlag.
- Simpson, E. R., Clyne, C., Rubin, G., Boon, W. C., Robertson, K., Britt, K., Speed, C., und Jones, M. (2002). Aromatase—a brief overview. *Annual Review of Physiology*, 64, 93–127.
- Singh, M., Sharma, R., und Banerjee, U. C. (2002). Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*, 20(5-6), 341–359.
- Sirim, D., Widmann, M., Wagner, F., und Pleiss, J. (2010). Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases. *BMC Structural Biology*, 10, 34.
- Sligar, S. G., Cinti, D. L., Gibson, G. G., und Schenkman, J. B. (1979). Spin state control of the hepatic cytochrome P450 redox potential. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 90(3), 925–932.
- Sohl, C. D. und Guengerich, F. P. (2010). Kinetic Analysis of the Three-step Steroid Aro-

- matase Reaction of Human Cytochrome P450 19A1. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17734–17743.
- Solish, S. B., Picado-Leonard, J., Morel, Y., Kuhn, R. W., Mohandas, T. K., Hanukoglu, I., und Miller, W. L. (1988). Human adrenodoxin reductase: two mRNAs encoded by a single gene on chromosome 17cen→q25 are expressed in steroidogenic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(19), 7104–7108.
- Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D., und Dawson, J. H. (1996). Heme-Containing Oxygenases. *Chemical Reviews*, 96(7), 2841–2888.
- Spät, A. (2004). Glomerulosa cell—a unique sensor of extracellular K⁺ concentration. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 217(1-2), 23–26.
- Stark, K. und Guengerich, F. P. (2007). Characterization of Orphan Human Cytochromes P450. *Drug Metabolism Reviews*, 39(2-3), 627–637.
- Straub, P., Ramarao, M. K., und Kemper, B. (1993). Preference for aromatic substitutions at tryptophan-120, which is highly conserved and a potential mediator of electron transfer in cytochrome P450 2C2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197(2), 433–439.
- Strushkevich, N., Gilep, A. A., Shen, L., Arrowsmith, C. H., Edwards, A. M., Usanov, S. A., und Park, H.-W. (2013). Structural insights into aldosterone synthase substrate specificity and targeted inhibition. *Molecular endocrinology*, 27(2), 315–324.
- Strushkevich, N., MacKenzie, F., Cherkesova, T., Grabovec, I., Usanov, S., und Park, H.-W. (2011). Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), 10139–10143.
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234.
- Takeda, Y., Lewicka, S., Koch, S., Bige, K., Vecsei, P., Abdelhamid, S., Cojocar, M., und Harnik, M. (1990). Synthesis of 19-nor-aldosterone, 18-hydroxy-19-nor-corticosterone and 18,19-dihydroxycorticosterone in the human aldosterone-producing adenoma. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 37(4), 599–604.
- Tin, M. K., Hakki, T., und Bernhardt, R. (2011). Fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as a new system for the investigation of corticosterone methyl oxidase deficiency-causing mutations. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 124(1-2), 31–37.
- Uhlmann, H. und Bernhardt, R. (1995). The role of threonine 54 in adrenodoxin for the

- properties of its iron-sulfur cluster and its electron transfer function. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(50), 29959–29966.
- Ulick, S., Wang, J. Z., und Morton, D. H. (1992). The biochemical phenotypes of two inborn errors in the biosynthesis of aldosterone. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 74(6), 1415–1420.
- Ulmschneider, S., Müller-Vieira, U., Klein, C. D., Antes, I., Lengauer, T., und Hartmann, R. W. (2005a). Synthesis and evaluation of (pyridylmethylene)tetrahydronaphthalenes/indanes and structurally modified derivatives: potent and selective inhibitors of aldosterone synthase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(5), 1563–1575.
- Ulmschneider, S., Müller-Vieira, U., Mitrenga, M., Hartmann, R. W., Oberwinkler-Marchais, S., Klein, C. D., Bureik, M., Bernhardt, R., Antes, I., und Lengauer, T. (2005b). Synthesis and Evaluation of Imidazolymethylenetetrahydronaphthalenes and Imidazolymethylenindanes: potent inhibitors of aldosterone synthase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(6), 1796–1805.
- Unger, T., Paulis, L., und Sica, D. A. (2011). Therapeutic perspectives in hypertension: novel means for renin-angiotensin-aldosterone system modulation and emerging device-based approaches. *European Heart Journal*, 32(22), 2739–2747.
- Urlacher, V. B., Makhsumkhanov, A., und Schmid, R. D. (2006). Biotransformation of β -ionone by engineered cytochrome P450 BM-3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(1), 53–59.
- Vickery, L. E. (1997). Molecular recognition and electron transfer in mitochondrial steroid hydroxylase systems. *Steroids*, 62(1), 124–127.
- Virus, C., Lisurek, M., Simgen, B., Hannemann, F., und Bernhardt, R. (2006). Function and engineering of the 15β -hydroxylase CYP106A2. *Biochemical Society Transactions*, 34(Pt 6), 1215–1218.
- Voets, M., Antes, I., Scherer, C., Müller-Vieira, U., Biemel, K., Barassin, C., Marchais-Oberwinkler, S., und Hartmann, R. W. (2005). Heteroaryl-Substituted Naphthalenes and Structurally Modified Derivatives: Selective Inhibitors of CYP11B2 for the Treatment of Congestive Heart Failure and Myocardial Fibrosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(21), 6632–6642.
- Voets, M., Antes, I., Scherer, C., Müller-Vieira, U., Biemel, K., Marchais-Oberwinkler, S., und Hartmann, R. W. (2006). Synthesis and Evaluation of Heteroaryl-Substituted Dihydronaphthalenes and Indenes: Potent and Selective Inhibitors of Aldosterone Synthase (CYP11B2) for the Treatment of Congestive Heart Failure and Myocardial Fibrosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(7), 2222–2231.
- Wada, A., Ohnishi, T., Nonaka, Y., Okamoto, M., und Yamano, T. (1985). Synthesis of

- aldosterone by a reconstituted system of cytochrome P-450_{11 β} from bovine adrenocortical mitochondria. *Journal of Biochemistry*, 98(1), 245–256.
- Wang, T., Rowland, J. G., Parmar, J., Nesterova, M., Seki, T., und Rainey, W. E. (2012). Comparison of aldosterone production among human adrenocortical cell lines. *Hormone and Metabolic Research*, 44(3), 245–250.
- Webert, H. (2011). *Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Komponenten der eukaryotischen Eisen-Schwefel-Cluster-Biogenese-Maschinerie*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Werck-Reichhart, D. und Feyereisen, R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, 1(6), REVIEWS3003.
- White, P. C. (2004). Aldosterone synthase deficiency and related disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 217(1-2), 81–87.
- White, P. C., Curnow, K. M., und Pascoe, L. (1994). Disorders of steroid 11 β -hydroxylase isozymes. *Endocrine Reviews*, 15(4), 421–438.
- Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F., und McRee, D. E. (2000). Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Molecular Cell*, 5(1), 121–131.
- Williams, P. A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H. C., Matak Vinković, D., und Jhoti, H. (2003). Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature*, 424(6947), 464–468.
- World Health Organization (2009). *Global health risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks*. Geneva and Switzerland: World Health Organization.
- Xia, B., Cheng, H., Bandarian, V., Reed, G. H., und Markley, J. L. (1996). Human Ferredoxin: Overproduction in *Escherichia coli*, Reconstitution *in Vitro*, and Spectroscopic Studies of Iron–Sulfur Cluster Ligand Cysteine-to-Serine Mutants. *Biochemistry*, 35(29), 9488–9495.
- Xing, Y., Rainey, W. E., Apolzan, J. W., Francone, O. L., Harris, R. B. S., und Bollag, W. B. (2012). Adrenal cell aldosterone production is stimulated by very-low-density lipoprotein (VLDL). *Endocrinology*, 153(2), 721–731.
- Yanagibashi, K., Haniu, M., Shively, J. E., Shen, W. H., und Hall, P. (1986). The synthesis of aldosterone by the adrenal cortex. Two zones (fasciculata and glomerulosa) possess one enzyme for 11 β -, 18-hydroxylation, and aldehyde synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(8), 3556–3562.

- Yoshida, Y. (1988). Cytochrome P450 of fungi: primary target for azole antifungal agents. *Current Topics in Medical Mycology*, 2, 388–418.
- Zannad, F., Alla, F., Dousset, B., Perez, A., und Pitt, B. (2000). Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: Insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). *Circulation*, 102(22), 2700–2706.
- Zhang, G., Rodriguez, H., Fardella, C. E., Harris, D. A., und Miller, W. L. (1995). Mutation T318M in the *CYP11B2* gene encoding P450c11AS (aldosterone synthase) causes corticosterone methyl oxidase II deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 57(5), 1037–1043.
- Zhao, B., Lei, L., Kagawa, N., Sundaramoorthy, M., Banerjee, S., Nagy, L. D., Guengerich, F. P., und Waterman, M. R. (2012). Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10613–10622.
- Zöllner, A., Kagawa, N., Waterman, M. R., Nonaka, Y., Takio, K., Shiro, Y., Hannemann, F., und Bernhardt, R. (2008). Purification and functional characterization of human 11 β hydroxylase expressed in *Escherichia coli*. *The FEBS Journal*, 275(4), 799–810.

A. Expressionsvektoren für *E. coli*

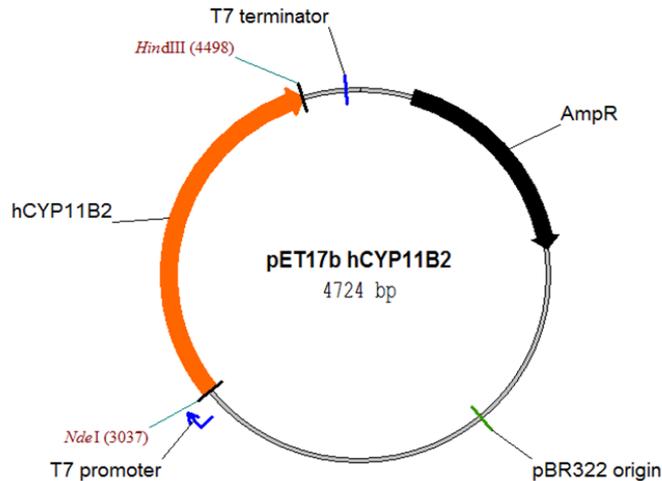


Abb. A.1.: Vektor für die Expression der humanen Aldosteronsynthase in *E. coli*. Der 4724 bp große Vektor ist abgeleitet aus dem Vektor pET-17b (Novagen) und beinhaltet die cDNA der humanen Aldosteronsynthase, die über **Nde I** und **Hind III** in den Vektor kloniert wurde. Die Expression der cDNA steht unter der Kontrolle eines T7-Promoters. Der Vektor enthält zudem den Replikationsursprung pBR322 und ein Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase).

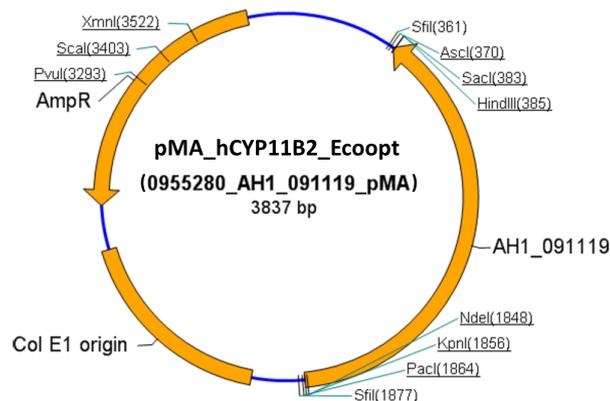


Abb. A.2.: Vektor zur Amplifizierung der codon-optimierten hCYP11B2-cDNA. Die codon-optimierte cDNA der humanen Aldosteronsynthase für *E. coli* (AH1_091119) wurde von der Firma GENART AG synthetisiert und im dargestellten Vektor geliefert. Der Vektor wurde ausschließlich zur Amplifizierung der beschriebenen cDNA verwendet, die anschließend über **Nde I** und **Hind III** in den Vektor pET-17b kloniert wurde.

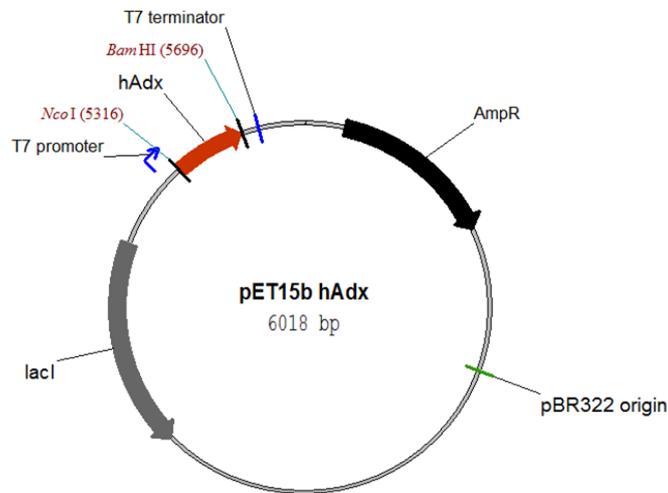


Abb. A.3.: Vektor für die Expression des humanen Adrenodoxins in *E. coli*. Der 6018 bp große Vektor ist abgeleitet aus dem Vektor pET-15b (Novagen) und beinhaltet die cDNA des humanen Adrenodoxins, die über **Nco I** und **BamH I** in den Vektor kloniert wurde. Die Expression der cDNA steht unter der Kontrolle eines T7-Promoters. Der Vektor enthält zudem den Replikationsursprung pBR322 und ein Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase), sowie ein *lacI*-Gen (*lac* Repressor).

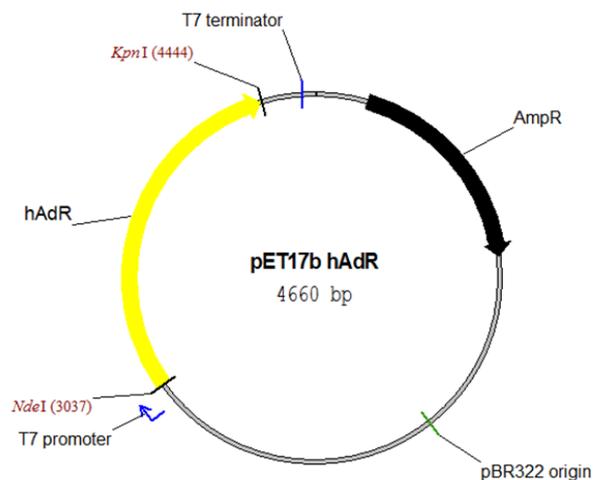


Abb. A.4.: Vektor für die Expression des humanen Adrenodoxi-Reduktase in *E. coli*. Der 4660 bp große Vektor ist abgeleitet aus dem Vektor pET-17b (Novagen) und beinhaltet die cDNA der humanen Adrenodoxin-Reduktase, die über **Nde I** und **Kpn I** in den Vektor kloniert wurde. Die Expression der cDNA steht unter der Kontrolle eines T7-Promoters. Der Vektor enthält zudem den Replikationsursprung pBR322 und ein Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase).

B. Sequenzen

B.1. Humane Aldosteronsynthese

cDNA der humanen Aldosteronsynthese nach Kawamoto *et al.* mit SNP R249S:

```
1 ATGGCTACTA AAGCTGCTCG TGCTCCTCGT ACAGTGCTGC CGTTTGAAGC CATGCCACAG
61 CATCCAGGCA ACCGTTGGCT GCGTCTGCTG CAGATCTGGA GGGAGCAGGG TTATGAGCAC
121 CTGCACCTGG AGATGCACCA GACCTTCCAG GAGCTGGGGC CCATTTTCAG GTACAACCTTG
181 GGAGGACCAC GCATGGTGTG TGTGATGCTG CCGGAGGATG TGGAGAAGCT GCAACAGGTG
241 GACAGCCTGC ATCCCTGCAG GATGATCCTG GAGCCCTGGG TGGCCTACAG ACAACATCGT
301 GGGCACAAAT GTGGCGTGTT CTTGTTGAAT GGGCCTGAAT GGCCTTCAA CCGATTGCGG
361 CTGAACCCAG ATGTGCTGTC GCCCAAGGCC GTGCAGAGGT TCCTCCCGAT GGTGGATGCA
421 GTGGCCAGGG ACTTCTCCCA GGCCCTGAAG AAGAAGGTGC TGCAGAACGC CCGGGGGAGC
481 CTGACCCTGG ACGTCCAGCC CAGCATCTTC CACTACACCA TAGAAGCCAG CAACTTAGCT
541 CTTTTTGGAG AGCGGCTGGG CCTGGTTGGC CACAGCCCCA GTTCTGCCAG CCTGAACTTC
601 CTCCATGCCC TGGAGGTCAT GTTCAAATCC ACCGTCCAGC TCATGTTTAT GCCCAGGAGC
661 CTGTCTCGCT GGATCAGCCC CAAGGTGTGG AAGGAGCACT TTGAGGCCTG GGAAGTGCATC
721 TTCCAGTACG GTGACAACCTG TATCCAGAAA ATCTACCAGG AACTGGCCTT CAACCGCCCT
781 CAACACTACA CAGGCATCGT GGCAGAGCTC CTGTTGAAGG CGGAACTGTC ACTAGAAGCC
841 ATCAAGGCCA ACTCTATGGA ACTCACTGCA GGGAGCGTGG ACACGACAGC GTTTCCCTTG
901 CTGATGACGC TCTTTGAGCT GGCTCGGAAC CCCGACGTGC AGCAGATCCT GCGCCAGGAG
961 AGCCTGGCCG CCGCAGCCAG CATCAGTGAA CATCCCAGCA AGGCAACCAC CGAGCTGCCC
1021 TTGCTGCGGG CGGCCCTCAA GGAGACCTTG CGGCTCTACC CTGTGGGTCT GTTTTTGGAG
1081 CGAGTGGTGA GCTCAGACTT GGTGCTTCCAG AACTACCACA TCCCAGCTGG GACATTGGTA
1141 CAGGTTTTTCC TCTACTCGCT GGGTCGCAAT GCCGCCTTGT TCCCGAGGCC TGAGCGGTAT
1201 AATCCCAGC GCTGGCTAGA CATCAGGGGC TCCGGCAGGA ACTTCCACCA CGTGCCCTTT
1261 GGCTTTGGCA TCGCCAGTG CCTCGGGCGG CGCCTGGCAG AGGCAGAGAT GCTGCTGCTG
1321 CTGCACCACG TGCTGAAGCA CTTCTGCTG GAGACTACTA CTCAAGAGGA CATAAAGATG
1381 GTCTACAGCT TCATATTGAG GCCTGGCAGC TCCCCCTCC TCACTTTCAG AGCGATTAAC
1441 CACCACCACC ACCACCAC
```

Codon-optimierte cDNA der humanen Aldosteronsynthase für *E. coli*:

```

1 ATGGCAACCA AAGCAGCACG TGCACCGCGT ACCGTTCTGC CGTTTGAAGC AATGCCGCAG
61 CATCCGGGTA ATCGTTGGCT GCGTCTGCTG CAGATTTGGC GTGAACAGGG TTATGAACAT
121 CTGCATCTGG AAATGCATCA GACCTTTCAA GAACTGGGTC CGATTTTTTCG TTATAATCTG
181 GGTGGTCCGC GTATGTTTTG TGTATGCTG CCGGAAGATG TTGAAAAACT GCAGCAGGTT
241 GATAGCCTGC ATCCGTGTCG TATGATTCTG GAACCGTGGG TTGCATATCG TCAGCATCGT
301 GGTCATAAAT GTGGTGTTTT TCTGCTGAAT GGTCCGGAAT GGCGTTTTAA TCGTCTGCGT
361 CTGAATCCGG ATGTTCTGAG CCCGAAAGCA GTTCAGCGTT TTCTGCCGAT GGTTGATGCA
421 GTTGACAGTG ATTTTAGCCA GGCAGTAAA AAAAAAGTTC TGCAGAATGC ACGTGGTAGC
481 CTGACCTGG ATGTTAGACC GAGCATTFFF CATTATACCA TTGAAGCAAG CAATCTGGCA
541 CTGTTTGGTG AACGTCTGGG TCTGGTTGGT CATAGCCCGA GCAGCGCAAG CCTGAATFFF
601 CTGCATGCAC TGGAAGTGAT GTTTAAAAGC ACCGTTTCCG TGATGTTTAT GCCTCGTAGC
661 CTGAGCCGTT GGATTAGCCC GAAAGTTTGG AAAGAACATT TTGAAGCCTG GGATTGCATT
721 TTTCAGTATG GCGATAATTG CATTAGAAA ATTTATCAAG AACTGGCCTT TAATCGTCCG
781 CAGCATTATA CCGGTATTGT TGCAGAACTG CTGCTGAAAG CAGAAGTGG CCTGGAAGCA
841 ATTAAGCAA ATAGCATGGA ACTGACCGCA GGTAGCGTTG ATACCACCGC ATTTCCGCTG
901 CTGATGACCC TGTTTGAACT GGCACGTAAT CCGGATGTGC AGCAGATTCT GCGTCAAGAA
961 AGCCTGGCAG CAGCAGCAAG CATTAGCGAA CATCCGCAGA AAGCAACCAC CGAACTGCCG
1021 CTGCTGCGTG CAGCACTGAA AGAAACCCTG CGCCTGTATC CGGTTGGTCT GTTTCTGGAA
1081 CGTGTGTGTA GCAGCGATCT GGTGCTGCAG AATTATCATA TTCCGGCAGG CACCCTGGTT
1141 CAGGTTTTTC TGTATAGCCT GGGTCGTAAT GCAGCACTGT TTCCGCGTCC GGAACGTTAT
1201 AATCCGCAGC GTTGGCTGGA TATTCGTGGT AGCGGTCGTA ATTTTCATCA TGTTCCGTTT
1261 GGTTTTGGTA TGCGTCAGTG TCTGGGTCGT CGTCTGGCCG AAGCAGAAAT GCTGCTGTTA
1321 CTGCATCATG TTCTGAAACA TTTTCTGGTT GAAACCCTGA CCCAAGAGGA TATTAATAATG
1381 GTCTATAGCT TTATTCTGCG TCCGGGTACA AGTCCGCTGC TGACCTTTCG TGCAATTAAT
1441 CATCATCATC ACCATCAT

```

Aminosäuresequenz der humanen Aldosteronsynthase:

```

1 MATKAARAPR TVLPFEAMPQ HPGNRWLRLL QIWREQGYEH LHLEMHQTFQ ELGPIFRYNL
61 GGPRMVCVML PEDVEKLQV DSLHPCRMIL EPWVAYRQHR GHKCGVLLN GPEWRFNRLR
121 LNPDLVSPKA VQRFLPMVDA VARDFSQALK KKVLRNARGS LTLDVQPSIF HYTIEASNLA
181 LFGERLGLVG HSPSSASLNF LHALEVMFKS TVQLMFMPRS LSRWISPKVW KEHFEAWDCI
241 FQYGDNCIQK IYQELAFNRP QHYTGIVAEL LLKAELSLEA IKANSMELTA GSVDTTAFPL
301 LMTL FELARN PDVQQILRQE SLAAAASISE HPQKATTELP LLRAALKETL RLYPVGLFLE
361 RVVSSDLVLQ NYHIPAGTLV QVFLYSLGRN AALFPRPERY NPQRWLDIRG SGRNFHHVFPF
421 GFGMRQCLGR RLAEAEMLLL LHHVLKHFLV ETLTQEDIKM VYSFILRPGT SPLLTFRAIN
481 HHHHHH

```

B.2. Humanes Adrenodoxin

cDNA des humanen Adrenodoxins:

```
1 ATGGGCAGCT CAGAAGATAA AATAACAGTC CACTTTATAA ACCGTGATGG TGAAACATTA
61 ACAACCAAAG GAAAAGTTGG TGATTCTCTG CTAGATGTTG TGGTTGAAAA TAATCTAGAT
121 ATTGATGGCT TTGGTGCATG TGAGGGAACC CTGGCTTGTT CAACCTGTCA CCTCATCTTT
181 GAAGATCACA TATATGAGAA GTTAGATGCA ATCACTGATG AGGAGAATGA CATGCTCGAT
241 CTGGCATATG GACTAACAGA CAGATCACGG TTGGGCTGCC AAATCTGTTT GACAAAATCT
301 ATGGACAATA TGACTGTTTCG AGTGCCTGAA ACAGTGGCTG ATGCCAGACA ATCCATTGAT
361 GTGGGCAAGA CCTCC
```

Aminosäuresequenz des humanen Adrenodoxins:

```
1 MGSSDKITV HFINRDGETL TTKGKVGDSL LDVVVENNLD IDFGACEGT LACSTCHLIF
61 EDHIYEK LDA ITDEENDMLD LAYGLTDRSR LGCQICLTKS MDNMTVRVPE TVADARQSID
121 VGKTS
```

B.3. Humane Adrenodoxin-Reduktase

cDNA der humanen Adrenodoxin-Reduktase:

```
1 ATGTCCACAC AGGAGAAGAC CCCCCAGATC TGTGTGGTGG GCAGTGGCCC AGCTGGCTTC
61 TACACGGCCC AACACCTGCT AAAGCACCCC CAGGCCACG TGGACATCTA CGAGAAACAG
121 CCTGTGCCCT TTGGCCTGGT GCGCTTTGGT GTGGCGCCTG ATCACCCCGA GGTGAAGAAT
181 GTCATCAACA CATTACCCA GACGGCCCAT TCTGGCCGCT GTGCCTTCTG GGGCAACGTG
241 GAGGTGGGCA GGGACGTGAC GGTGCCGGAG CTGCAGGAGG CCTACCACGC TGTGGTGTCTG
301 AGCTACGGGG CAGAGGACCA TCGGGCCCTG GAAATTCCTG GTGAGGAGCT GCCAGGTGTG
361 TGCTCCGCCC GGGCCTTCGT GGGCTGGTAC AACGGGCTTC CTGAGAACCA GGAGCTGGAG
421 CCAGACCTGA GCTGTGACAC AGCCGTGATT CTGGGGCAGG GGAACGTGGC TCTGGACGTG
481 GCCCGCATCC TACTGACCCC ACCTGAGCAC CTGGAGGCCC TCCTTTTGTG CCAGAGAACG
541 GACATCACGA AGGCAGCCCT GGGTGTACTG AGGCAGAGTC GAGTGAAGAC AGTGTGGCTA
601 GTGGGCCCGC GTGGACCCCT GCAAGTGGCC TTCACCATTA AGGAGCTTCG GGAGATGATT
661 CAGTTACCGG GAGCCCGGCC CATTTTGGAT CCTGTGGATT TCTTGGGTCT CCAGGACAAG
721 ATCAAGGAGG TCCCCGCCC GAGGAAGCGG CTGACGGAAC TGCTGCTTCG AACGGCCACA
781 GAGAAGCCAG GGCCGCGGGA AGCTGCCCGC CAGGCATCGG CCTCCCGTGC CTGGGGCCTC
841 CGCTTTTTTC GAAGCCCCCA GCAGGTGCTG CCCTCACCAG ATGGGCGGCG GGCAGCAGGT
901 GTCCGCTAG CAGTCACTAG ACTGGAGGGT GTCGATGAGG CCACCCGTGC AGTGCCACG
961 GGAGACATGG AAGACCTCCC TTGTGGGCTG GTGCTCAGCA GCATTGGGTA TAAGAGCCGC
1021 CCTGTGACCA CAAGCGTGCC CTTTGACTCC AAGCTTGGGG TCATCCCCAA TGTGGAGGGC
1081 CGGGTTATGG ATGTGCCAGG CCTCTACTGC AGCGGCTGGG TGAAGAGAGG ACCTACAGGT
1141 GTCATAGCCA CAACCATGAC TGACAGCTTC CTCACCGGCC AGATGCTGCT GCAGGACCTG
1201 AAGGCTGGGT TGCTCCCCTC TGGCCCCAGG CCTGGCTACG CAGCCATCCA GGCCCTGCTC
1261 AGCAGCCGAG GGTCCGGCC AGTCTCTTTC TCAGACTGGG AGAAGCTGGA TGCCGAGGAG
1321 GTGGCCCCGG GCCAGGGCAC GGGGAAGCCC AGGGAGAAGC TGGTGGATCC TCAGGAGATG
1381 CTGCGCCTCC TGGGCCAC
```

Aminosäuresequenz der humanen Adrenodoxin-Reduktase:

```
1 MSTQEKTPQI CVVGSFPAGF YTAQHLLKHP QAHVDIYEKQ PVPFGLVRFV VAPDHPEVKN
61 VINTFTQTAH SGRCAFNGV EVGRDVTVPE LQEAYHAVVL SYGAEDHRAL EIPGEELPGV
121 CSARAFVWY NGLPENQELE PDLSCDTAVI LGQGNVALDV ARILLTPPEH LEALLLCQRT
181 DITKAALGVL RQSRVKTWV VRRGRLQVA FTIKELREMI QLPGARPID PVDLFLQDK
241 IKEVPRPRKR LTELLLRAT EKPGPAEAR QASASRAWGL RFRSPQQVL PSPDGRRAAG
301 VRLAVTRLEG VDEATRAVPT GDMEDLPCGL VLSSIGYKSR PVDPSVPFDS KLGVIPNVEG
361 RVMDVPGLYC SGWVKRGPTG VIATTMTDSF LTGQMLLQDL KAGLLPSGPR PGYAAIQALL
421 SSRGVRPVSF SDWEKLDAEE VARGQGTGKP REKLVDPQEM LRLLGH
```

C. Alignments

Adx_human	SSSEDKITVHFINRDGETLTTKGVGDSLLDVVVENNLDIDGFGACEGTL	50
Adx_bovin	SSSEDKITVHFINRDGETLTTKGI GDSLLDVVVQ NNLDIDGFGACEGTL	50
Adx_human	ACSTCHLIFEDHIYEKLDAITDEENDMLDLAYGLTDRSRLGCQICLTKSM	100
Adx_bovin	ACSTCHLIFEQHI FEKLE AITDEENDMLDLAYGLTDRSRLGCQICLTKAM	100
	↑↑ ↑ ↑ 72 73 76 79	
Adx_human	DNMTVRVPETVADARQSIDVGKTS	124
Adx_bovin	DNMTVRVPDAVSDARESIDMGMNSSKIE	128

Abb. C.1.: Alignment von humanem und bovinem Adrenodoxin. Die Aminosäuresequenzen der humanen (UniProt-Eintrag P10109) und bovinen (UniProt-Eintrag P00257) Adx-Form zeigen eine Sequenzidentität von 88 % (ohne mitochondriale Signal-Sequenz). Identische Aminosäurereste sind schwarz hinterlegt. Die rot markierten Positionen geben die sauren Interaktionsstellen des bovinen Adx mit boviner AdR und CYP11A1 an (Grinberg *et al.*, 2000).

AdR_human	STQEKTPQICVVGSGPAGFYTAQHLLKHP . QAHVDIYEKQPVPFGLVRFG	48
AdR_bovin	STQEQTTPQICVVGSGPAGFYTAQHLLKHHSR AHVDIYEKQLVPFGLVRFG	49
AdR_human	VAPDHPEVKNVINTFTQTAHSGRCAFWGNVEVGRDVTVP ELREAYHAVVL	98
AdR_bovin	VAPDHPEVKNVINTFTQTARSDRCAFYGNVEVGRDVTVQ ELQDAYHAVVL	99
AdR_human	SYGAEDHRALEIPGEELPGVCSARAFVGYWYNGLPENQELEPDLSCDTAVI	148
AdR_bovin	SYGAEDHQALDIPGEELPGVFSARAFVGYWYNGLPENRELAPDLSCDTAVI	149
AdR_human	LGQGNVALDVARILLTPPEHLERTDITKAALGVL RQSRVKTVWL VGRRG	198
AdR_bovin	LGQGNVALDVARILLTPPDHLEKTDITEAALGAL RQSRVKTVWI VGRRG	199
AdR_human	LQVAFTIKELREMIQLPGARPI LDPVDFLGLQDKIKEVPRPRKRLTELL	248
AdR_bovin	LQVAFTIKELREMIQLPGTRPMLDPADFLGLQDRIKEAARPRKRLMELL	249
	↑ ↑ 239 243	
AdR_human	RTATEKPGPAEAARQASASRAWGLRFFRSPQQVLPSPDGRRAAGVRLAVT	298
AdR_bovin	RTATEKPGVEEAARRASASRAWGLRFFRSPQQVLPSPDGRRAAGIRLAVT	299
AdR_human	RLEGVDEATRAVPTGDMEDLPCGLVLSSIGYKSRPVDPSVPFDSKLGVIIP	348
AdR_bovin	RLEGIGEATRAVPTGDVEDLPCGLVLSSIGYKSRPIDPSVPFDPKLGVV	349
AdR_human	NVEGRVM DVPGLYCSGWV KRGP TGVIAT TMTDSFLTGM LLQDLKAGLLP	398
AdR_bovin	NMEGRVV DVPGLYCSGWV KRGP TGVIIT TMTDSFLTGM ILLQDLKAGHLP	399
AdR_human	SGPRPGYAAIQALLSSRGV R PVSFSDWEKLD AEEVARGQGTGKPREKLV D	448
AdR_bovin	SGPRPGSAFIKALLDSRGV W PVSFSDWEKLD AEEVSRGQASGKPREKLL D	449
AdR_human	PQEMLRLLGH	458
AdR_bovin	PQEMLRLLGH	459

Abb. C.2.: Alignment von humaner und boviner Adrenodoxin-Reduktase. Die Aminosäuresequenzen der humanen (UniProt-Eintrag P22570) und bovinen (UniProt-Eintrag P08165) AdR-Form zeigen eine Sequenzidentität von 88 % (ohne mitochondriale Signal-Sequenz). Identische Aminosäurereste sind schwarz hinterlegt. Die blau markierten Positionen geben die basischen Interaktionsstellen des bovinen AdR mit bovinem Adx und CYP11A1 an (Grinberg *et al.*, 2000).

CYP11A1	. . ISTRSPR . . . PFNEIPSPGDNGWLNLYHFWRGTGTHKVHLHHVQNFQK	84
CYP11B2	GTARAARAPRTVLPFEAMPQHPGNRWLRLQLIWRQGYEHLHLEMHQTFQE	74
CYP11A1	YGPIYREKLGNVESVYVIDPEDVALLFKSEGPNPERFLIPPWVAYHQYYQ	134
CYP11B2	LGPIFRYNLGGPRMVCVMLPEDVEKLQQVDSLHPCRMILEPWVAYRQHRG	124
	↑	
	W116	
CYP11A1	RPIGVLLKKSAAWKKDRVALNQEVMapeATKNFLPLDAVSRDFVSVLHR	184
CYP11B2	HKCGVFLNNGPEWRFNRLRNPDLSPKAVQRFLPMVDAVARDFSQALKK	174
	↑	
	F130	
CYP11A1	RIKAGSGNYSGDISDDLFRFAFESITNVI FGERQGMLEEVVNPEAQRFI	234
CYP11B2	KVLQNARCSLTLDVQPSIFHYTIEASNLAL FGERLGLVGHSPSSASLNFL	224
CYP11A1	DAIYQMFHTSV PMLNLPDLFRFLFRKTWKDHVAAWDVIFSKADIYTQNF	284
CYP11B2	HALEVMFKSTVQLMFMPRSLSRWISPKVWKEHFEAWDCIFQYGDNCIQKI	274
CYP11A1	YWELRQKGSVHHDYRGI LYRLLGDSKMSFEDIKANVTEMLAGGVDTTSMT	334
CYP11B2	YQELAFNRPQH . . YTGIVAE LLLKAELSLEAIKANSMELTAGSVDTTAFP	322
CYP11A1	LQWHLYEMARNLKVQDMLRAEVLAA RHQAQGD MATMLQLVPLLKASIKET	384
CYP11B2	LLMTLFELARNPDVQQILRQESLAAAASISEHPQKATELPLLRAALKET	372
CYP11A1	LRLHPISVTLQRYLVDLVLRDYMI PAKTLVQVAIYALGREPTFFFDPEN	434
CYP11B2	LRLYPVGLFLERVVSSDLVLQNYHIPAGTLVQVFLYSLGRNAALFPRPER	422
CYP11A1	FDPTRWLSKDKNITYFRNLGFGWGV RQCLGRRIAELEM TIFLINMLENFR	484
CYP11B2	YNPQRWLDIRGSGRNFHHVPGFGMRQCLGRRLAEAEMLLLHHV LKHFL	472
CYP11A1	VEIQHLSDVGTTFNLILMPEKPISFTFWPFN	515
CYP11B2	VELTQEDIKMOVYSFILRPGTSPLLTFRAIN	503

Abb. C.3.: Alignment von humanem CYP11A1 und humanem CYP11B2 als Grundlage zur Homologiemodellierung. Die Aminosäuresequenzen der beiden Cytochrome P450 (CYP11A1: UniProt-Eintrag P05108, CYP11B2: UniProt-Eintrag P19099) zeigen eine Sequenzidentität von 38 % (ohne mitochondriale Signal-Sequenz). Identische Aminosäurereste sind schwarz hinterlegt. Die beiden Aminosäuren, die zur Untersuchung ihrer Funktion im CYP11B2 mutiert wurden, sind durch Pfeile markiert.

D. Publikationen und Konferenzbeiträge

Beiträge in wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

Hobler A., Kagawa N., Hutter M. C., Hartmann M. F., Wudy S. A., Hannemann F., Bernhardt R.

Human aldosterone synthase: Recombinant expression in *E. coli* and purification enables a detailed biochemical analysis of the protein on the molecular level.

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2012 Oct; 132 (1-2):57-65.

Sheftel A. D., Stehling O., Pierik A. J., Elsässer H. P., Mühlenhoff U., Webert H., Hobler A., Hannemann F., Bernhardt R., Lill R.

Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis.

Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2010 Jun 29;107(26):11775-80.

Beiträge auf internationalen Konferenzen:

Purification of recombinant human aldosterone synthase from *E. coli* enables the analysis of clinically relevant mutants on the molecular level.

Vortrag: 55. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Mannheim, 07.-10.03.2012

Parr M. K., Zöllner A., Fußhöller G., Opfermann G., Hobler A., Bernhardt R., Bureik M., Schänzer W.:

New players in the nightwatch research.

Posterpräsentation: Recent Advances in Doping Analysis (19) - Proceedings of the 29th Cologne Workshop, 13. - 18. February 2011

Human aldosterone synthase (CYP11B2): heterologous expression in *E. coli*, purification and functional characterization.

Hobler, A., Kagawa, N., Hannemann, F., Bernhardt, R.

Posterpräsentation: International Congress on Hormonal steroids and Hormones and Cancer, Edinburgh, UK, 21.-24.09.2010

(Ausgezeichnet mit einem Posterpreis)

Danksagung

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Rita Bernhardt, danke ich ganz besonders für die Möglichkeit zur Promotion mit diesem interessanten Thema an ihrem Lehrstuhl. Das Interesse am Fortschritt dieser Arbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und ihr Vertrauen in meine Arbeit waren eine große Unterstützung und ein steter Ansporn.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Herrn Dr. Frank Hannemann für das vermittelte Wissen und die stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während meiner Zeit am Institut. Vielen Dank vor allem für das Korrekturlesen diverser Schriftstücke und natürlich der vorliegenden Arbeit.

Besonders danken möchte ich Herrn Norio Kagawa, PhD, der mich in die Arbeit mit der humanen Aldosteronsynthase eingeführt hat und bei Problemen immer zur Seite stand.

Herrn PD Dr. Michael Hutter, Lehrstuhl für Computational Biology, Universität des Saarlandes, danke ich ganz besonders für die Durchführung der Homologie-Modellierung und der Docking-Studien. Herzlichen Dank für die Geduld beim Auffrischen meiner Bioinformatik-Kenntnisse!

Bei Frau Dr. Michaela Hartmann und Herrn Prof. Dr. med. Stefan Wudy vom Steroidlabor des Universitätsklinikums Giessen möchte ich mich herzlich für die GC-MS-Analyse bedanken.

Herrn Alex Sheftel, PhD, und Herrn Dr. Holger Webert von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Roland Lill, Philipps-Universität Marburg, danke ich für die Bereitstellung des Fdx2 und die Zusammenarbeit in diesem Projekt.

Ein herzlicher Dank geht an Frau Katharina Bompais und Herrn Wolfgang Reinle für die Bereitstellung von bovinem Adx und AdR und die Wissensvermittlung bei diversen Methoden im Laboralltag.

Ganz besonders danken möchte ich Frau Gabi Schon für die Hilfe bei organisatorischen Fragen und Problemen, einem offenen Ohr bei Krisen und der Versorgung mit Nervenfutter. Frau Antje Eiden-Plach, unserer Labor-Mama, danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung diverser Labormittel, wenn mal wieder etwas aus war, und die hilfreichen Ratschläge im Bereich der Molekularbiologie. Danke für´s Zuhören, Diskutieren, Lachen und die moralische Unterstützung!

Den Mädels unseres Labors Daniela Schmitz, Elisa Brill, Kerstin Ewen, Antje Eiden-Plach danke ich recht herzlich für eine angenehme Laboratmosphäre, ihre Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei Problemen im Laboralltag. Meinen Büronachbarn Kerstin Ewen, Yogan Khatri und Simone Anderko gilt dieser Dank ebenso. Frau Kerstin Ewen gilt darüber hinaus ein herzlicher Dank für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Michael Ringle bedanke ich mich für ein stets offenes Ohr bei chemischen Fragen und der ständigen Bereitschaft, bei HPLC-Problemen zu helfen. Ein herzlicher Dank geht an Daniela Schmitz, Sabrina Bleif und Michael Ringle für die Ablenkungen vom Laboralltag bei gemeinsamen Unternehmungen.

Der Interessengemeinschaft "Mittagessen-Competition" (Daniela Schmitz, Sabrina Bleif, Kerstin Ewen, Simone Anderko, Benjamin Stenger, Lina Schiffer, Giovanna Salamanca-Pinzón) danke ich für unterhaltsame Mittagspausen und den Austausch diverser Speisen.

Simone Anderko, Lina Schiffer und Jens Neunzig danke ich für die Geduld mit mir und das Vertrauen in mich als Betreuerin.

Allen nicht namentlich erwähnten Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre der letzten Jahre.

Meinen Freundinnen und Freunden danke ich recht herzlich für die Ablenkungen abseits des Labors und die moralische Unterstützung zur Beendigung dieser Arbeit.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine gesamte Familie, die an mich geglaubt und mich motiviert hat, weiterzumachen. Meinem Freund, Gregor Lipinski, möchte ich ganz besonders danken für die Unterstützung und die Motivation zum Durchhalten, auch über die weite Entfernung. Deine Geduld mit mir und meinem Wahnsinn weiß ich dabei sehr zu schätzen. Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern Elisabeth und Peter Hobler bedanken. Ich bin euch unendlich dankbar für die Unterstützung und das Vertrauen, das ihr mir entgegenbringt und für das Gefühl, dass alles gut wird!