

**Charakterisierung von CYP11B2 Mutanten in  
*Schizosaccharomyces pombe* und Analyse des  
Potentials der Hefe als  
18-Hydroxycorticosteron–Produzent**

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

**von  
Frau Dipl. Biol. Ming Kwai Giese**

**Saarbrücken  
2011**

---

**Tag des Kolloquiums:** 14.03.2012  
**Dekan:** Prof. Dr. Wilhelm F. Maier  
**Berichterstatter:** Prof. Dr. Rita Bernhardt  
Prof. Dr. Stefan A. Wudy  
**Vorsitz:** Prof. Dr. Uli Müller  
**Akad. Mitarbeiter:** Dr. Britta Diesel

---

*„Das Beginnen wird nicht belohnt, einzig und allein das Durchhalten.“*

Katharina von Siena

*„Erfolg bedeutet einmal mehr aufstehen als hinfallen.“*

unbekannt

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>10</b>
<b>Summary</b>	<b>11</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1 Cytochrome P450	12
1.2 Steroidhormone	16
1.3 Mineralocorticoide: Aldosteron	20
1.3.1 Renin–Angiotensin–Aldosteron–System	20
1.3.2 Wirkung des Mineralocorticoids Aldosteron	21
1.4 Humane CYP11B Isoenzyme	23
1.4.1 Genetik und Struktur	24
1.4.2 Hypoaldosteronismus	27
1.5 Heterologe Expression von CYP11B2	30
1.5.1 Zelllinien	30
1.5.2 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Spaltheefe)	32
1.5.3 <i>Escherichia coli</i>	34
1.6 Ziele der Arbeit	36
<b>2 Material &amp; Methoden</b>	<b>38</b>
2.1 Material	38
2.1.1 Nährmedien	38
2.1.2 Mikroorganismen	41
2.1.3 Oligonukleotide	41
2.1.4 <i>Shuttle</i> –Vektoren	44
2.2 Methoden	45
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	45

---

2.2.2	Mikrobiologische Methoden . . . . .	48
2.2.3	Analytik . . . . .	51
2.2.4	Statistische Signifikanz mittels $t$ -Tests für unabhängige Stichproben	55
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
3.1	Optimierung der Versuchsparameter . . . . .	58
3.1.1	Evaluierung verschiedener Vektoren zur heterologen Expression der humanen Aldosteronsynthese in <i>S. pombe</i> . . . . .	58
3.1.2	Optimierung der Substratkonzentration und Inkubationszeit . . . . .	64
3.1.3	Das <i>S. pombe</i> basierte Ganzzellsystem . . . . .	67
3.2	Evaluation des Ganzzellsystems anhand der CYP11B2 Mutanten . . . . .	68
3.2.1	Erstellung der pINT-CYP11B2 Mutanten und der dazugehörigen Hefestämme . . . . .	69
3.2.2	<i>S. pombe</i> -Ganzzellsystem: Biotransformation des DOC . . . . .	70
3.3	Eignung des Ganzzellsystems zur biotechnologischen Produktion von 18-Hydroxycorticosteron . . . . .	75
3.3.1	Generierung von CYP11B2 Mehrfachmutanten zur Aktivitätserhöhung	75
3.3.2	18OHB-Synthese: Biotransformation des DOC . . . . .	77
3.3.3	Optimierungsversuche des Ganzzellsystems bezüglich der 18OHB-Produktion . . . . .	81
3.3.4	Quantifizierung von 18-Hydroxycorticosteron . . . . .	85
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>88</b>
4.1	Bewertung des Ganzzellsystems . . . . .	90
4.1.1	Etablierung eines Ganzzellsystems mit R181W und R181Q . . . . .	91
4.1.2	Analyse der noch nicht untersuchten CYP11B2 Mutanten . . . . .	92
4.1.3	Vergleichende Analyse von CY11B2 Mutanten . . . . .	94
4.2	Bewertung der Eignung des Ganzzellsystems zur biotechnologischen Produktion von 18-Hydroxycorticosteron . . . . .	100
4.2.1	CMO II Mutation als Basis für die 18OHB-Produktion . . . . .	102
4.2.2	Erhöhung der Enzymaktivität durch rationales Proteindesign . . . . .	103

4.2.3	Optimierungsversuche des Ganzzellsystems bezüglich der 18OHB-Produktion . . . . .	106
4.3	Eignung von 18OHB zur biotechnologischen Produktion mittels Mikroorganismen . . . . .	109
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>111</b>
5.1	<i>S. pombe</i> als Modellorganismus zur Untersuchung von Enzymmutanten . . .	111
5.2	<i>S. pombe</i> als 18OHB-Produzent . . . . .	112
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>117</b>
	<b>Anhang</b>	<b>131</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>134</b>

# Abkürzungsverzeichnis

## Abkürzungen

$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
18OHB	18-Hydroxycorticosteron
ade	Adenin
AdR	Adrenodoxin-Reduktase
Adx	Adrenodoxin
Aldo	Aldosteron
Amp	Ampicillin
Arh1	Adrenodoxin Reduktase Homolog 1
B	Corticosteron
bp	Basenpaar
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
cDNA	<i>complementray DNA</i> , komplementäre DNS
CMO	Corticosteron-Methyloxidase-Defizienz
CYP	Cytochrom P450
CYP11B2	Aldosteronsynthase
DOC	Desoxycorticosteron
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA/DNS	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotid
etp1	electron transport protein 1
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fdx	Ferredoxin
FdR	Ferredoxin-Reduktase
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
his	Histidin

---

HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> ;
HSD	<i>Hydroxy steroid dehydrogenase</i> ; Hydroxysteroid-Dehydrogenase
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
leu	Leucin
nm	Nanometer
m	milli ( $10^{-3}$ )
min	Minuten
n	nano ( $10^{-9}$ )
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NNR	Nebennierenrinde
OD	<i>optical density</i> ; optische Dichte
p	piko ( $10^{-12}$ )
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerase Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenaktivität
Prog	Progesteron
RIA	<i>radio immuno assay</i> ; Radio-Immuno Test
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i> ; Einzelnukleotid-Polymorphismus
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SRS	<i>Substrate recognition site</i> ; Substraterkennungsstelle
TLC	<i>thin layer chromatographie</i> ; Dünnschichtchromatographie
U	<i>Units</i> ; Einheiten
UpM	Umdrehungen pro Minute
ura	Uracil
UV/Vis	Ultravioletter und visueller Wellenlängenbereich
WT	Wildtyp



**Abkürzungen für Aminosäuren**

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

# Zusammenfassung

CYP11B2 katalysiert die Aldosteron–Synthese von DOC über B und 18OHB. Da CYP11B2 Mutationen die Ursache für Aldosteronsynthase–Defizienz sind, liefern Studien zu Mutationen und ihren Folgen auf die Enzymaktivität wertvolle Beiträge für die Diagnose und Therapie von Hypoaldosteronismus.

In dieser Arbeit wird die Entwicklung eines schnellen und preiswerten Ganzzellsystem zur enzymatischen Analyse von CYP11B2 Mutanten vorgestellt. Das Prinzip beruht auf der heterologen Expression der Mutanten in *S. pombe*, gefolgt von der Analyse der CYP11B2–abhängigen Biotransformation von DOC. Nach Optimierung der Systemparameter wurden zehn CYP11B2 Mutationen untersucht. Vergleiche mit aus Zellkulturstudien gewonnenen Literaturdaten bestätigen die Eignung des Hefesystems zur Analyse der Effekte von CYP11B2 Mutationen. Somit stellt das etablierte System eine innovative, kostengünstige und Radioaktivitätsunabhängige Alternative zur Charakterisierung von CYP11B2 Mutanten dar.

Des Weiteren wurde mithilfe des zuvor etablierten Systems das biotechnologische Potential von *S. pombe* als 18OHB–Produzent untersucht. Hiefür wurden weitere 18 CYP11B2 Mutanten untersucht. Es musste jedoch festgestellt werden, dass neben der noch optimierungsbedürftigen Enzymaktivität ein weiterer limitierender Faktor darin besteht, dass 18OHB in wässrigem saurem Milieu dazu neigt, Umlagerungsprodukte zu bilden. Daher muss gefolgert werden, dass Mikroorganismen zum jetzigen Wissensstand zur 18OHB–Produktion ungeeignet sind.

# Summary

CYP11B2 catalyses the formation of aldosterone from DOC via B and 18OHB. Mutations in the CYP11B2 gene cause aldosterone synthase deficiency, so studies of their effect on the enzyme activity provide useful information for the diagnosis and therapy of hypoaldosteronism.

Here, the development of a fast and cost-efficient whole-cell system for the enzymatic characterisation of CYP11B2 mutants is described. The approach is based on the heterologous expression of the mutants in *S. pombe* combined with a subsequent biotransformation of DOC. After optimising the system parameters, ten CYP11B2 mutations were investigated. A comparison of the obtained results with previously described results from cell culture experiments confirmed the suitability of the yeast system for further studies on CYP11B2. Thus, an innovative, low-cost and non-radioactive alternative for the characterisation of CYP11B2 mutants was successfully established.

Furthermore, the biotechnological potential of *S. pombe* as 18OHB producer was assessed using the system described above. Therefore, another 18 CYP11B2 mutants were investigated. However, it was discovered that the biotechnological applicability of the system is severely limited not only by the unfavourable enzymatic activity, but also by the structural rearrangements 18OHB undergoes in aqueous acidic medium. Due to the latter point it has to be concluded that at least currently microorganisms seem to be generally unsuitable for 18OHB production.

# 1 Einleitung

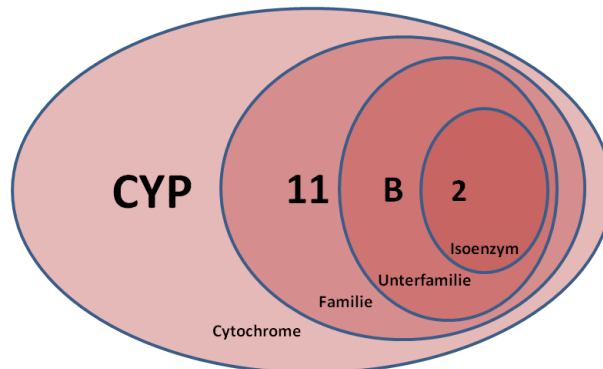
## 1.1 Cytochrome P450

Cytochrome (griech.: Präfix *Cyto-* = Zelle, *Chroma* = Farbe => Zellfarbstoff) sind farbige Proteine (Chromoproteine), die als prosthetische Gruppe ein Häm besitzen. Erstmals wurden Cytochrome von McMunn 1884 beschrieben (McMunn, 1885); ihre Bedeutung erkannte jedoch erst Keilin viele Jahre später (Keilin, 1925). Ihre Funktion liegt in der Übertragung von Reduktionsäquivalenten, bei der das Eisen-Ion des Häms die Oxidationsstufe wechselt. In Abhängigkeit von ihrem Häm-Typ zeigen Cytochrome charakteristische Absorptionsspektren, aufgrund derer sie in die Cytochrome *a*, *b*, *c* bzw. *d* eingeordnet werden (Margoliash & Schejter, 1984; Slater, 2003).

Reduzierte Cytochrome zeigen im Komplex mit Kohlenmonoxid in spektralphotometrischen Messungen ein Absorptionsmaximum bei 420 nm. Hierbei liegt proximal am zentralen Eisen (III) des Protoporphyrins IX ein Histidin als Ligand vor. Eine Ausnahme bilden die Cytochrome P450, deren Bezeichnung auf das Absorptionsmaximum bei 450 nm zurückgeht (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958). Die prosthetische Gruppe der Cytochrome P450 ist das Häm *b*, das auf nicht-kovalente Weise mit einem Cystein des Apoproteins interagiert. Die Interaktion des Thiolat-Anions des Cysteins mit dem zentralen Eisen (III) des Protoporphyrins IX führt zu dieser besonderen spektralen Eigenschaft (Omura & Sato, 1964a,b).

Die Cytochrome P450 stellen eine der größten und ältesten Gen-Superfamilien dar. In höheren Organismen nehmen Cytochrome P450 eine zentrale Stellung bei der Synthese und dem Metabolismus endogener Verbindungen, wie z.B. Cholesterol, den Steroidhormonen oder Vitamin D, ein. Darüber hinaus beteiligen sie sich am Metabolismus von Xenobiotika, zu denen beispielweise Pharmaka, Pestizide oder Konservierungsstoffe zählen (Bernhardt, 1996, 2006). Zurzeit sind 11294 Enzyme bekannt, die in 977 Familien unterteilt werden (Nelson, 2009). Diese große Anzahl an Enzymen erfordert eine einheitliche Nomenklatur.

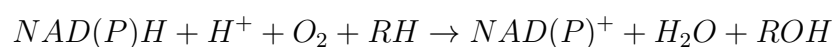
Die Nomenklatur und Einordnung der Cytochrome basiert auf Sequenzhomologien ihrer Aminosäuresequenzen (Nebert *et al.*, 1987) und wird im Folgenden am Beispiel des Cytochroms CYP11B2 näher erläutert (Abbildung 1.1):



**Abbildung 1.1: Nomenklatur von Cytochromen P450 am Beispiel von CYP11B2.**

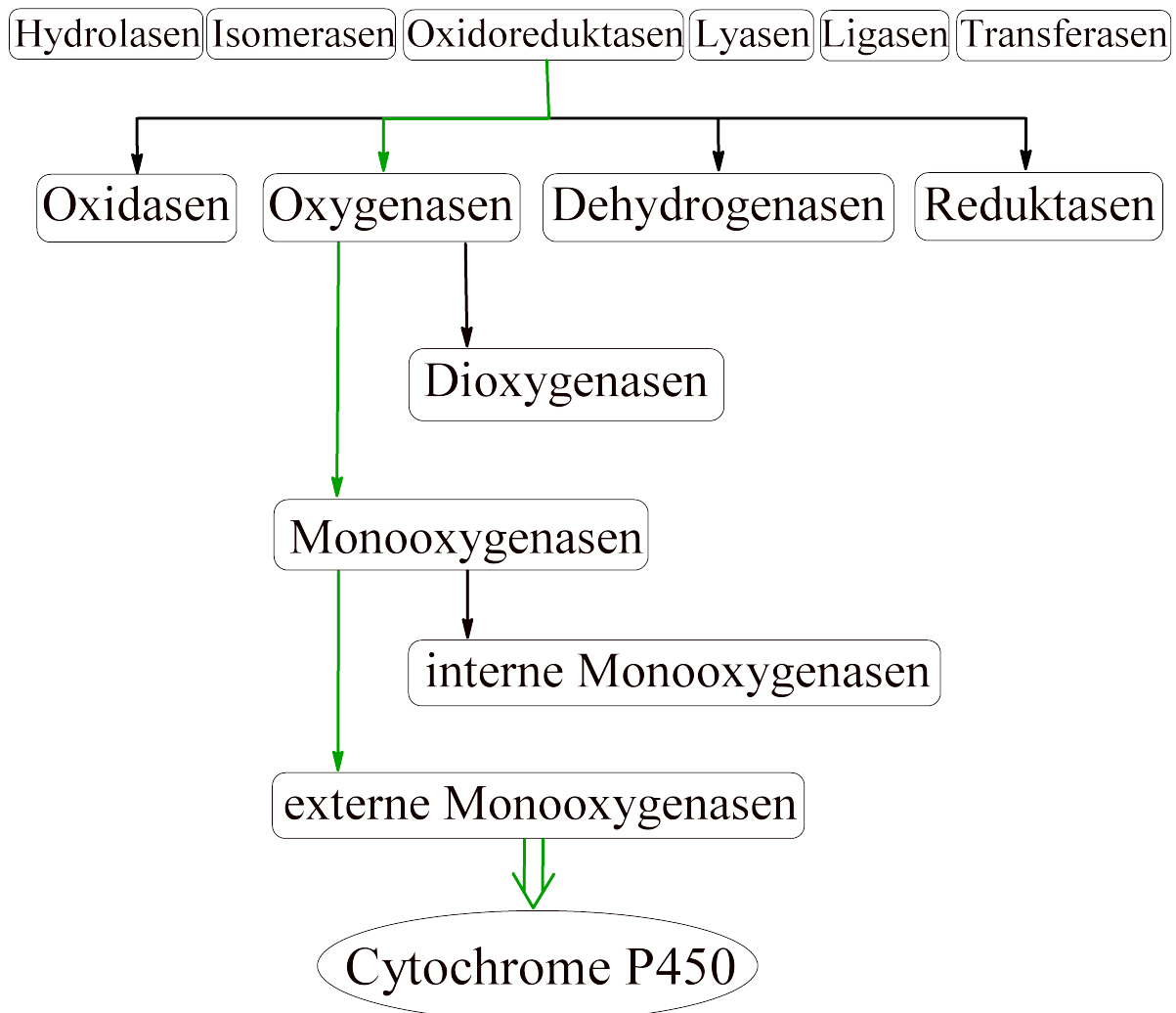
Alle Enzyme tragen die Bezeichnung CYP für **C**ytochrom **P**450, gefolgt von einer arabischen Zahl, welche die Familie kennzeichnet. Der Familienkennziffer folgt ein Buchstabe, der die Unterfamilie definiert. Mitglieder einer Familie weisen eine Sequenzübereinstimmung von mindestens 40% auf. Gibt es eine Übereinstimmung von 55% oder mehr, so gehören die Cytochrome derselben Unterfamilie an. Die Bezeichnung eines Cytochroms endet mit einer arabischen Ziffer, die das individuelle Isoenzym kennzeichnet. Die zugehörigen Gene werden kursiv dargestellt, wie z.B. *CYP11B2* für die Aldosteronsynthase.

Das Spektrum der von Cytochromen P450 katalysierten Reaktionen ist vielfältig. Es umfasst unter anderem Epoxidierungen, Hydroxylierungen, Peroxidierungen, Desaminierungen, N-, S- und O- Desalkylierungen, N- und S- Oxidationen und Azo-, Nitro- und Carbonylreduktionen (Ruckpaul, 1993; Bernhardt, 1996, 2006). Hierbei reduzieren Cytochrome P450 den molekularen Sauerstoff. Dabei wird eines der Sauerstoffatome in das Substrat (RH) integriert, während das zweite Sauerstoffatom in Verbindung mit Wasserstoff als Wasser aus der Reaktion hervorgeht:



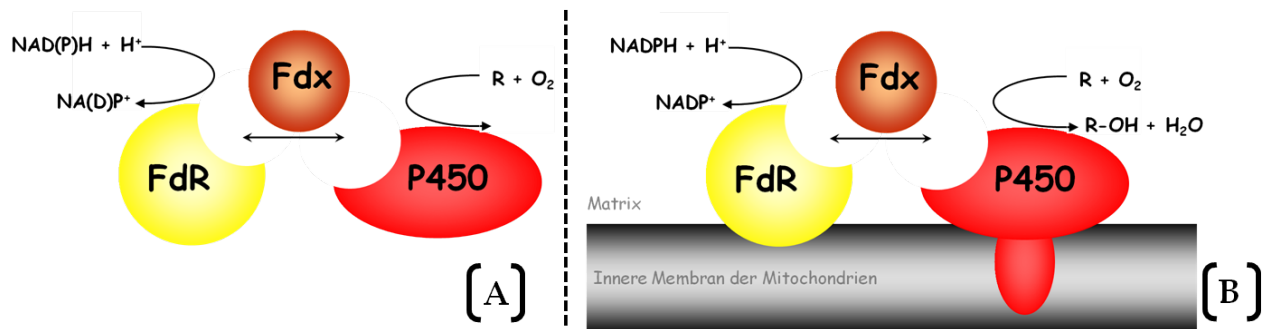
Die hierfür benötigten Elektronen werden nicht aus dem Substrat selbst bezogen, sondern stammen von externen Elektronendonatoren wie z.B. NAD(P)H. Cytochrome P450

werden daher der Klasse der externen Monooxygenasen zugeordnet (Abbildung 1.2) (Hayaishi & Nozaki, 1969).



**Abbildung 1.2: Klassifizierung der Cytochrome P450 als externe Monooxygenasen.**

Die Cytochrome P450 können jeweils nur ein Elektron aufnehmen. In den meisten Fällen dient NAD(P)H als primärer Elektronenlieferant, welches seinerseits jedoch nur paarweise Elektronen abgibt. Diese Problematik wird durch ein oder mehrere Proteine, die zum Transfer der Elektronen auf das Cytochrom vorgeschaltet sind, gelöst. Bislang sind hinsichtlich des Elektronentransportsystems zehn unterschiedliche Klassen bekannt (Hannemann *et al.*, 2007). Im Fokus dieser Arbeit steht das mitochondriale CYP11B2. Deswegen wird im Folgenden nur auf die Hauptklasse I des Elektronentransfersystems, das bakterielle/mitochondriale System, eingegangen (Abbildung 1.3):



**Abbildung 1.3: Darstellung des Elektronentransfersystems der Klasse I (Hannemann *et al.*, 2007):**

A: Bakterielles System mit seinen löslichen Komponenten

B: Mitochondriales System mit dem membran-gebundenen P450, der membran-assoziierten FdR und dem löslichen Fdx.

Die Elektronen vom NAD(P)H werden von einer Ferredoxin-Reduktase (FdR) einzeln auf ein Ferredoxin (Fdx) übertragen, welches die Elektronen an ein Cytochrom P450 weiterleitet. Das bakterielle System unterscheidet sich von dem mitochondrialen System lediglich dadurch, dass alle seine Komponenten löslich im Cytosol vorliegen, während im mitochondrialen System nur das Ferredoxin löslich ist. Die Reduktase ist im mitochondrialen System über ionische Wechselwirkungen an die Membran assoziiert (Hanukoglu, 1992; Ishimura & Fujita, 1997) und das Cytochrom ist über eine spezielle Sequenz in der Membran verankert (Gunsalus & Sligar, 1978; Bernhardt, 1996, 2006).

Im Menschen sind Cytochrome P450 der Klasse I an der Biosynthese von Steroiden, Vitamin D und Gallensäure beteiligt (Ruckpaul & Rein, 1990). Es wird nachfolgend auf die Biosynthese der Steroidhormone näher eingegangen.

## 1.2 Steroidhormone

Hormone (griech: *horman*: antreiben, erregen) werden nach ihrer chemischen Zusammensetzung in drei größere Hauptklassen eingeteilt:

- Peptidhormone (Hormone des Hypothalamus, der Hypophyse und des Pankreas wie z.B. Insulin),
- vom Tyrosin abstammende Aminhormone (z.B. Dopamin, Adrenalin und Schilddrüsenhormone wie z.B. Thyroxin) und
- Steroidhormone.

Hormone entfalten ihre Wirkung durch ihre Bindung an verschiedene Rezeptoren, welche die Signale an die Zielzellen weiterleiten. Peptidhormone als hydrophile Hormone binden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, da sie nicht in der Lage sind, die hydrophobe Doppelschicht der Plasmamembran zu passieren. Dagegen können hydrophobe Hormone wie die Steroidhormone die Zellmembran durchqueren und an intrazelluläre Rezeptoren binden. Der im Zellkern vorliegende Komplex aus Hormon und intrazellulärem Rezeptor beeinflusst dann die Transkription von Genen (Klinke & Silbernagl, 2003). Die Steroidhormone lassen sich in Abhängigkeit von ihrer Bindung an ihre Rezeptoren wie folgt einteilen:

**Tabelle 1.1: Klassifizierung der Steroidhormone nach ihrer Bindung an die Steroidrezeptoren.**

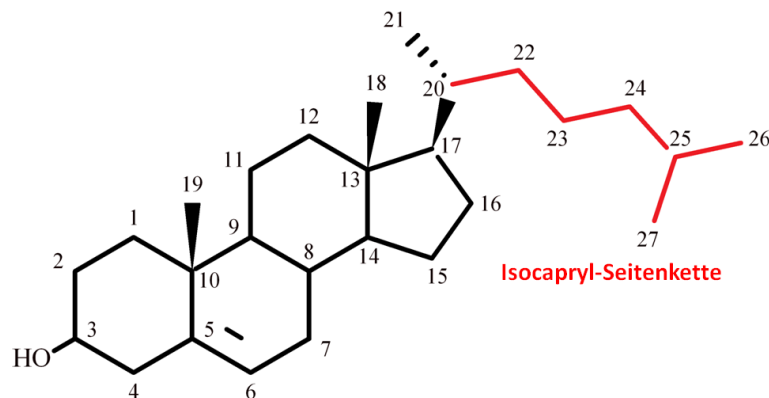
Die Gluco- und Mineralocorticoide werden als Corticoide und die Androgene, Estrogene und Gestagene als Sexualhormone zusammengefasst.

Steroidhormon	Hauptsyntheseorgan	Vertreter
Glucocorticoide	Nebennierenrinde, <i>Zona fasciculata</i>	Cortison
Mineralocorticoide	Nebennierenrinde, <i>Zona glomerulosa</i>	Aldosteron
Androgene	Testes, Nebennierenrinde	Testosteron
Estrogene	Ovaria	Estron, Estradiol
Gestagene	Plazenta	Progesteron

Cytochrome P450 sind maßgeblich an der Steroidhormon-Biosynthese beteiligt, die hauptsächlich in der Nebennierenrinde und den Gonaden, Ovaria und Testes sowie während der Schwangerschaft in der Plazenta erfolgt. Als Vorläufermolekül aller Steroidhormone dient das Cholesterol (Abbildung 1.4), welches entweder *de novo* im glatten endo-



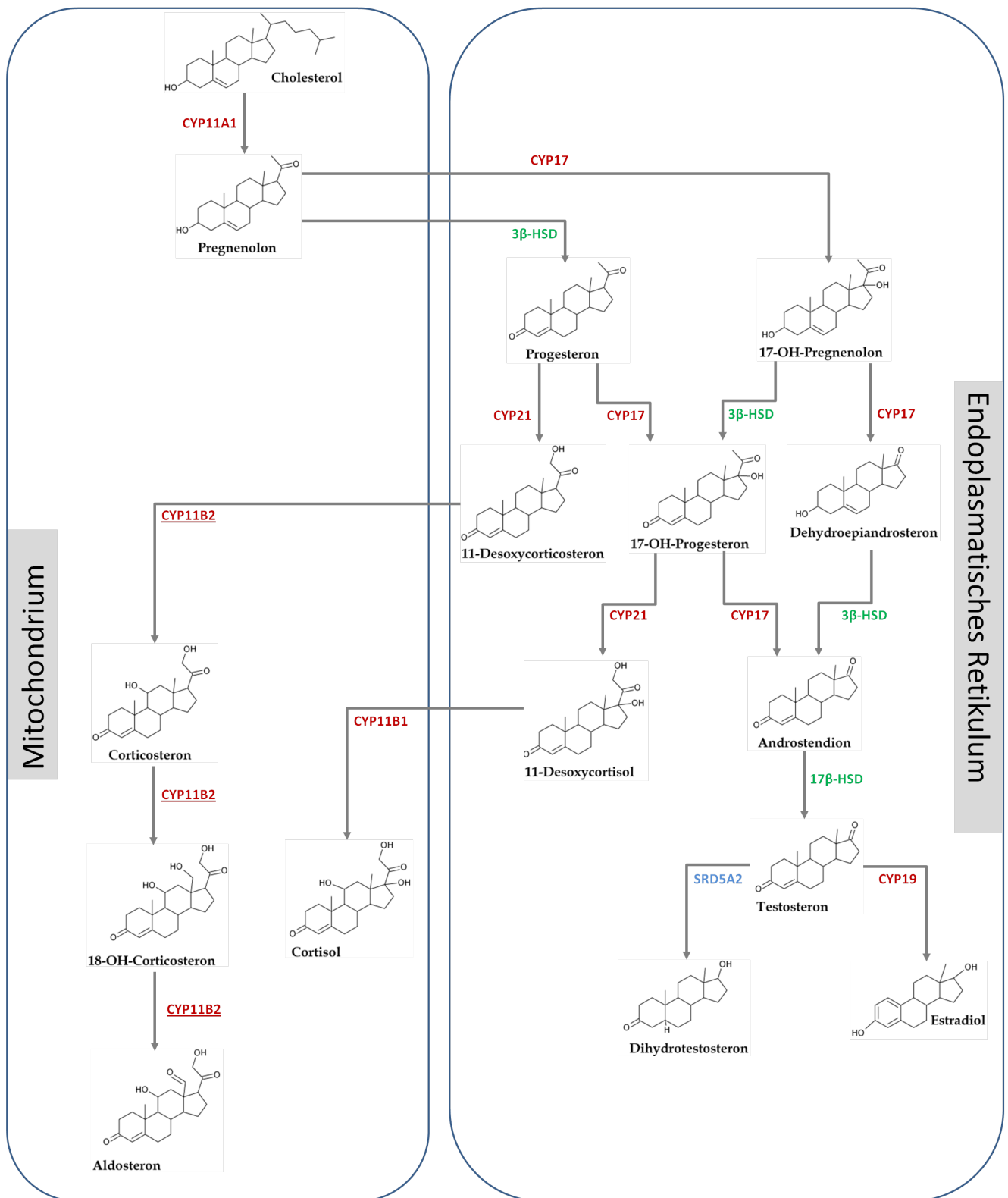
plasmatischen Retikulum (ER) gebildet oder als Cholesterylester in Lipoproteinpartikeln aus dem Blutkreislauf entnommen wird.



**Abbildung 1.4: Cholesterol als Ausgangssubstanz der Steroidhormon-Biosynthese.**

Darstellung des Moleküls mit der Nummerierung seiner C-Atome nach der IUPAC-Regelung. Die Isocapryl-Seitenkette, die von CYP11A1 abgespalten wird, ist rot hervorgehoben.

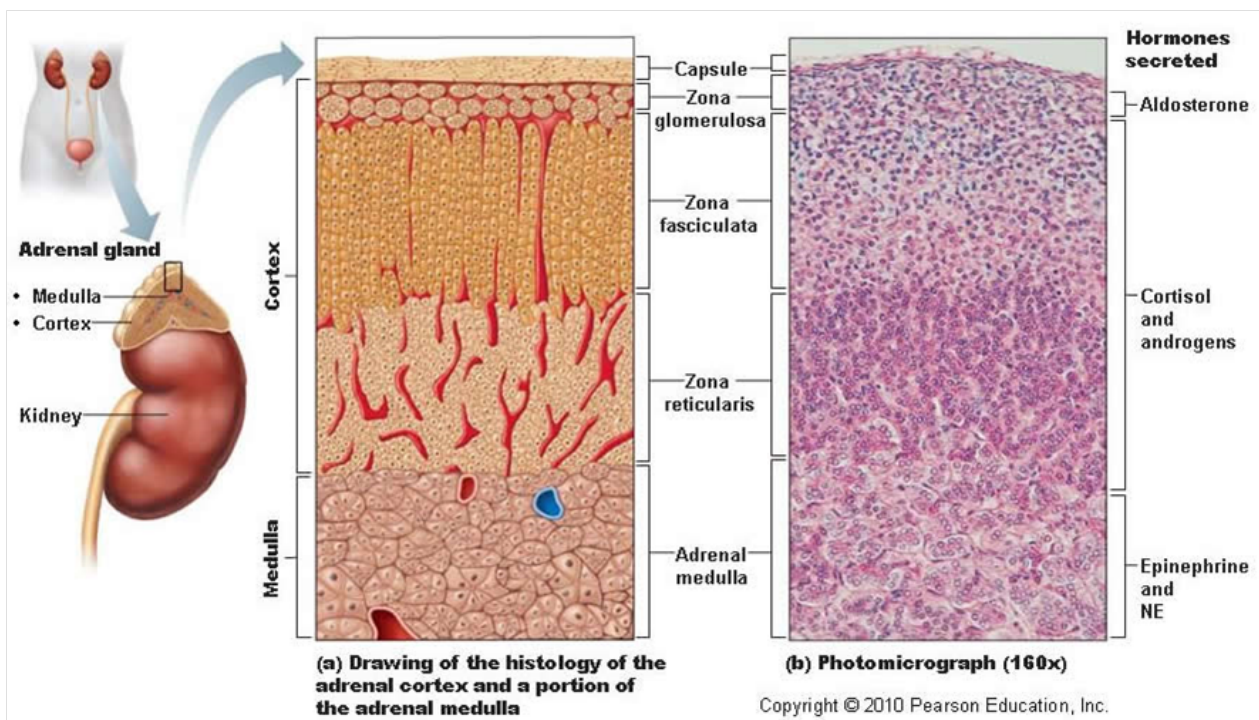
Das Cholesterol wird über Transport-Lysosomen durch das Cytosol zum Mitochondrium befördert, wo der erste Schritt der Steroidhormon-Biosynthese durch das Enzym CYP11A1 initiiert wird. CYP11A1 befindet sich an der inneren Mitochondrienmembran. Die Beförderung des Cholesterols von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran erfolgt durch das ***Steroid acute regulatory protein*** (StAR) (Kallen *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2010; Miller, 2011). Nach dem StAR-vermittelten Transport des Cholesterols erfolgt die Abspaltung der Isocapryl-Seitenkette durch CYP11A1 (Abbildung 1.4) und die Bildung von Pregnenolon. Die anschließenden Modifikationen finden im ER statt (Abbildung 1.5). Die Bildung der Sexualhormone in den Gonaden erfordert zunächst eine  $17\alpha$ -Hydroxylierung des Pregnenolons. Anschließend finden noch eine  $3\beta$ -Oxidation, eine Verschiebung der Doppelbindung und abschließend die Abspaltung der Seitenkette am  $C_{17}$  statt, so dass Androstendion vorliegt. Dieses dient als Ausgangssubstrat bei der Synthese der verschiedenen weiblichen und männlichen Sexualhormone. Die Synthese der Gluco- und Mineralocorticoide erfordert den Rücktransport des entsprechenden Steroid-Intermediates ins Mitochondrium. Die spezielle Differenzierung dieser beiden Steroidhormone spiegelt sich auch in einer anatomischen und regulatorischen Differenzierung der Nebennierenrinde wider.



**Abbildung 1.5: Steroidhormon-Biosynthese.**

Die Biosynthese der Steroidhormone erfolgt in den Mitochondrien und am glatten endoplasmatischen Retikulum. Neben den Cytochromen P450 (in rot dargestellt) sind auch Dehydrogenasen (in grün dargestellt: 3 $\beta$ -HSD, 17 $\alpha$ -HSD) und die Steroid-5 $\alpha$ -Reduktase (in blau dargestellt: SRD5A2) an der Steroidhormon-Biosynthese beteiligt.

Die **Nebennierenrinde** (NNR) lässt sich aufgrund ihres Erscheinungsbilds und der Anordnung der Zellen in drei heterogene Zonen gliedern. Von außen nach innen werden sie als *Zona glomerulosa*, *Zona fasciculata* und *Zona reticularis* bezeichnet und nehmen 15%, 65% bzw. 7% des Volumens der Nebenniere ein. Die restlichen 13% werden vom Nebennierenmark beansprucht (Abbildung 1.6) (Junqueira & Carneiro, 2004). Die Bildung der Mineralocorticoide erfolgt in der *Zona glomerulosa*, in der keine  $17\alpha$ -Hydroxylase exprimiert wird. In der *Zona fasciculata* werden die  $17\alpha$ -Hydroxylase und die  $11\beta$ -Hydroxylase exprimiert, so dass hier die Synthese der Glucocorticoide stattfindet. Zum Nebennierenmark hin liegt die letzte Schicht der NNR, die *Zona reticularis*, in der vorwiegend Androgene wie etwa Dehydroepiandrosteron gebildet werden. Die in der NNR gebildeten Steroidhormone werden auch als Corticosteroide (lat. *cortex*= Rinde; gr. *stereos* = fest) bezeichnet.



**Abbildung 1.6: Nebennierenrinde<sup>1</sup>.**

Die Nebenniere als paarige Hormondrüse befindet sich auf den oberen Pol beider Nieren und besteht aus zwei funktionell verschiedene Organe: Die Nebennierenrinde ist für einen Großteil der Steroidhormon-Biosynthese verantwortlich. Das Nebennierenmark wird dem sympathischen Nervensystem zugeordnet und bildet Adrenalin und Noradrenalin.

Nachfolgend wird das Mineralocorticoid Aldosteron näher beschrieben.

<sup>1</sup> Quelle:  
<http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio211/chap16/chap16.htm>

## 1.3 Mineralocorticoide: Aldosteron

Aldosteron ist das stärkste Mineralocorticoid, das nach seiner Synthese in der Nebennierenrinde über das Blut zur Niere gelangt. Beim Menschen ist die Aldosteron-Konzentration (Plasmakonzentration: 55-330 pmol/l), im Vergleich zur Cortisol-Konzentration (Plasmakonzentration: 55-690 nmol/l), etwa 1000-mal niedriger (Siegenthaler & Blum, 2006) und wird über Angiotensin II und der Kalium-Konzentration im Plasma reguliert: Die Kalium-Ionen des Blutes wirken direkt auf die *Zona glomerulosa* der NNR und initiieren die Aldosteron-Sekretion. Das Mineralocorticoid führt zur Rückresorption von Natrium, wodurch es aufgrund einer Rückkopplungshemmung zur Abnahme der Aldosteron-Sekretion kommt. Die Regulation der Aldosteronsynthese erfolgt durch das **Renin-Angiotensin-Aldosteron-System** (RAAS).

### 1.3.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Angiotensinogen entsteht als Peptidhormon hauptsächlich in der Leber und zirkuliert im Blutplasma als Pro-Protein des RAAS (Abbildung 1.7). Sinkt der Blutdruck, so sezerniert die Niere die Aspartylprotease Renin in den Blutkreislauf. Das Renin spaltet am N-Terminus des Angiotensinogen das Dekapaptid Angiotensin I ab. Anschließend spaltet die Peptidase *Angiotensin-conversion-enzyme* (ACE) am C-Terminus des Angiotensins I ein Dipeptid ab, so dass aktives Angiotensin II gebildet wird.

Die Bindung von Angiotensin II an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor aktiviert die Phospholipase C, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), das Phospholipid der Zellmembran, zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. IP<sub>3</sub>, als lösliche Komponente, diffundiert von der Membran und bewirkt die intrazelluläre Freisetzung von Calcium-Ionen, während DAG in der Membran bleibt und die Proteinkinase C aktiviert. Damit wird die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration erhöht (Arai & Escobedo, 1996). Die Ca<sup>2+</sup>-Ionen binden an das Calmodulin, das dann wiederum die Calmodulin-abhängige Proteinkinase, eine Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase, aktiviert (Pezzi *et al.*, 1997). Die Funktion der Proteinkinase C ist ebenfalls von Ca<sup>2+</sup>-Ionen abhängig. Am Ende der Signalkaskade wird die Transkription von *CYP11B2* stimuliert (Clyne *et al.*, 1996), das für die Bildung von Aldosteron essentiell ist.

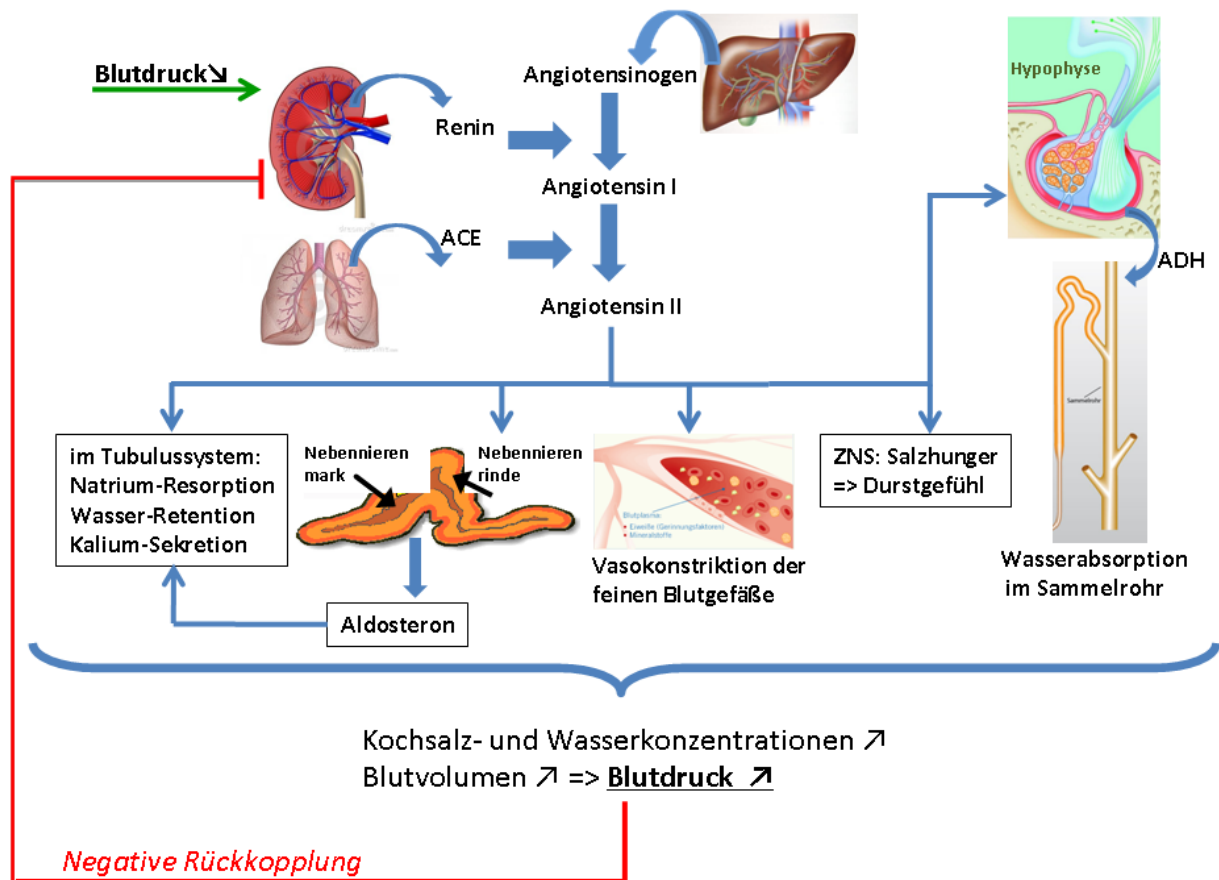


Abbildung 1.7: Renin–Angiotensin–Aldosteron–System<sup>2</sup>

Erläuterung der Abkürzungen in der Abbildung:

ACE: Angiotensin-konvertierendes Enzym (*Angiotensin Converting Enzyme*),

ADH: antidiuretischen Hormon,

ZNS: Zentralnervensystem

### 1.3.2 Wirkung des Mineralocorticoids Aldosteron

In der Niere fördert Aldosteron die Resorption von Natrium-Ionen und die Sekretion von Kalium-Ionen. Hierbei wird Wasser rückresorbiert, das Plasmavolumen steigt und als Folge steigt ebenfalls der Blutdruck (Abbildung 1.7). Die Wirkung der Steroidhormone beruht auf der Bindung an spezifische Rezeptoren, die ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren darstellen und damit eine Signalkaskade auslösen. Ligandenfreie Steroidhormon-Rezeptoren liegen als Multiproteinkomplex im Cytoplasma in inaktiver und ligandenaffiner

<sup>2</sup>Quelle:

Lunge & Niere: <http://de.dreamstime.com>

Leber: <http://p2news.com/gesundheit-fitne-ss/leberwerte-sind-wissenswert>

Hypophyse: [http://www.clipart.dk.co.uk/422/subject/Biology/Pituitary\\_gland](http://www.clipart.dk.co.uk/422/subject/Biology/Pituitary_gland)

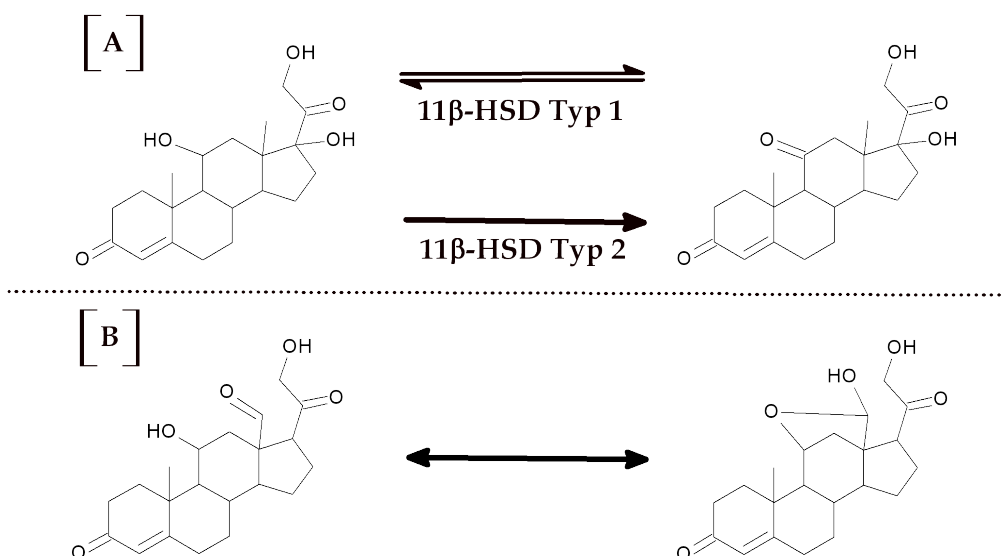
Sammelrohr: <http://www.nierenforschung.de/index.php/fuseaction/scaleup/scaleupID/248/Die%20Niere%20und%20ihre%20Funktion.htm>

Nebennierenrinde: <http://www.merian.fr.bw.schule.de/Beck/skripten/12>

Blutgefäß: [http://www.haemophilie-life.de/Patientenbereich\\_Haemophilie\\_Bluterkrankheit/p\\_haemophilie\\_blutstillung.aspx](http://www.haemophilie-life.de/Patientenbereich_Haemophilie_Bluterkrankheit/p_haemophilie_blutstillung.aspx)

Konformation vor (Pratt, 1993). Chaperone ermöglichen dem Rezeptor den entsprechenden Liganden zu erkennen und zu binden. Zudem sind die Chaperone dafür verantwortlich, dass der transkriptionsregulierende Teil inaktiviert vorliegt (Pratt & Welsh, 1994; Morishima *et al.*, 2001). Die Bindung des Hormons an den Rezeptor führt zur Translokation des Komplexes in den Zellkern, wo er am Kontrollelement der DNA bindet und somit die Expression des betreffenden Gens reguliert.

Im Fall von Aldosteron kann der Mineralocorticoid-Rezeptor auch mit Glucocorticoiden interagieren (Arriza *et al.*, 1987; Evans & Arriza, 1989). Die mineralocorticoide Wirkung von Glucocorticoiden im Organismus ist aber sehr schwach ausgeprägt, da in den Mineralocorticoid-sensitiven Zellen 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD) exprimiert wird (Krozowski, 1999; Krozowski *et al.*, 1999). 11 $\beta$ -HSD wandelt spezifisch die Glucocorticoide Cortisol (und Corticosteron) in eine Rezeptor-inaktive Form um (Abbildung 1.8: A). Aldosteron ist aufgrund der hochreaktiven Aldehydgruppe am C<sub>18</sub>-Atom kein Substrat der 11 $\beta$ -HSD. Die Aldehydgruppe zyklisiert mit der C<sub>11</sub>-Hydroxygruppe des Aldosterons (Abbildung 1.8: B) und das vorliegende Halbacetal schützt das Molekül vor der Inaktivierung durch die Dehydrogenase (Funder *et al.*, 1988).



**Abbildung 1.8: A: Cortisol (links) und dessen inaktive Form Cortison (rechts).**

Während 11 $\beta$ -HSD Typ 1 die Reaktion in beide Richtungen katalysieren kann, handelt es sich bei 11 $\beta$ -HSD Typ 2 um eine reine Dehydrogenase.

**B: Die Tautomerie von Aldosteron.**

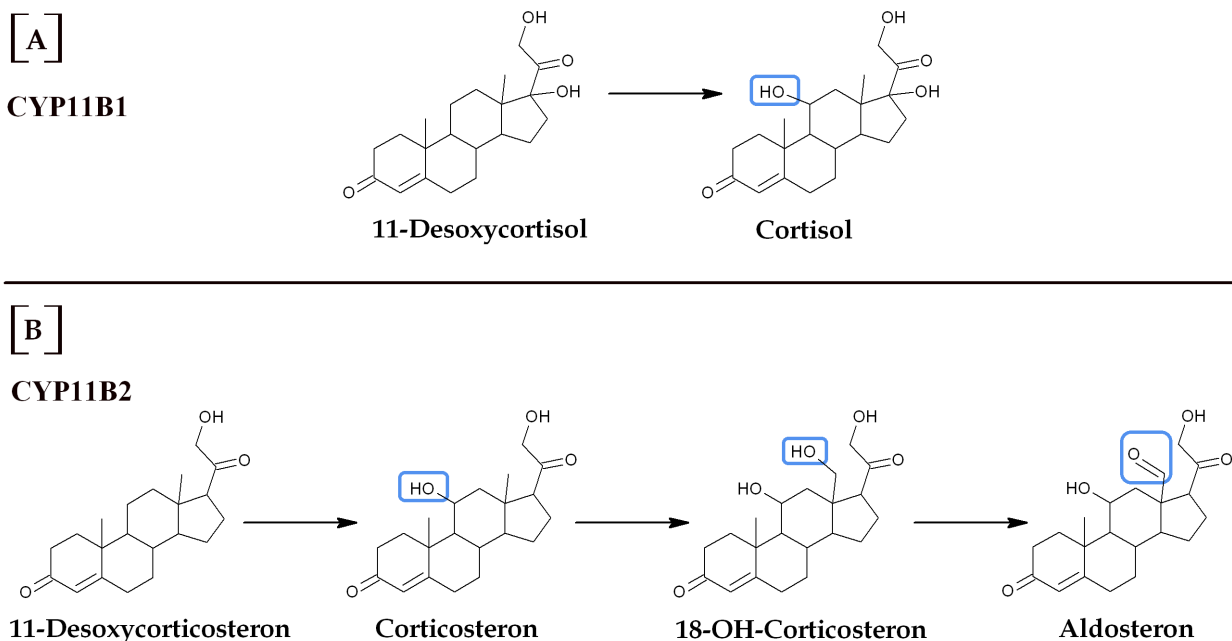
Aldosteron liegt im Gleichgewicht als Hydroxyaldehyd (links) und Halbacetal (rechts) vor.

## 1.4 Humane CYP11B Isoenzyme

Die Steroidhormon-Biosynthese erfordert die Aktivität von drei mitochondrialen Cytochrom P450 Enzymen: CYP11A1, CYP11B1 und CYP11B2 (vgl. Abbildung 1.5).

Obwohl die beiden CYP11B Enzyme die gleiche Anzahl an Aminosäuren aufweisen, zeigen beide in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterschiedliche Molekulargewichte von 50 kDa (CYP11B1) und 48,5 kDa (CYP11B2) (Curnow *et al.*, 1991; Ogishima *et al.*, 1991). Die genaue Ursache hierfür ist unbekannt. Möglicherweise sind posttranslationale Modifikationen oder unterschiedliche Sekundärstrukturen hierfür verantwortlich (White *et al.*, 1994).

CYP11B1 katalysiert hauptsächlich die 11 $\beta$ -Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol (RSS) bzw. 11-Desoxycorticosteron (DOC) zu Cortisol (Abbildung 1.9: A) bzw. Corticosteron (B) (Abbildung 1.9: B).



**Abbildung 1.9: A: Umsatz von Desoxycortisol (RSS) zu Cortisol.**

Die Synthese wird von der 11 $\beta$ -Hydroxylase (CYP11B1) katalysiert.

**B: Umsatz von Desoxycorticosteron (DOC) zu Aldosteron.**

Die Reaktion wird von der Aldosteronsynthase (CYP11B2) über die Bildung der zwei Intermediate Corticosteron (B) und 18-Hydroxycorticosteron (18OHB) katalysiert.

Weiterhin kann die 11 $\beta$ -Hydroxylase einiger Organismen an der Position C<sub>18</sub> sowohl von DOC als auch B eine Hydroxygruppe anfügen. Diese 18-Hydroxylierungsaktivität von CYP11B1 ist im Vergleich zu CYP11B2 jedoch nur sehr schwach ausgeprägt. Eine

CYP11B1 katalysierte Oxidationsreaktion ist nicht bekannt (Kawamoto *et al.*, 1990, 1992). CYP11B2 ist eine schwächere 11 $\beta$ -Hydroxylase mit zusätzlichen 18-Hydroxylase- und insbesondere 18-Oxidaseaktivitäten. CYP11B2, ebenfalls bekannt als Aldosteronsynthase, katalysiert den Umsatz von 11-Desoxycorticosteron zu Aldosteron über Corticosteron und 18-Hydroxycorticosteron (Abbildung 1.9: B) (Kawamoto *et al.*, 1990, 1992). Das Intermediat B zeigt *in vitro* eine viel geringere Affinität zum Enzym als das natürliche Substrat DOC (Hobler *et al.*, 2010). Es wird angenommen, dass die Synthese von Aldosteron aus DOC über drei Reaktionsstufen abläuft, die unmittelbar nacheinander, ohne Dissoziation der Intermediate aus der Substratbindungstasche, stattfinden.

Beide CYP11B Isoformen sind weiterhin in der Lage, neben den bekannten Positionen C<sub>11</sub> und C<sub>18</sub> auch C<sub>19</sub> zu hydroxylieren, so dass aus DOC die Nebenprodukte 18-Hydroxy-11-desoxycorticosteron bzw. 19-Hydroxy-11-desoxycorticosteron entstehen können (Kawamoto *et al.*, 1990, 1992).

### 1.4.1 Genetik und Struktur

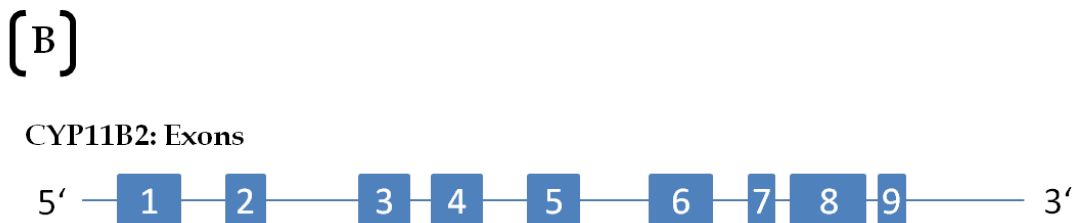
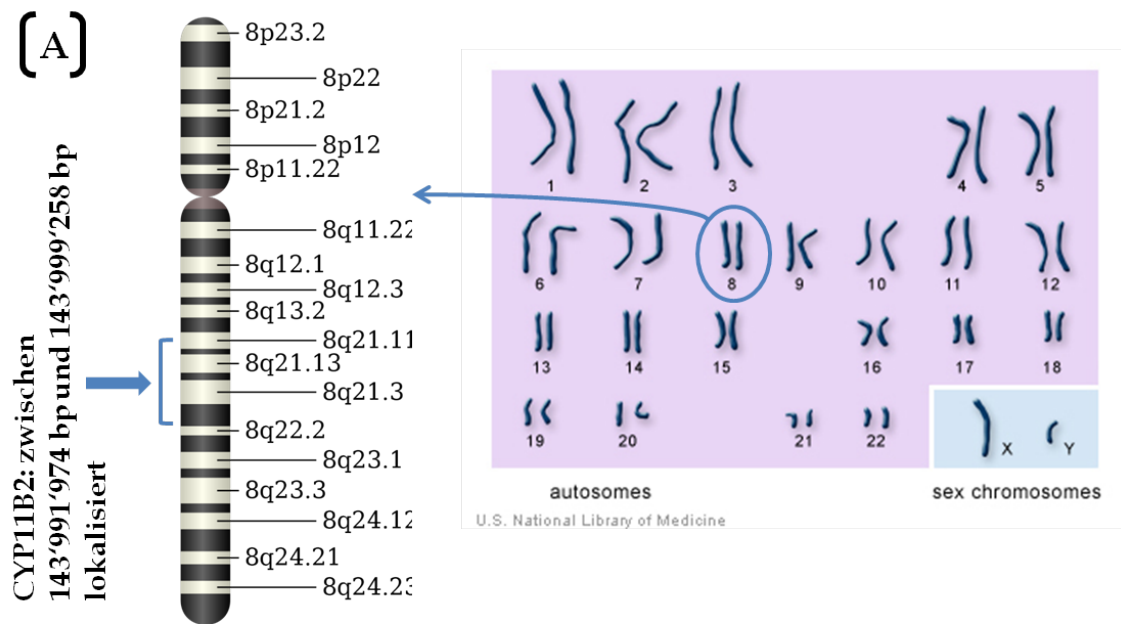
*CYP11B1* und *CYP11B2* liegen nebeneinander auf dem Chromosom 8q22 (Mornet *et al.*, 1989). Jedes Gen umfasst eine sich auf etwa 7 kb erstreckende Region, die 9 Exons enthält (Abbildung 1.10).

Die Nukleotidsequenzen der Introns stimmen zu 90% überein. Bei den Exons beträgt diese Übereinstimmung sogar 95% (Mornet *et al.*, 1989). Der markanteste Unterschied zwischen beiden Enzymen ist die Insertion von 442 bp im Intron 5 des *CYP11B2*. Der hohe Grad an Sequenzhomologie lässt vermuten, dass beide Gene durch Duplikation aus einem Ur-Gen entstanden sind. Daher werden die CYP11B Gene auch als Zwillingsgene bezeichnet (Helmberg, 1993). Während die Gene inkl. der Introns einen hohen Grad an Homologie aufweisen, zeigen die 5'-regulatorischen Sequenzen nur 48% Homologie.

Die Primärstrukturen der beiden CYP11B Isoenzyme sind zu 93% identisch (Mornet *et al.*, 1989; Kawamoto *et al.*, 1990). Im Prä-Protein sind von den 503 nur 32 Aminosäuren unterschiedlich. Die abweichenden Aminosäuren liegen vor allem am N-Terminus beider Proteine. Drei davon befinden sich in der mitochondrialen Signalsequenz, die insgesamt 24 Aminosäuren lang ist. Eine Matrix-lokalisierte Peptidase spaltet die N-terminale *Targeting-*



Sequenz ab und das mature Protein ist in der inneren Mitochondrienmembran zur Matrixseite hin lokalisiert (Lithgow *et al.*, 1995; Pfanner *et al.*, 1994; Stuart *et al.*, 1994). Die übrigen 479 Aminosäuren bilden das Apoprotein, und die 29 divergierenden Aminosäurereste sind wahrscheinlich für die unterschiedlichen Aktivitäten von CYP11B1 und CYP11B2 verantwortlich (Kawamoto *et al.*, 1990).



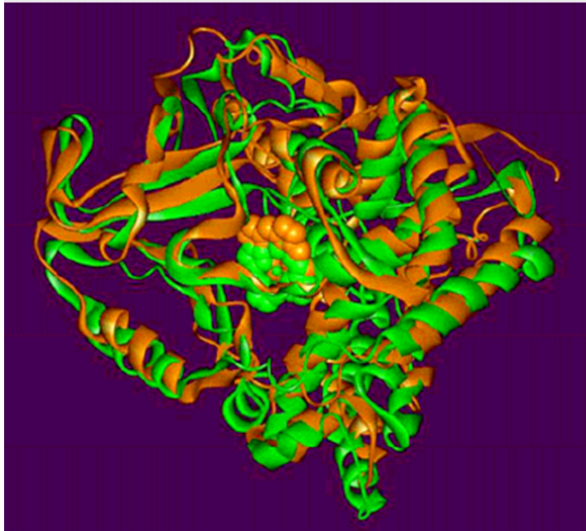
**Abbildung 1.10: A: Position von CYP11B2 auf Chromosom 8 bzw. im Karyogramm.<sup>3</sup> B: Schematische Darstellung der 9 Exons und 8 Introns im CYP11B2.**

Aufschluss über den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion der humanen CYP11B Isoenzyme könnten Kristallstrukturen liefern. Die bisherigen Versuche dazu schlugen allerdings fehl, da es bis vor kurzem nicht möglich war, ausreichende Mengen der Proteine heterolog zu exprimieren und zu reinigen (siehe Abschnitt 1.5.3). Außerdem ist im Allgemeinen die Bestimmung der 3-dimensionalen Struktur von Membranproteinen mittels röntgenkristallographischer Methoden schwierig bis nicht durchführbar. NMR-Messungen sind nur bei kleinen Molekülen möglich. Daher wurde ein Homologie-Modell erstellt, das auf bereits bekannten Strukturen bakterieller Cytochrome zurückgreift. Das

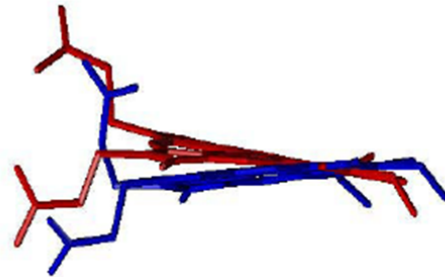
<sup>3</sup>Quelle: <http://ghr.nlm.nih.gov> (National Library of Medicine)

aktuelle Homologie–Modell für CYP11B1 und CYP11B2 zeigt, dass ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Enzyme die Position des Häms ist (Abbildung 1.11) (Belkina *et al.*, 2001).

**(A)**



**(B)**



**Abbildung 1.11: A: Überlagerung der Bänderdiagramme von humanem CYP11B1 (grün) und CYP11B2 (orange).**

Die 3-dimensionalen Modelle wurden anhand einer Homologie–Modellierung entwickelt (Belkina *et al.*, 2001).

**B: Position des Häms im aktiven Zentrum von CYP11B1 (blau) bzw. CYP11B2 (rot).**

Die Lage des Häms in CYP11B1 bzw. CYP11B2 variiert um etwa  $20^\circ$ , bedingt durch die Häm–Bindungsschleife (Abbildung 1.11: B). Die Aminosäureseitenketten um das Häm und die daraus resultierenden Wasserstoffbrückenbindungen zeigen für CYP11B1 ein großräumigeres aktives Zentrum als für CYP11B2. Bei CYP11B1 sind Arg448 und Arg384 mit je einer Häm–Propionat–Gruppe über Wasserstoffbrücken verbunden, während beim CYP11B2 beide Bindungen mit Arg448 stattfinden. Mutationen an diesen beiden Stellen führen zu einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität, der auf eine Destabilisierung des Holoenzym zurückzuführen ist (Curnow *et al.*, 1993; Nakagawa *et al.*, 1995; Geley *et al.*, 1996; White *et al.*, 1991). Aufgrund der unterschiedlichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Arg384, Arg448 und dem Häm–Propionat wird angenommen, dass das aktive Zentrum von CYP11B2 kleiner ist als das von CYP11B1. Diese Annahme wird gestützt, wenn man die Substrate der CYP11B Isoenzyme betrachtet: RSS besitzt aufgrund der Hydroxygruppe am C<sub>17</sub> ein größeres Volumen als DOC (Abbildung 1.9), so dass das aktive Zentrum von CYP11B1 größer sein muss als das aktive Zentrum von CYP11B2 (Belkina

*et al.*, 2001).

Störungen im Aldosteronstoffwechsel können zum Hyper- oder Hypoaldosteronismus führen. Sowohl Hyper- als auch Hypoaldosteronismus werden jeweils in zwei Formen unterteilt. Da im Rahmen der Dissertation CYP11B2 Mutationen untersucht werden, die bei den Patienten zum Hypoaldosteronismus führen, wird im Folgenden Hypoaldosteronismus näher beschrieben.

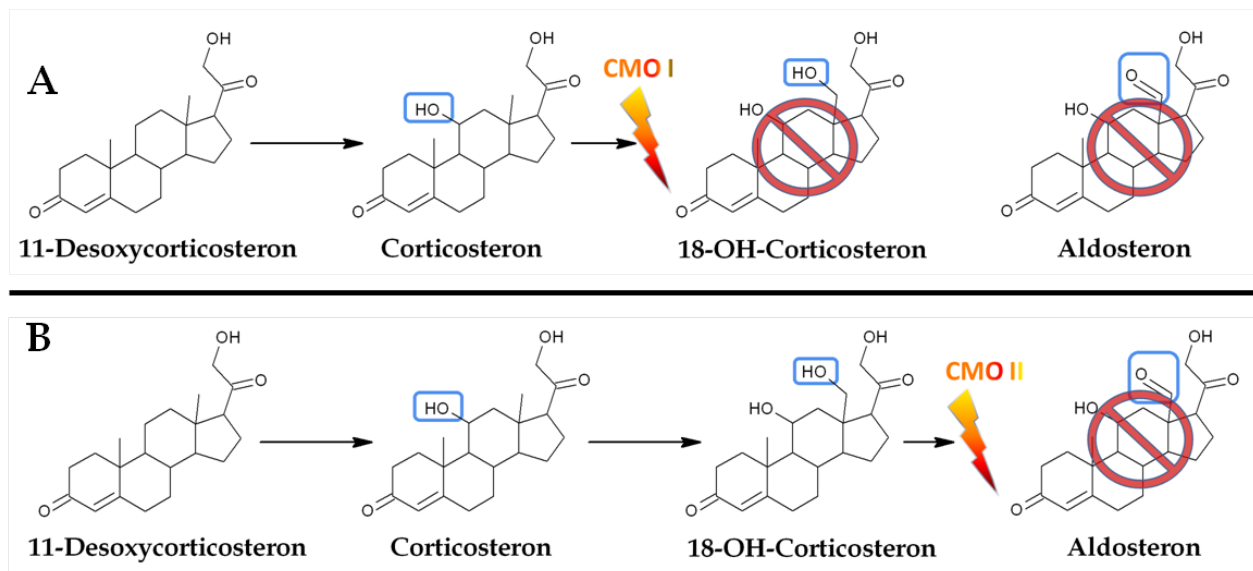
### 1.4.2 Hypoaldosteronismus

Beim Hypoaldosteronismus wird zwischen der primären und sekundären Form differenziert. Die Ursachen der sekundären Form von Hypoaldosteronismus sind vielfältig. Ihre Gemeinsamkeit liegt in der fehlenden bzw. sehr niedrigen renalen Reninproduktion, d.h. das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist fehlerhaft bzw. unwirksam.

Bei der primären Form liegt entweder eine Schädigung des Nebennierengewebes vor oder es handelt sich um eine kongenitale Störung der Aldosteron-Biosynthese. Oftmals führt eine fehlerhafte 21-Hydroxylase zur Krankheit, so dass neben dem Hypoaldosteronismus auch Hypokortisolismus vorliegen kann. Nur in wenigen Fällen beruht die Erkrankung auf einem Defekt der letzten beiden Schritte in der Aldosteronsynthese. Im Gegensatz zur sekundären Form ist die renale Reninsekretion bei der primären Form in der Regel extrem gesteigert. Das Blut der Betroffenen zeigt ein Aldosteron-Defizit aufgrund einer mangelhaften Aldosteron-Syntheserate (Visser & Cost, 1964; Ulick, 1996). Kongenitaler Hypoaldosteronismus oder Aldosteronsynthesemangel wurde 1964 erstmals von Visser und Cost dokumentiert (Visser & Cost, 1964). Damals wurde angenommen, dass der erste Schritt der Aldosteronsynthese, die 11 $\beta$ -Hydroxylierung von 11-Desoxycorticosteron durch das bereits bekannte CYP11B1 katalysiert wird und die letzten beiden Schritte durch zwei unterschiedliche Enzyme, die Corticosteron-Methyloxidase I (CMO I) und die 18-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (CMO II), katalysiert werden (Ulick, 1976). 1996 wurde jedoch nachgewiesen, dass auch die letzten drei Schritte der Aldosteronsynthese von einem einzigen Enzym, der Aldosteronsynthase, katalysiert wird. Seitdem ist die Krankheit unter der Bezeichnung Aldosteronsynthase-Defizienz Typ I (CMO I) und Typ II (CMO II) bekannt (Ulick, 1996). Beide Erkrankungen

werden autosomal rezessiv an die Nachkommen weitergegeben.

Die Gemeinsamkeit bei den beiden Formen der Aldosteronsynthese-Defizienz ist eine reduzierte oder kaum bis gar nicht vorhandene Aldosteronsynthese-Aktivität und ein erhöhter Corticosteronlevel in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde (Peter *et al.*, 1998). Biochemisch ist CMO I dadurch gekennzeichnet, dass im Blutplasma des Patienten kaum Aldosteron vorzufinden ist, die 18OHB-Konzentration einen niedrigen bis normalen Level aufweist und erhöhte Werte von 11-Desoxycorticosteron bzw. Corticosteron vorliegen (siehe Tabelle 1.2). Die Aldosteronsynthese ist entweder gar nicht aktiv oder nur selektiv (Abbildung 1.12). Dies betrifft insbesondere die beiden Aktivitäten am C<sub>18</sub>.



**Abbildung 1.12: CYP11B2 katalysierte Reaktion.**

A: Beim CMO I findet nur die Synthese von B statt, die anschließende Hydroxylierung am C<sub>18</sub> findet nicht mehr statt.

B: Beim CMO II erfolgt nach der Bildung von 18OHB keine Oxidation am C<sub>18</sub> statt.

Charakteristisch für CMO II ist die extrem hohe Konzentration an 18OHB, sowohl im Urin als auch im Blutserum der Patienten. Somit weisen die Blutseren der Patienten mit CMO II einen sehr hohen Wert für 18OHB/Aldo und niedrigen Wert für B/18OHB auf (siehe Tabelle 1.2).

Die eindeutige Diagnose im Hinblick auf die Unterscheidung zwischen CMO I und CMO II wird über das Verhältnis von Plasma Corticosteron zu 18-Hydroxycorticosteron getroffen. Liegt der Wert über 40, so deutet dies auf CMO I hin, während das Verhältnis von Plasma Corticosteron zu 18-Hydroxycorticosteron bei CMO II unter 10 liegt (siehe Tabelle 1.2).

**Tabelle 1.2: Gehalt an Tetrahydro–Metabolite im Urin mittels Gaschromatographie–Massenspektrometrie (GC–MS) ermittelt.<sup>4</sup>**

THmetab = Tetrahydro–Metabolite; B = Corticosteron; 18OHB = 18-Hydroxycorticosteron; Aldo = Aldosteron

	<b>B THmetab</b> [ $\mu\text{g}/24\text{h}$ ]	<b>18OHB</b> <b>THmetab</b> [ $\mu\text{g}/24\text{h}$ ]	<b>Aldo</b> <b>THmetab</b> [ $\mu\text{g}/24\text{h}$ ]	<b>B/18OHB</b> <b>Quotient</b>	<b>18OHB/Aldo</b> <b>Quotient</b>
Normalwerte	13,8 - 117	3,0 - 20,0	0,2 - 20,0	$7,8 \pm 3,1$	$3,34 \pm 1,28$
CMO I Patient	$2870 \pm 735$	$42,9 \pm 25,1$	0	$84 \pm 36$	$\infty$
CMO II Patient	$2930 \pm 1250$	$1590 \pm 1090$	$7,67 \pm 4,87$	$1,76 \pm 0,86$	$207 \pm 106$

Während das Steroidprofil eine eindeutige Zuordnung beider Erkrankungen erlaubt, sind sie symptomatisch nicht voneinander zu differenzieren. Da in beiden Fällen ungenügend Aldosteron gebildet wird, kommt es zu gravierenden Folgen bezüglich der Salz- und Flüssigkeitshomöostase (*Salt wasting*: Hyperkaliämie, Hyponaträmie, metabolische Akzidose und intrazelluläre Hydratation). Insbesondere bei Neugeborenen stellt diese Krankheit eine lebensbedrohliche Situation dar, die eine sofortige Behandlung erfordert. Betroffene zeigen, je nach der Schwere des Enzymdefekts, nach wenigen Tagen oder Wochen erste Symptome. Die Beschwerden sind Erbrechen und Dehydratation, die aufgrund des hohen Flüssigkeitsverlusts zu Zyanose, Tachykardie und niedrigem Blutdruck führen. Die Patienten müssen unter Umständen lebenslang Mineralocorticoid, z.B. in Form von Fludrocortison, zu sich nehmen. Die Symptome schwächen sich mit dem Alter des Patienten ab, da die Niere auf Aldosteron unabhängige  $\text{Na}^+$ -Resorption zurückgreifen kann (Rösler, 1984; Kayes-Wandover *et al.*, 2001). Ein weiterer Grund wäre eine Proliferation der *Zona glomerulosa* sein, so dass mit der vermehrten Expression von CYP11B2 eine höhere Aldosteron–Konzentration im Organismus vorliegen könnte. Bislang wurde eine Vielzahl an Mutationen beschrieben, die bei Patienten zu Aldosteronsynthese–Defizienz führen (vgl. Tabelle 3.4).

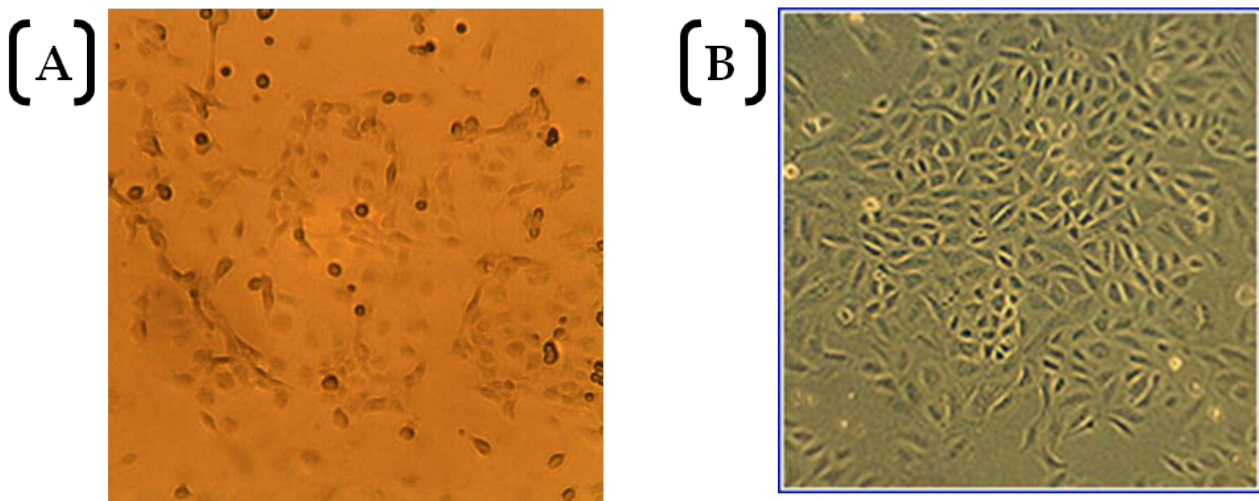
<sup>4</sup>Die Daten stammen aus dem Steroid- und Peptidhormonlabor von Prof. Dr. S.A. Wudy, Kinderklinik Gießen, Universitätsklinikum Giessen, Deutschland.

## 1.5 Heterologe Expression von CYP11B2

Bis vor kurzem war man nicht in der Lage, das humane CYP11B2 in prokaryotischen Systemen heterolog zu exprimieren. Das Hauptproblem lag darin, dass CYP11B2 ein Membranprotein ist, das normalerweise in der Mitochondrienmembran verankert ist. Die heterologe Expression des Membranproteins in *E. coli* führte zur Proteinaggregation in Form von unlöslichen Einschlusskörperchen. Daher stammen die Ergebnisse zu Varianten des humanen CYP11B2 aus Untersuchungen mit transient transformierten Zelllinien.

Die Grundlagenforschung erfolgte mit isoliertem Enzym aus tierischen Quellen (Wada *et al.*, 1985; Ogishima *et al.*, 1989b,a). Weitere Erkenntnisse zum Verständnis der Enzymfunktion gewann man aus den Untersuchungen von CYP11B2 aus anderen Spezies, wie z.B. der Ratte (Nonaka *et al.*, 1998), die ebenfalls über CYP11B Isoformen verfügen. Im Folgenden werden allgemeine Vor- und Nachteile der Proteinexpression in den entsprechenden Wirten vorgestellt.

### 1.5.1 Zelllinien



**Abbildung 1.13: A: COS-7 Zellen: Fibroblasten-Zellen aus Nierengewebe von grünen Meerkatzen.<sup>5</sup>  
B: V79-Zellen: Fibroblasten-Zellen aus der Lunge von chinesischen Hamstern.<sup>6</sup>**

Zelllinien sind immortalisierte (unsterbliche) Zellen, wie z.B. Tumorzellen oder Zellen, die gezielt durch Mutationen verändert wurden, so dass sie sich unendlich teilen könnten.

<sup>5</sup>Quelle: [http://ascentgene.com/images/COS-7\\_cells13mod.jpg](http://ascentgene.com/images/COS-7_cells13mod.jpg)

<sup>6</sup>Quelle: [http://spectraservices.com/Merchant2/merchant.mvc?Screen=PROD&Product\\_Code=AXVR25](http://spectraservices.com/Merchant2/merchant.mvc?Screen=PROD&Product_Code=AXVR25)

Zellkulturen werden häufig als Testsysteme eingesetzt um z.B. die Auswirkungen von Substanzen auf die Zelle hinsichtlich Signalübertragung und Toxizität zu überprüfen. Ihr Vorteil gegenüber anderen Expressionssystemen ist vor allem die Fähigkeit, posttranslationale Modifikationen durchzuführen. Große Nachteile sind die geringen Ausbeuten an rekombinanten Proteinen und die aufwendige und teure Kultivierung der Zelllinien. So erfordert die Kultivierung spezielle Brutschränke, die eine ständige CO<sub>2</sub>-Begasung erlauben, sowie komplexe und kostenintensive Medien. Im Vergleich zu *E. coli* ist die Zellkultur in ihrer Handhabung aufwendiger und weist längere Generationszeiten auf. Insbesondere ist die Zellkultur äußerst anfällig für Kontaminationen. Mycoplasmen stellen hier ein häufiges Problem dar. Mycoplasmen-Infektionen sind speziell problematisch, da sie oftmals lange unentdeckt bleiben. Erst wenn die Mycoplasmen die Wirtszellen überwachsen, ist der Befall offensichtlich.

Die bisher publizierten Analysen von CYP11B2 Mutationen/Varianten erfolgten nur auf Basis von transient transfizierten Zelllinien. Typische Zelllinien sind dabei COS-Zellen (Dunlop *et al.*, 2003; Pascoe *et al.*, 1992), MA-10 (Zhang *et al.*, 1995) und HCT116 p53/- (Nguyen *et al.*, 2008) Zellen. Hierbei ist die intrinsische Menge an Elektronentransferproteinen für eine optimale Elektronenübertragung auf die mitochondrialen Steroidhydroxylasen unzureichend (Zuber *et al.*, 1988). Daher wurden, mit Ausnahme der MA-10 Zelllinie (Zhang *et al.*, 1995; Fardella *et al.*, 1995), in allen Transfektionsstudien zusätzliche Elektronentransferproteine co-exprimiert, um die Aktivität der Cytochrome P450 zu stimulieren (Nguyen *et al.*, 2010; Dunlop *et al.*, 2003).

Die Etablierung stabil transfizierter Zelllinien ist sehr aufwendig und vor allem zeitintensiv. Trotzdem konnte eine stabile Expression von CYP11B2 in V79-Zellen erreicht werden (Denner *et al.*, 1995). Damit können Inhibitor-Effekte von Arzneimitteln und physiologischen Substanzen auf das humane CYP11B2 untersucht werden (Denner *et al.*, 1995; Ehmer *et al.*, 2002; Hakki & Bernhardt, 2006).

Die Ausbeute von heterolog exprimierten Proteinen ist in der Zellkultur minimal, weswegen Untersuchungen zur Enzymaktivität in der Regel mit radioaktiv markiertem Substrat durchgeführt werden müssen. Ein weiterer Nachteil ist die Existenz endogener Cytochrome der Säugerzellen, die einen Einfluß auf die Substratumsätze nehmen können. Es müssen daher stets Kontrollen zur Verrechnung des Hintergrunds mitgeführt werden.

## 1.5.2 *Schizosaccharomyces pombe* (Spaltheefe)



Abbildung 1.14: Spaltheefe<sup>7</sup>

Erstmals wurde die Spaltheefe *S. pombe* Ende des 19. Jahrhunderts von Lindner aus ostafrikanischem Hirsebieer isoliert und beschrieben. Der Name Spaltheefe bzw. *Schizosaccharomyces pombe* weist auf die Art ihrer Vermehrung hin, die durch Querteilung der Mutterzelle erfolgt (Lindner, 1893). (altgr.: *Schizo-* = abspalten; Swahili: *pombe* = Bier)

Molekularbiologisch und genetisch ist *S. pombe* gut charakterisiert. Ihr Genom wurde 2002 komplett sequenziert (Wood *et al.*, 2002). Das haploide Genom, bestehend aus drei Chromosomen, weist 4929 offene Leserahmen auf, von denen

aber nur 4824 Proteine codieren (Moreno *et al.*, 1991; Wood *et al.*, 2002).

Die Hefe bildet das Bindeglied zwischen prokaryotischen und eukaryotischen (Insekten- und Säugerzellen) Expressionssystemen für rekombinante Proteine (Voedisch *et al.*, 2005). Als Einzeller mit einer geringen Zellgröße weist *S. pombe* eine kurze Generationszeit (zwischen 2–4 Stunden) auf und ist zudem einfach zu kultivieren. Aufgrund ihres GRAS-Status ("**g**enerally **r**egarded **a**s **s**afe") kann *S. pombe* uneingeschränkt für gentechnische Arbeiten und biotechnologische Produktionen verwendet werden.

Untersuchungen zeigten, dass *S. pombe* größere Ähnlichkeiten zu höheren Eukaryoten aufweisen als *S. cerevisiae*. Die Spleiß-Sequenzen der Introns in *S. pombe* ähneln denen der Säuger-Gene (Russell & Nurse, 1986). Des Weiteren ähneln die posttranslationalen Modifikationen heterolog exprimierter Proteine in *S. pombe* denen von Säugerzellen (Russell & Nurse, 1986; Chappell & Warren, 1989; Moreno *et al.*, 1991; Giga-Hama & Kumagai, 1997).

Die Verwendung des Organismus in der Grundlagenforschung führte zur Etablierung umfangreicher molekularbiologischer und genetischer Instrumente (Moreno *et al.*, 1991; Alfa *et al.*, 1993). Die genannten Sachverhalte machen die Spaltheefe zum geeigneten Modellorganismus zur Expression und funktionellen Charakterisierung von Säugerproteinen (Giga-Hama & Kumagai, 1997). So sprechen auch viele Argumente für die Expression mit-

<sup>7</sup>Quelle:  
<http://www.umassmed.edu/bmp/faculty/rhind.cfm?start=0>



ochondrialer Cytochrome P450 in *S. pombe*.

Die Spaltheefe *S. pombe* verfügt über ein endogenes mitochondriales Elektronentransfersystem, bestehend aus *etp1* und *Arh1*, so dass sich die zusätzliche Coexpression von Elektronenüberträgern erübrigt (Bureik *et al.*, 2002; Schiffler *et al.*, 2004; Ewen *et al.*, 2008). Die mitochondrialen und intrazellulären Membranstrukturen von *S. pombe* weisen eine höhere Homologie zu eukaryotischen Zellen auf, als es z.B. in *S. cerevisiae* der Fall ist (Chappell & Warren, 1989; Sankoff *et al.*, 1992). Zusätzlich eignet sich *S. pombe* für die heterologe Expression und Untersuchung humaner Steroidhydroxylasen, da *S. pombe* selbst keine Steroidhydroxylasen und mitochondrialen Cytochrome P450 exprimiert und nur über zwei endogene CYPs verfügt, die jedoch der Klasse II (mikrosomale Cytochrome P450) angehören. Diese beiden Cytochrome, CYP51 (*Erg11*) und CYP 61 (*Erg5*), sind an der Ergosterol-Biosynthese beteiligt (Wood *et al.*, 2002). Bisherige Untersuchungen zeigen keinen Umsatz von DOC, der auf die endogenen Cytochrome der Spaltheefe zurückzuführen wäre (Bureik *et al.*, 2002). Es konnten bereits eine Vielzahl humaner mikrosomaler und mitochondrialer Cytochrome in *S. pombe* erfolgreich heterolog exprimiert werden (Yamazaki *et al.*, 1993; Bureik *et al.*, 2002; Dragan *et al.*, 2005).

Interessant sind auch *S. pombe* Biotransformationen mithilfe von Ganzzellsystemen, die vor allem in verschiedenen Screeningverfahren erfolgreich eingesetzt werden konnten (Ehmer *et al.*, 2002; Bureik *et al.*, 2004; Appel *et al.*, 2005; Ulmschneider *et al.*, 2005; Dragan *et al.*, 2005; Hakki *et al.*, 2011).

Ein weiterer denkbarer Einsatz von *S. pombe* liegt in der Biotechnologie, etwa bei der Herstellung von Diagnostika (= Rote Biotechnologie). Die Herstellung chemischer Verbindungen (= Weiße Biotechnologie), deren industrielle Synthese sehr aufwendig (Einführung von Schutzgruppen) und somit kostenintensiv ist, stellt ebenfalls ein mögliches Anwendungsgebiet von *S.pombe* dar.

### 1.5.3 *Escherichia coli*

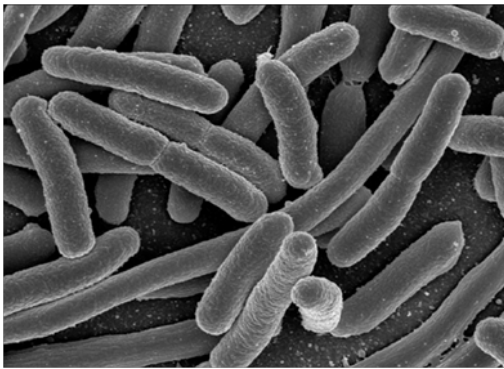


Abbildung 1.15: *Escherichia coli*<sup>8</sup>

Das Gram-negative Enterobakterium (griech: *Enteron* = Darm) ist die in der Molekularbiologie am häufigsten verwendete Bakterienart und der wohl am besten untersuchte Organismus weltweit. Beckwith gelang 1969 die Isolierung des einzigen Chromosoms, das als eines der ersten Genome komplett sequenziert wurde (Blattner *et al.*, 1997). Seine sehr kurze Generationszeit von 20 Minuten und einfache Kultivierung machen *E. coli* zu einem

der weit verbreitetsten Organismen in der Bio- und Gentechnologie. Die Überexpression rekombinanter Proteine und ihre darauffolgende Isolierung aus *E. coli* Zellen gelingen meist sehr einfach.

Ein großer Nachteil beim Einsatz von *E. coli* als Expressionsorganismus eukaryotischer Proteine ist jedoch die fehlende posttranslationale Modifikation der produzierten Proteine. Die entstandenen Proteine können deswegen fehlgefaltet vorliegen und Funktionalitätsstörungen aufzeigen. Die Insuffizienz zur korrekten Proteinfaltung führt oftmals dazu, dass eukaryotische Proteine in *E. coli* nicht selten in sogenannten *inclusion bodies* aggregieren (Mitraki *et al.*, 1991). Hierbei handelt es sich um Einschlusskörperchen, in denen die produzierten Proteine fehlerhaft gefaltet und vernetzt vorliegen und damit einhergehend auch inaktiv sein können. Die Isolierung und Wiederherstellung aktiver Proteine erfordert die komplexe Rückfaltung des fehlerhaft gefalteten Proteins (Mayer & Buchner, 2004; Buchner & Rudolph, 1991; Shi *et al.*, 1997). Der Vorteil von Einschlusskörperchen ist die isolierte und konzentrierte Ansammlung des gewünschten Proteins und damit der Schutz vor cytoplasmatischen Proteasen (Swamy & Goldberg, 1982). Da die Einschlusskörperchen nicht wasserlöslich sind, lassen sie sich leicht aus den Zellen gewinnen.

Des Weiteren weisen Prokaryoten und Eukaryoten eine unterschiedliche Codon Usage (= Codon Bias) auf, die einen erheblichen Einfluss auf die Effizienz der Translation und der Proteinfaltung haben kann (Hannig & Makrides, 1998; Gustafsson *et al.*, 2004). Sol-

<sup>8</sup>Quelle:  
[http://www.bioschema.de/wp-content/uploads/2009/02/e\\_coli.jpg](http://www.bioschema.de/wp-content/uploads/2009/02/e_coli.jpg)

len eukaryotischen Proteine heterolog in *E. coli* exprimiert werden, so muss oftmals eine Codon-Anpassung durchgeführt werden.

Die rekombinanten Proteine werden nicht ins Medium sekretiert, sondern liegen im Cytoplasma vor oder werden in den periplasmatischen Raum sekretiert (Baneyx, 1999). Im Periplasma können die heterolog exprimierten Proteine unter Ausbildung von Disulfidbrücken korrekt gefaltet werden. Zusätzlich unterstützen endogene Chaperone die korrekte Proteinfaltung (Bradwell *et al.*, 1991; Langer *et al.*, 1992), die im Cytoplasma aufgrund der reduzierenden Bedingung nicht möglich ist. Zudem existieren im periplasmatischen Raum weniger endogene Proteine, was die anschließende Reinigung des rekombinanten Proteins erleichtert. Ebenso ist der Gehalt von Proteasen im Periplasma geringer als im Cytoplasma, wodurch der Grad einer proteolytischen Degradation des exprimierten Proteins minimiert wird (Talmadge & Gilbert, 1982).

Mitochondriale Cytochrome P450 sind als Membranproteine nur schwer heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Hobler gelang es kürzlich mit Hilfe von Chaperonsystemen funktionales humanes CYP11B2 in *E. coli* zu exprimieren (Hobler *et al.*, 2010). Nach der Isolierung aus *E. coli* und Reinigung des Proteins werden zurzeit *in vitro* Untersuchungen durchgeführt, deren Ergebnisse Aufschlüsse über die Beziehung zwischen Struktur-Funktion geben sollen. Die Untersuchungen *in vitro* mittels eines rekonstituierten Systems mit NADPH als Elektronenquelle und dessen Regenerationssystem sind kostenintensiv und eignen sich nicht zur biotechnologischen Anwendung. Jedoch sind die gewonnen Erkenntnisse unverzichtbar, um Enzyme in ihrer Funktion zu verstehen. Zudem ist die Strukturaufklärung nur mit hoch reinem, hoch konzentriertem Protein durchführbar.

## 1.6 Ziele der Arbeit

Aldosteron ist als stärkstes Mineralocorticoid an der Regulation der Salz- und Flüssigkeitshomöostase beteiligt. Die Biosynthese dieses Steroidhormons findet in der Nebennierenrinde, konkret in der *Zona glomerulosa*, statt und wird abschließend von CYP11B2 katalysiert. Desoxycorticosteron wird dabei über einen 3-stufigen Reaktionsmechanismus zu Aldosteron umgewandelt. Hierbei entstehen nacheinander die Intermediate Corticosteron und 18-Hydroxycorticosteron. Mutationen im *CYP11B2* führen u.a. zu einer Aldosteronsynthese-Defizienz, auch bekannt als **Corticosteron-Methyloxidase-Defizienz**, kurz CMO. Dabei werden zwei Typen des CMO unterschieden. Bei Typ I kommt es entweder zu einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität oder zu einer Beeinträchtigung der 18-Hydroxylaseaktivität der Aldosteronsynthese. Im Fall von Typ II ist die 18-Oxidationsaktivität von CYP11B2 inaktiv, wodurch es zu einer Anhäufung von 18-Hydroxycorticosteron kommt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Eignung der Spaltheife *S. pombe* als Modellorganismus zur Analyse von CYP11B2 Mutanten als Alternative zu den herkömmlich verwendeten transient transformierten Zelllinien zu untersuchen. Aufgrund der geringen Expressionsrate von CYP11B2 in Zellkulturen ist man bei der Analyse der Enzymaktivität auf die Verwendung radioaktiv markierter Substrate angewiesen. Große Nachteile dieses Verfahrens sind die mit der Kultivierung verbundenen hohen Kosten und die generelle Problematik des Umgangs mit radioaktiven Materialien.

Der hier verfolgte Ansatz soll es ermöglichen, die Verwendung radioaktiven Materials zu vermeiden, da die in CYP11B2-exprimierenden Hefestämmen erreichte Enzymkonzentration ausreicht, um die Steroidmetabolite mithilfe der HPLC zu trennen und bei 240 nm, dem Absorptionsmaximum der Steroide, zu detektieren. Die einfache Handhabung der Spaltheife *S. pombe* und die Unabhängigkeit von radioaktivem Material erlauben zudem die parallele Untersuchung mehrerer Hefestämme. Dies wiederum erhöht die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Enzymvarianten, da alle Ergebnisse unter identischen Bedingungen erhalten werden.

Bei der Differentialdiagnostik von Stoffwechselerkrankungen spielen Steroidhormone und deren Vorstufen eine wichtige Rolle. Zur Identifizierung der Steroidmetabolite sind Referenzsubstanzen erforderlich, die jedoch nicht für alle Steroide kommerziell verfügbar sind. Beispielsweise ist die Verfügbarkeit von 18-Hydroxycorticosteron (18OHB) nicht garantiert und deren Anschaffung teuer. Zwar ist die chemische Synthese von 18OHB beschrieben (Kirk & Rajagopalan, 1976), dennoch ist das Verfahren aufgrund der komplexen Schutzgruppenchemie diffizil und kostspielig. Aus diesen Gründen stammt das kommerziell erhältliche 18OHB aus tierischem Gewebe und wird insbesondere durch Extraktion aus boviner Nebennierenrinde gewonnen. Doch auch diese Art der Steroidgewinnung ist aufwendig und aufgrund von Tierseuchen wie z.B. BSE mit gesundheitlichen Risiken verbunden. Die Synthese von Steroidhormonen mithilfe von Enzymen in rekombinanten Mikroorganismen (Ganzzell–Biotransformation) bietet daher einen vielversprechenden Ansatz zu den bisher verfügbaren Optionen.

Die im ersten Teil der Arbeit generierten Hefestämme stellen potentielle Ganzzell-Biotransformationssysteme zur Steroidhormonsynthese, speziell von 18OHB, dar. Die grundlegende Annahme ist, dass die heterolog in *S. pombe* exprimierten CYP11B2 Mutanten keine 18-Oxidationsaktivität mehr besitzen. 18OHB bildet somit das Endprodukt der CYP11B2 vermittelten Steroidhormonsynthese in den verwendeten rekombinanten *S. pombe* Stämmen, was wiederum die Isolierung des Steroids erleichtert. Zur Beurteilung des Potentials der Spaltheefe *S. pombe* als Produzent von 18OHB wurden die Mutanten hinsichtlich ihrer Biotransformationsaktivität einhergehend untersucht und bewertet. In diesem Kontext wurden auch Doppelmutanten und weitere Einzelmutanten erzeugt mit dem Ziel, die Produktionseffizienz hinsichtlich 18OHB zu erhöhen.

# 2 Material & Methoden

## 2.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien wurden, wenn nicht anders beschrieben, von Standard Firmen bezogen und waren von analytischer Reinheit.

### 2.1.1 Nährmedien

Alle aufgeführten Medien und Lösungen wurden durch Autoklavieren bzw. Filtrieren sterilisiert.

#### 2.1.1.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Nährbouillon I und Nähragar I wurden von SIFIN GmbH (Berlin, Deutschland) bezogen.

- Flüssigmedium: 25 g Nährbouillon l/l dH<sub>2</sub>O
- Agarplatten: 28 g Nähragar l/l dH<sub>2</sub>O

Zur Selektion wurde den Medien Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

**2.1.1.2 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*)**

## a) Edinburgh Minimal Medium (EMM):

NH <sub>4</sub> Cl	5,00 g
Kaliumhydrogenphthalat	3,00 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2,20 g
Glucose	20,00 g
Salzstammlösung	20,00 ml
Vitaminstammlösung	1,00 ml
Mineralstammlösung	0,10 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1,00 l

## b) Mineralstammlösung:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,00 g
MnSO <sub>4</sub>	1,60 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,60 g
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,80 g
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,64 g
KI	0,40 g
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,16 g
Zitronensäure	4,00 g
dH <sub>2</sub> O	ad 0,40 l

## c) Salzstammlösung (50x):

MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	52,50 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,74 g
KCl	50,00 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,00 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1,00 l

## d) Vitaminlösung:

Nikotinat	10,00 g
Inositol	10,00 g
Biotin	10,00 mg
Panthothenat	1,00 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1,00 l

e) 2xYEA Medium mit 25% Glyzerol (**Y**east **E**xtract medium with **A**dditives):

Hefeextrakt	1,00 g
Glucose	6,00 g
Adenin, Histidin, Leucin & Uracil	je 0,02 g
Glyzerol	25,00 ml
dH <sub>2</sub> O	75,00 ml

## f) SLD-Medium:

Bacto Yeast Nitrogen Base	0,67%
Glucose	0,50%



In Abhängigkeit von dem verwendeten Spalthefestamm wurden zum EMM nachträglich die erforderlichen Supplementationslösungen, auch als Auxotrophiemarkerlösungen bezeichnet, hinzugefügt: Leucin (leu), Uracil (ura), Histidin (his) oder Adenin (ade)

Die Auxotrophiemarkerlösungen wurden als wässrige Stammlösungen der Konzentration 10 g/l angesetzt, die Endkonzentration betrug 0,1 g/l. Die Expression von *CYP11B2* steht unter der Kontrolle des *nmt1*-Promotors, der durch die Zugabe von Thiamin in einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M unterdrückt werden kann (5 mM Stammlösung). Zudem konnten sich die Zellen nach der Transformation bzw. Kryokonservierung regenerieren, da keine heterologe Expression von *CYP11B2* durchgeführt werden musste. Die 2%igen Agarplatten enthielten die entsprechende Auxotrophiemarkerlösung und mit Thiamin versetztes EMM. Im Gegensatz dazu erfolgte die Kultivierung der Hefestämme im Flüssigkeitsmedium immer in Abwesenheit von Thiamin, da hier die Expression von *CYP11B2* stattfinden sollte.

## 2.1.2 Mikroorganismen

Die verwendeten Mikroorganismen sind nachfolgend aufgelistet.

**Tabelle 2.1: Verwendete Mikroorganismen und ihre Genotypen.**

Name (Organismus)	Genotyp	Referenz
TOP10F' ( <i>E. coli</i> )	<i>F' lacI<sup>q</sup> Tn10(Tet<sup>R</sup>) mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i><math>\theta</math>80 lacZ <math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>lacX74 recA1 araD139</i> <i><math>\Delta</math>(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	US Patent 5,487,993 Invitrogen Carlsbad, CA, USA
NCYC1913 ( <i>S. pombe</i> )	<i>h<sup>-</sup> leu1.32</i>	Kohli <i>et al.</i> (1977)
NCYC2036 ( <i>S. pombe</i> )	<i>h<sup>-</sup> ura4D-I18</i>	Losson & Lacroute (1983)
MB164 ( <i>S. pombe</i> )	<i>NCYC2036/pINT5-CYP11B2 integrant</i>	Bureik <i>et al.</i> (2002)

## 2.1.3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und sind in den nachstehenden Tabellen entsprechend ihrer Anwendung zusammengefasst.

**Tabelle 2.2: Sequenzierprimer**

Name	Sequenz
hCYP11B2_wt_F+49	5'-GTGGCCAGGGACTTCTCCCAG-3'
hCYP11B2_wt_F+97	5'-CTGATGACGCTCTTTGAGCTG-3'
hCYP11B2_wt_F+11	5'-TGTGGGTCTGTTTTTGGAGCG-3'
hCYP11B2_wt_R-70	5'-CATGAACATGAGCTGGACGGT-3'

**Tabelle 2.3: Primer zur TOPO-Klonierung**

Name	Sequenz
MKT_11B2_wt_F	5'-CGGGATCCATGGCACTCAGGGCAAAGGCA-3'
MKT_11B2_wt_R_His	5'-CTAATGATGATGATGATGATGGTTAATCGC-3'
MKT_11B2_wt_R	5'-GTTAATCGCTCTGAAAGTGAGGAGGGG-3'

**Tabelle 2.4: Mutageneseprimer**

Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und der dazugehörige Basenaustausch hervorgehoben. Die Überprüfung der Mutagenese erfolgte über die entsprechende Restriktionsendonuklease und anschließende Sequenzierung.

Name	Sequenz	Mutation	Restriktionsendonuclease
K173del_F	5'-GCCAGGGACTTCTCCC <u>AAGCTTT</u> GAAGAAGGTGCTGC-3'	K173del: Deletion	<i>HindIII</i>
K173del_R	5'-GCAGCACCTTCTTCA <u>AAGCTT</u> GGGAGAAGTCCCTGGC-3'	K173del: Deletion	
R181Q_F	5'-TGCAGAACGCC <u>CAGG</u> GGAGCCTGAC-3'	R181Q: cgg → cAg	<i>SmaI</i>
R181Q_R	5'-GTCAGGCTCCC <u>CCTGGG</u> CGTTCTGCA-3'	R181Q: ccg → cTg	
R181W_F	5'-GCTGCAGAACGC <u>CCTGGG</u> GGAGCCTG-3'	R181W: cgg → Tgg	<i>SmaI</i>
R181W_R	5'-CAGGCTCCCC <u>CAGG</u> CGTTCTGCAGC-3'	R181W: ccg → ccA	

Name	Sequenz	Mutation	Restriktionsendonuclease
<b>T185I_F</b>	5'-CCGGGGGAGCCTGATTCTAGA CGTCCAGCCCAG-3'	T185I: acc → aTT	<i>XbaI</i>
<b>T185I_R</b>	5'-CTGGGCTGGACGTCTAGAATC AGGCTCCCCCGG-3'	T185I: ggt → AAt	
<b>E198D_F</b>	5'-CATCTTCCACTACACCATAGAT GCTAGCAACTTAGCTCTTTTTGG-3'	E198D: gaa → gaT	<i>NheI</i>
<b>E198D_R</b>	5'-CAAAAAGAGCTAAGTTGCTAGC ATCTATGGTGTAGTGAAGATG-3'	E198D: ttc → Atc	
<b>T318M_F</b>	5'-CTGCAGGGAGCGT <b>CGAC</b> ATGACAGCGTTTCC-3'	T318M: acg → aTg	<i>SalI</i>
<b>T318M_R</b>	5'-GGAAACGCTGTCATGT <b>CGAC</b> GCTCCCTGCAG-3'	T318M: cgt → cAt	
<b>D335G_F</b>	5'-GGCTCGGAAC <b>CCCGGG</b> GTGCAGCAGATCC-3'	D335G: gac → gGG	<i>SmaI</i>
<b>D335G_R</b>	5'-GGATCTGCTGCAC <b>CCCGGG</b> GTTCCGAGCC-3'	D335G: gtc → CCc	
<b>V386A_F</b>	5'-GTTTTTGGAGCGAGTGG <b>CTAGC</b> TCAGACTTGGTGC-3'	V386A: gtg → gCT	<i>NheI</i>
<b>V386A_R</b>	5'-GCACCAAGTCTGAG <b>CTAGC</b> CACTCGCTCCAAAAAC-3'	V386A: cac → AGc	
<b>G435S_F</b>	5'-TAGACATCAGGGG <b>CTCGAG</b> CAGGAACCTCCACC-3'	G435S: ggc → Agc	<i>XhoI</i>
<b>G435S_R</b>	5'-GGTGAAGTTCCTG <b>CTCGAG</b> CCCCTGATGTCTA-3'	G435S: gcc → gcT	
<b>T498A_F</b>	5'-CCTGGCACGTCCC <b>CTCTTC</b> TCGCTTTTCAGAGCGAT-3'	T498A: act → Gct	<i>EarI</i>
<b>T498A_R</b>	5'-ATCGCTCTGAAAG <b>CGAGAAGAG</b> GGGACGTGCCAGG-3'	T498A: agt → agC	
<b>K251R_F</b>	5'-GCTGGATCAGCC <b>CCCGGG</b> TGTGGAAGGAG3'	K251R: aag → CGg	<i>SmaI</i>
<b>K251R_R</b>	5'-CTCCTTCCAC <b>CCCGGG</b> GGCTGATCCAGC-3'	K251R: ctt → cCG	
<b>Q404R_F</b>	5'-CATCCCAGCTGGGAC <b>CTAGT</b> ACGGGTTTTCTCTACTC-3'	Q404R: cag → cGg	<i>SpeI</i>
<b>Q404R_R</b>	5'-GAGTAGAGGAAAACCGT <b>ACTAGT</b> GTCCCAGCTGGGATG-3'	Q404R: ctg → cCg	
<b>A414P_F</b>	5'-CTGGGTGCAAT <b>CCCGCCCTCTCC</b> CGAGGC-3'	A414P: gcc → Ccc	<i>EarI</i>
<b>A414P_R</b>	5'-GCCTCGGGA <b>AGAGGGCGGGATTGCGA</b> CCCAG-3'	A414P: ggc → ggG	
<b>H439Y_F</b>	5'-CCGGCAGGA <b>ACTTCTACCACGTG</b> CCCT-3'	H439Y: cac → Tac	<i>DraIII</i>
<b>H439Y_R</b>	5'-AGGGCACGTGGT <b>AGAAGTTCCTG</b> CCGG-3'	H439Y: gtg → gtA	

## 2.1.4 Shuttle-Vektoren

Die eingesetzten *Shuttle*-Vektoren erlauben die Replikation und Selektion in *E. coli* und in *S. pombe* Zellen. Die *E. coli* Komponente stammt aus dem pUC Vektor und besteht aus einem Replikationsursprung und einer DNA für die  $\beta$ -Lactamase, die für die Ampicillin-Resistenz (AmpR) von Bakterien verantwortlich ist. Die Hefekomponente beinhaltet u.a. einen Thiamin-regulierbaren *nmt1*-Promotor, um eine starke Proteinexpression zu ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit sind sowohl integrative als auch extra-chromosomale Vektoren eingesetzt worden, die sich insbesondere in den folgenden Punkten unterscheiden:

- **pNMT1-TOPO<sup>®</sup>**

Der Spalthefe Expressionsvektor pNMT1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) enthält eine autonom replizierende Sequenz (*ars1*). Der Selektionsmarker *LEU2* der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) komplementiert den *leu1.32* Gendefekt, der in dem zur Transformation verwendeten *S. pombe* Stamm vorliegt. Zwei *tags* am 3'-Ende der Expressionskassette, ein *Pk*- und ein *His<sub>6</sub>-tag*, ermöglichen die immunologische Detektion (*Pk-tag*) und die Reinigung des exprimierten Proteins über eine Metall-Chelat-Chromatographie (*His<sub>6</sub>-tag*).

- **pINT5**

Der Integrationsvektor pINT5 (Bureik *et al.*, 1997) wird über seine *leu1*-Genfragmente in das Chromosom II der *S. pombe* integriert. Als Selektionsmarker dient das *ura4*, welches die Mutation *ura.4dl18* in dem entsprechenden *S. pombe* Stamm komplementiert. Für die Transformation von *S. pombe* ist es erforderlich, pINT5 mit *NotI* zu verdauen, um das lineare Integrationskonstrukt mit den flankierenden *leu1*-Sequenzen zu erzeugen. Hierbei entsteht neben dem Integrationskonstrukt, das die Expressionskassette und den Selektionsmarker für *S. pombe* enthält, eine 2,0 kb großes Fragment, das die vom pUC-Vektor abgeleiteten Komponenten enthält. Das *CYP11B2* besitzt am 3'-Ende eine für ein *His<sub>6</sub>-tag* kodierende Sequenz, um eine Reinigung des exprimierten Proteins über Affinitätschromatographie zu ermöglichen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle gentechnischen Arbeiten nach den von Sambrook et al. beschriebenen Standardmethoden durchgeführt (Sambrook & Russel, 2001). Die DNA-Reinigung aus *E. coli* TOP10F' erfolgte mit dem NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit, und die Gelextraktion der relevanten DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde mit dem NucleoSpin® Extract II Kit durchgeführt (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen stammten von Promega (Mannheim, Deutschland) bzw. NEB (Frankfurt am Main, Deutschland). DNA-Sequenzierungen wurden von MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

#### 2.2.1.1 PCR-Amplifikation der *CYP11B2* cDNA

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *Polymerase chain reaction, PCR*) ermöglicht die Vervielfältigung eines definierten DNA-Abschnittes, der von einem Primerpaar an beiden Enden flankiert wird. Die verwendete *Pfu*-Polymerase verfügt über eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, die eine Korrekturlesefunktion (*proofreading*) erlaubt.

Mithilfe geeigneter Primer (vgl. Tabelle 2.3) wurde das Gen der humanen Aldosteronsynthase aus dem Vektor pSVL/CYP11B2 amplifiziert (vgl. Tabelle 2.5 und Tabelle 2.6).<sup>1</sup>

**Tabelle 2.5: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes**

<i>Pfu</i> -Polymerase-Puffer (10x)	5 $\mu$ l
dNTP (5 mM)	2 $\mu$ l
Vorwärts-Primer (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
Rückwärts-Primer (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
DNA-Matrize (15 ng/ $\mu$ l)	3 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	35 $\mu$ l
<i>Pfu</i> -Polymerase (3 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

<sup>1</sup>pSVL/CYP11B2 stammte aus der Plasmidsammlung des Instituts für Biochemie der Universität des Saarlandes unter der Leitung von Prof. Dr. R. Bernhardt.

Es wurden zwei unabhängige PCR durchgeführt, bei denen sich die PCR-Produkte jeweils am 3'-Terminus unterschieden (siehe Abbildung 3.2). Das erste PCR-Produkt wurde um einen Bereich erweitert, der einen 3'-terminalen *His<sub>6</sub>-tag* und abschließenden STOP-Codon kodiert. Dieses heterolog exprimierte CYP11B2 verfügt lediglich über diesen C'-terminalen *His<sub>6</sub>-tag*, da über das STOP-Codon die Expression der *tags* vom Vektor unterbunden wird (siehe Abbildung 6.1).

Bei der zweiten PCR wurde das *CYP11B2* ohne weitere *tags* amplifiziert, so dass das Gen über die Ligation in den pNMT1-TOPO Vektor vor dem *Pk*- und dem *His<sub>6</sub>-tag* des Vektors lag. Somit konnte es mit den 3'-terminalen *Pk*- und *His<sub>6</sub>-tags* vom Vektor exprimiert werden (Abbildung 6.1). Anschließend wurden die beiden PCR-Produkte jeweils in den *Shuttle*-Vektor pNMT1-TOPO einkloniert.

**Tabelle 2.6: PCR-Programm für die *CYP11B2*-Amplifizierung**

1) Denaturierung bei 95°C	5 min
2) Denaturierung bei 95°C	45 s
3) Annealing bei 58°C	30 s
4) Elongation bei 72°C	3 min
Schritte 2-4	30x
5) Finale Elongation bei 72°C	10 min
7) Termination bei 4°C	∞

### 2.2.1.2 pNMT1-TOPO Klonierung

Der Begriff TOPO verweist auf die Topoisomerase I aus dem Vaccinia Virus hin, die sowohl die funktionelle Aktivität einer Restriktionsendonuklease als auch einer Ligase besitzt. Die Topoisomerase schneidet spezifisch die Vektor-DNA und bleibt über eine 3-Phosphotyrosyl-Bindung kovalent an die Vektor-DNA gebunden. Da an beiden Enden des Vektors die Topoisomerase vorliegt, wird die Selbstligation des Vektors unterbunden. Der so aktivierte Vektor liegt linear vor und besitzt am 3'-Ende einen T-Überhang, welcher eine TA-Klonierung ermöglicht. Hierfür wurde das zu klonierende PCR Produkt mit der *Taq*-Polymerase inkubiert, welche am 3'-Ende des Amplifikats einen A-Überhang anhängt.

Dieser 3'-A-Überhang wird von der Topoisomerase mit dem 3'-T-Überhang des komplementären Stranges des linearisierten Vektors ligiert (TA-Klonierung). Hierbei wird die Phosphotyrosyl-Bindung zwischen dem Vektor und dem Enzym durch die 5'OH-Gruppe des PCR-Produkts aufgebrochen wodurch die Topoisomerase freigesetzt wird (Shuman, 1994). Für die TA-Klonierung ist ein 3'-A-Überhang am PCR-Produkt erforderlich. Hierfür erfolgte eine 10-minütige Inkubation des PCR-Reaktionsansatzes (50  $\mu$ l) mit der *Taq*-Polymerase (0,5  $\mu$ l) bei 72°C. Die anschließende Agarosegelelektrophorese diente der Analyse der PCR und erlaubte die nachfolgende Isolierung des relevanten Fragmentes zur TOPO Klonierung mittels Gel-Extraktion. Der Reaktionsansatz für die TOPO-Klonierung setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- PCR-Produkt 2  $\mu$ l,
- Salzlösung 1  $\mu$ l,
- TOPO Vektor 1  $\mu$ l und
- dH<sub>2</sub>O 2  $\mu$ l

Der Reaktionsansatz wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 2  $\mu$ l des Reaktionsansatzes für die *E. coli*-Transformation mittels Hitzeschock eingesetzt.

### 2.2.1.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Das gezielte Einführen von Mutationen in die Nukleotidsequenz des *CYP11B2*, die zu dem gewünschten Aminosäureaustausch führen, sowie die Insertion bzw. Deletion der entsprechenden Restriktionsschnittstellen zur Überprüfung der Mutagenese, erfolgten in Anlehnung an das Protokoll des QuikChange™ Site directed Mutagenesis Kits (Stratagene) unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase. Die erforderlichen Mutagenese Primer wurden mit der Software „Silent Site Selector for DNA Mutagenesis“ (<http://rana.lbl.gov/SSS/>) erstellt. Die verwendeten Primer mit den entsprechenden Mutationen und die zur Überprüfung eingesetzten Restriktionsendonukleasen sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen. Die Ansätze für die Mutagenese-PCR entsprachen bis auf die Primer und das Template dem zuvor beschriebenen PCR-Ansatz (Tabelle 2.5). Folgendes PCR-Programm wurde für die Mutagenese verwendet:

Tabelle 2.7: PCR–Programm für die Mutagenese von *CYP11B2*

1) Denaturierung bei 95°C	5 min
2) Denaturierung bei 95°C	45 s
3) Annealing bei 58°C	30 s
4) Elongation bei 72°C	16:30 min
Schritte 2-4	30x
5) Finale Elongation bei 72°C	10 min
7) Termination bei 4°C	∞

Die transformierten Bakterien, aus dem die Template DNA isoliert wurde, besitzen das *dam*-Methylierungssystem, welches die DNA methyliert. Nach der PCR wurde die methylierte, nicht mutierte parentale, sowie hemimethylierte DNA mit *DpnI* verdaut. Die mit *DpnI* behandelten PCR–Ansätze wurden bis zur Transformation kompetenter *E. coli* Zellen bei 4°C aufbewahrt.

## 2.2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.2.1 Kultivierung & Transformation von *E. coli*

Die Kultivierung von transformierten *E. coli* TOP10F'–Zellen erfolgte mit Nährbouillon und Ampicillin bei einer Temperatur von 37°C und im Schüttler bei 180 UpM. Sowohl die Herstellung der chemisch- und elektrokompetenten TOP10F'–Zellen als auch die Transformation der Zellen mit den jeweiligen Plasmiden erfolgte nach den Standardprotokollen (Sambrook & Russel, 2001).

### 2.2.2.2 Kultivierung und Kryokonservierung von *S. pombe*

Mithilfe einer Impföse wurde Zellmaterial einer Kryokultur auf entsprechende Agarplatten ausgestrichen und 2 bis 3 Tage im Brutschrank bei einer Temperatur von 30°C inkubiert. Anschließend wurde eine 10 ml Vorkultur mit der erforderlichen Auxotrophiemarkerlösung mit einer Einzelkolonie von einer Kulturplatte angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei einer Temperatur von 30°C inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 100 ml EMM, welches jeweils mit der entsprechenden Auxotrophiemarkerlösung versetzt worden ist, mit 10 ml



einer frischen über-Nacht-Kultur inokuliert und bei 30°C und 180 UpM über Nacht inkubiert. Die Bestimmung der Zellzahl am Folgetag erfolgte mithilfe eines Hämocytometers. Zur Kryokonservierung der Hefestämme wurden 50 ml einer Hauptkultur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 2xYEA mit 25% Glycerol resuspendiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C.

### 2.2.2.3 Herstellung chemisch kompetenter *S. pombe* Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen (Suga & Hatakeyama, 2005) wurden die Hefezellen wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben kultiviert, wobei jedoch EMM durch das SLD-Medium ersetzt wurde. Bei der Zellernte lag die Zellzahl bei mindestens  $10^7$  Zellen/ml. Vor der Zellernte wurde die Kultur zunächst auf Eis gelagert und anschließend 5 min bei 1600 g und 4°C zentrifugiert. Nach drei Waschschrritten mit jeweils 10 ml eiskaltem, sterilem dH<sub>2</sub>O wurde das Zellpellet in 1 ml eiskalter wässriger Lithiumacetat/Glycerol Lösung (0,1 M LiAc mit 30% Glycerol, pH 4,9) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend zu 50 µl aliquotiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor die Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Lagerung der kompetenten Hefezellen erfolgte ebenfalls bei -80°C.

### 2.2.2.4 Transformation nach Suga

Die kompetenten Hefezellen wurden für die Transformation maximal 2 min bei 37°C aufgetaut (Suga & Hatakeyama, 2005). Zu den aufgetauten Zellen wurden 5 µl Träger-DNA (Lachssperma, 10 mg/ml), 2 µl der einzubringenden DNA und 145 µl PEG 4000 (50%) zugegeben und einem 15-minütigen Hitzeschock bei 42°C unterworfen. Darauffolgend wurden die Zellen 5 min bei 1600 g zentrifugiert und das Sediment in 300 µl sterilem dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach dem Ausplattieren des Zellmaterials auf entsprechende Selektionsplatten wurden diese bis zum Erscheinen der Klone bei 30°C inkubiert. Die Selektion der gewachsenen Klone erfolgte über die mit dem jeweiligen Vektor eingeführten Auxotrophiemarker-Gene.

### 2.2.2.5 Transformation nach Okazaki

Die Methode basiert auf einer modifizierten Lithiumacetat Methode von Okazaki (Okazaki *et al.*, 1990). Die Hefezellen wurden gemäß der Beschreibung in 2.2.2.2 angezogen. Für die Transformation nach Okazaki sollten sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase, d.h.  $5 \cdot 10^6$ –  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml, befinden. Die Zellen wurden zentrifugiert und zweimal mit sterilem dH<sub>2</sub>O gewaschen. Ein weiterer Waschschrift erfolgte mit 1 ml Lithiumacetat (pH 4,9). Abschließend wurde das Zellpellet ebenfalls in Lithiumacetat aufgenommen. Die vorliegende Zellsuspension besaß eine Zelldichte von  $2 \cdot 10^8$  Zellen/ml. Pro Transformation wurden 100  $\mu$ l dieser Zellsuspension eingesetzt. Die eingesetzte DNA-Menge betrug zwischen 2 und 10  $\mu$ g. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 260  $\mu$ l PEG 4000 (40% in 0,1 M LiAc, pH 4,9) zu dem Ansatz zugegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 30°C und 1000 UpM (Thermomixer von Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden 43  $\mu$ l DMSO zugegeben, und der Ansatz wurde einem kurzzeitigen Hitzeschock (42°C, 5 min) unterzogen. Die Zellen wurden direkt nach der Transformation auf Eis überführt und mit 500  $\mu$ l sterilem dH<sub>2</sub>O angereichert. Nach dem Zentrifugieren mit 1600 g über einen Zeitraum von 5 min und erneutem Waschen mit 500  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O wurden die Zellen in 300  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O aufgenommen und auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bis zum Nachweis der Klone bei 30°C.

### 2.2.2.6 Ganzzell-Biotransformation von Steroiden mit *S. pombe*

Die für das Experiment notwendigen Hefestämme wurden mit der bekannten Methode (vgl. Abschnitt 2.2.2.2) angezogen und ihre Zellzahlen mithilfe eines Hämocytometers ermittelt. Die Biotransformation von DOC als Substrat (25  $\mu$ M) erfolgte in 300 ml Weithalskolben mit Zellwattestopfen bei einer Zelldichte von  $10^8$  Zellen/ml und einem Gesamtvolumen von 10 ml. Die Zellen wurden bei 30°C und 180 UpM inkubiert. Eine Probe von 500  $\mu$ l wurde nach 24-stündiger Inkubation bis zur Extraktion bei -20°C eingefroren. Für die Auswertung der Biotransformation wurden die aufgetauten Proben extrahiert und mittels HPLC analysiert (Abschnitt 2.2.3.1). Es wurden mindestens 3 unabhängige Versuche für jeden mutierten Hefestamm durchgeführt.

Als Kontrollen wurden sowohl der CYP11B2\_WT exprimierende Hefestamm als auch der Hefestamm ohne Vektor (NCYC2036) mitgeführt.

## 2.2.3 Analytik

### 2.2.3.1 *High performance liquid chromatography* (HPLC) Analyse

Die Analysen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: *high performance liquid chromatography*, HPLC) wurden an den Geräten der 2000er Baureihe der Firma Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland) durchgeführt. Alle verwendeten Lösungsmittel waren von HPLC-Reinheit (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und das Wasser wurde mit der Milli-Q Biocel (Millipore, Bedford, MA, USA) gereinigt. Die Auftrennung der Steroide erfolgte mit einer RP Säule (Nucleodur® 100-3 C<sub>18</sub> ec Säule, Partikelgröße 3 µm, Länge 125 mm, Innendurchmesser 4 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Die Säulentemperatur von 35°C wurde mit dem Säulenthermostat Jetstream II (WiCom, Heppenheim, Deutschland) konstant gehalten und die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Die Detektion der Steroide erfolgte bei 240 nm an den UV-2075 Plus Intelligent UV/VIS-Detektor der Firma Jasco. Die Identifizierung der Steroide erfolgte soweit möglich mit Referenzsubstanzen.

Zur Vorbereitung der HPLC-Analyse wurden die aufgetauten 500 µl Proben zweimal hintereinander mit 500 µl Chloroform extrahiert. Als interner Standard wurde Progesteron mit einer Endkonzentration von 40 µM zugegeben. Die organischen Phasen beider Extraktionsschritte wurden in einem frischen Reaktionsgefäß vereinigt bevor das Lösungsmittel in einer Speed-Vac (Univapo 100H, UniEquio, München, Deutschland) abgedampft wurde. Der Rückstand wurde schließlich in 100 µl Methanol resuspendiert und mittels HPLC analysiert. Dabei betrug das Injektionsvolumen 20 µl. Die Trennung der Steroide erfolgte mit einem Zwei-Phasen-Gradientensystem bestehend aus einem Gemisch aus Methanol und Wasser im Verhältnis 1:1 (Phase A) und purem Methanol (Phase B):

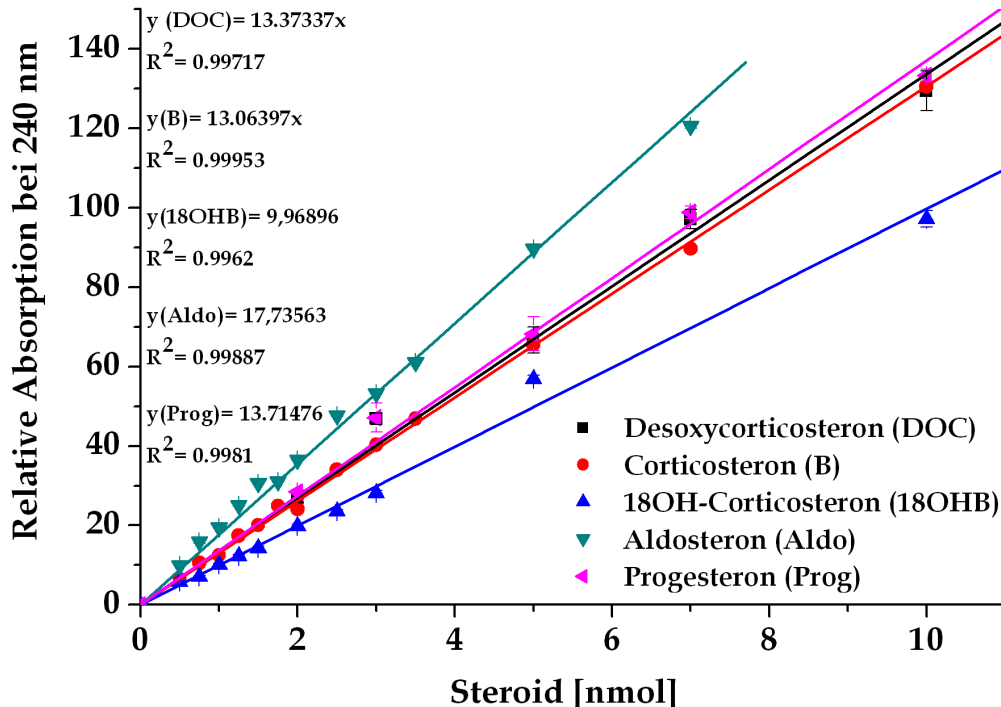
**Tabelle 2.8: HPLC–Gradient zur Auftrennung der Steroide nach der Biotransformation von DOC.**

Phase A stellt ein MeOH/H<sub>2</sub>O–Gemisch im Verhältnis 1:1 dar, während Phase B aus reinem MeOH besteht.

Zeit [min]	Phase A [%]	Phase B [%]
0	100	0
15	50	50
18	0	100
20	0	100
25	100	0

### 2.2.3.2 Auswertung der Ganzzell-Steroidumsätze

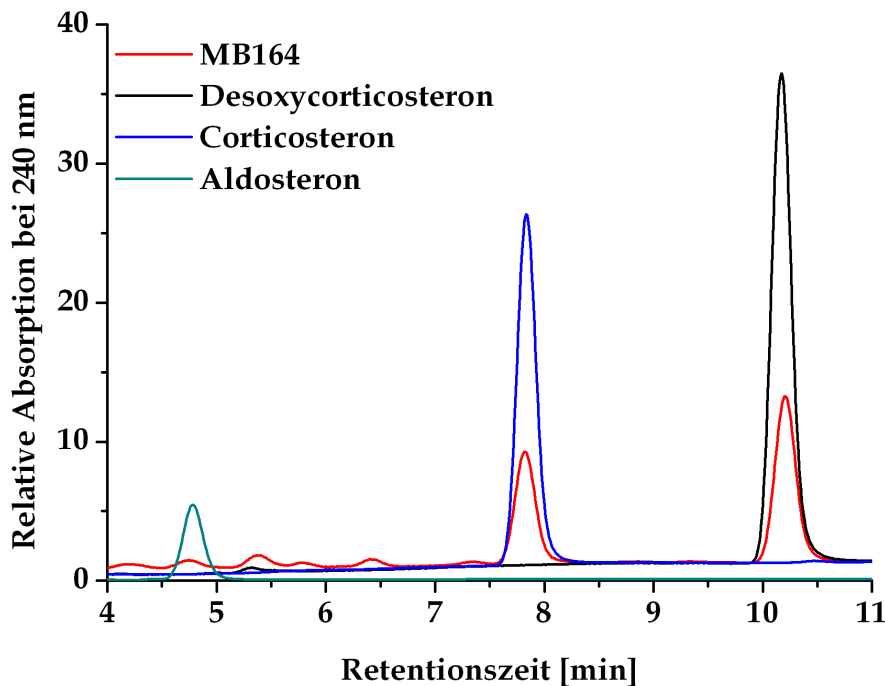
Für die Auswertungen der *in vivo* Umsätze wurden Kalibriergeraden für die Steroide DOC, B, 18OHB, Aldosteron und dem internen Standard Progesteron aufgenommen (Abbildung 2.1).

**Abbildung 2.1: Kalibriergeraden der Steroide DOC, B, 18OHB, Aldo und Prog.**

Die Messungen erfolgten mit Hilfe der HPLC wie in Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben.

Die Messung der extrahierten Proben erfolgte mit Hilfe der HPLC. Die Zuordnung der

Signale erfolgte durch den Vergleich ihrer Retentionszeit mit der Retentionszeit der entsprechenden Referenzsubstanzen (Abbildung 2.2).

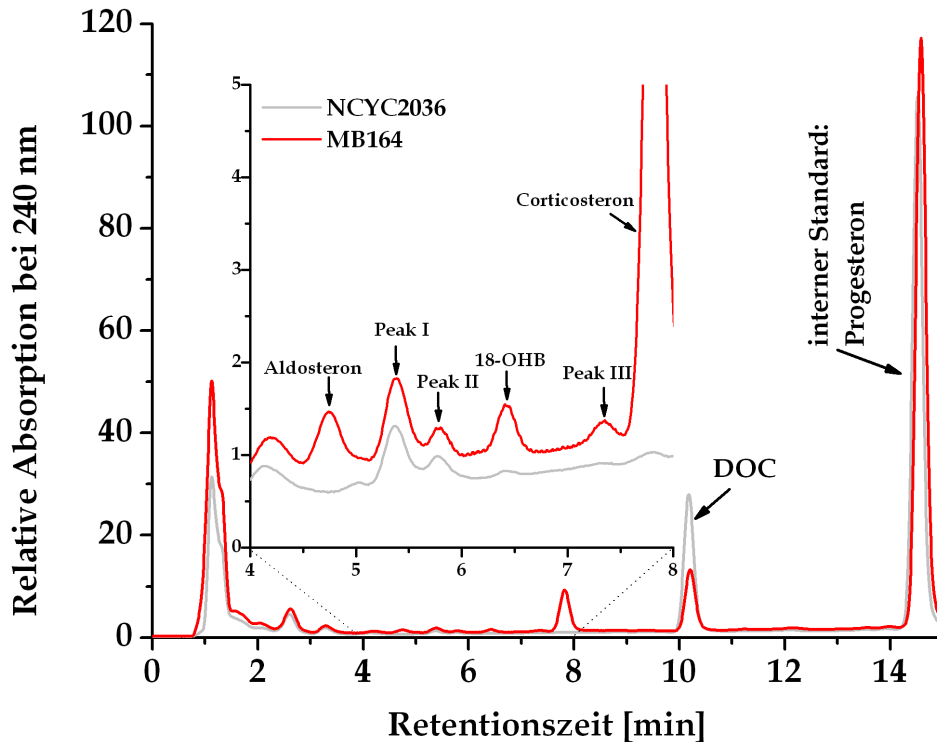


**Abbildung 2.2: Ganzzell-Biotransformation des DOC durch MB164.**

Die Chromatogramme der Referenzsubstanzen DOC, B und Aldo sind ebenfalls dargestellt.

Nur im Fall von 18OHB konnte die Peakzuordnung nicht über die entsprechende Referenzsubstanz erfolgen, da während der Biotransformation von DOC in *S. pombe* bei 18OHB Umlagerungsprodukte gebildet werden. Diese Beobachtung wurde auch von Damasco und Usa beschrieben, die in ihren Untersuchungen zeigten, dass die Stabilität von 18OHB u.a. von der Temperatur, der Acidität und dem Wassergehalt des Mediums/Lösungsmittels abhängig ist (Usa *et al.*, 1979; Damasco & Lantos, 1975). Die Biotransformation von DOC mit *S. pombe* erfolgte für 24 Stunden bei 30°C. Es muss angenommen werden, dass diese Bedingungen die Bildung von Umlagerungsprodukten begünstigen und der Anteil an ursprünglichem 18OHB vergleichsweise gering ist. Um dennoch eine Untersuchung der 18OHB Bildung *in vivo* in der Spalthefe zu ermöglichen, wurden sowohl den Kulturen des Elternstammes NCYC2036, der selbst kein CYP11B2 exprimiert, als auch dem Stamm MB164, der den CYP11B2\_WT aufgrund chromosomaler Integration des CYP11B2 Gens exprimiert, DOC zugesetzt. Von beiden Ansätzen wurden nach 24 h Inkubation Proben entnommen, gemäß Kapitel 2.2.3.1 aufbereitet und anschließend einer HPLC-Analyse unterzogen. Beim Vergleich der HPLC Chromatogramme

des Elternstammes NCYC2036 und des Stammes MB164 zeigte sich, dass im Chromatogramm des MB164 neben den Hefe-spezifischen Verunreinigungen ein Peak vorliegt, der nicht im Chromatogramm des NCYC2036 gefunden wurde (Abbildung 2.3). Dieser Peak wurde für die nachfolgenden Auswertungen als 18OHB definiert.



**Abbildung 2.3: Ganzzell-Biotransformation des DOC mit NCYC2036 und MB164 im Schüttelkolben.**  
HPLC Chromatogramme der extrahierten Proben nach 24 h Biotransformation bei 30°C mit 25 µM DOC; Progesteron wurde als interner Standard mitgeführt.

Der Einfluss der verschiedenen Mutationen auf die CYP11B2 Enzymaktivität wurde in dieser Arbeit durch die Parameter „Relative Produktbildung, Corticosteronbildung, 18-Hydroxycorticosteronbildung und Aldosteronbildung“ ausgedrückt, die im Folgenden definiert werden:

### **Parameter zur Etablierung des Ganzzellsystems**

Zunächst wurden verschiedene Konstanten zur Optimierung des Ganzzellsystems untersucht. Hierfür wurden die DOC-Umsätze folgendermaßen ausgewertet:

$$\text{Relative Produktbildung [\%]} = \frac{\frac{I(B)}{\text{Steigung}(B)}}{\frac{I(B)}{\text{Steigung}(B)} + \frac{I(\text{DOC})}{\text{Steigung}(\text{DOC})}} * 100$$

- ▶ I: gemessene Absorption bei 240 nm
  - ▶ Steigung: Steigung der Kalibriergeraden für das jeweilige Steroid
- (siehe Abschnitt 2.2.3.2)

### Parameter nach der Etablierung des Ganzzellsystems

Die Auswertung der Untersuchungen mit dem etablierten Ganzzellsystems erfolgte auf drei Arten:

$$\text{Corticosteronbildung [\%]} = \frac{\frac{I(B)}{\text{Steigung}(B)} + \frac{I(18\text{OHB})}{\text{Steigung}(18\text{OHB})} + \frac{I(\text{Aldo})}{\text{Steigung}(\text{Aldo})}}{\frac{I(\text{DOC})}{\text{Steigung}(\text{DOC})} + \frac{I(B)}{\text{Steigung}(B)} + \frac{I(18\text{OHB})}{\text{Steigung}(18\text{OHB})} + \frac{I(\text{Aldo})}{\text{Steigung}(\text{Aldo})}}$$

$$\text{18-Hydroxycorticosteronbildung [\%]} = \frac{\frac{I(18\text{OHB})}{\text{Steigung}(18\text{OHB})} + \frac{I(\text{Aldo})}{\text{Steigung}(\text{Aldo})}}{\frac{I(B)}{\text{Steigung}(B)} + \frac{I(18\text{OHB})}{\text{Steigung}(18\text{OHB})} + \frac{I(\text{Aldo})}{\text{Steigung}(\text{Aldo})}}$$

$$\text{Aldosteronbildung [\%]} = \frac{\frac{I(\text{Aldo})}{\text{Steigung}(\text{Aldo})}}{\frac{I(18\text{OHB})}{\text{Steigung}(18\text{OHB})} + \frac{I(\text{Aldo})}{\text{Steigung}(\text{Aldo})}}$$

- ▶ I: gemessene Absorption bei 240 nm
  - ▶ Steigung: Steigung der Kalibriergeraden für das jeweilige Steroid
- (siehe Abschnitt 2.2.3.2)

## 2.2.4 Statistische Signifikanz mittels *t*-Tests für unabhängige Stichproben

Mithilfe des *t*-Tests wurden die Ergebnisse der CYP11B2 Mutanten auf signifikante Unterschiede zu dem Ergebnis des CYP11B2\_WT bzw. dem Referenzstamm MB164 überprüft. Die Signifikanz-Grenze betrug  $p < 0,05$ .

### 3 Ergebnisse

Entsprechend der Zielstellung lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation in zwei Schwerpunkte unterteilen. Im Vordergrund steht die Etablierung eines Ganzzellsystems zur Untersuchung von CYP11B2 Mutanten. Anschließend erfolgte eine Untersuchung des Potentials des etablierten Ganzzellsystems zur biotechnologischen Produktion von Steroidhormonen, insbesondere von 18-Hydroxycorticosteron.

Die bisherigen Studien zu CYP11B2 Mutanten erfolgten entweder mit isolierten Mitochondrien aus Zelllinien (z.B. COS-7) (Kuribayashi *et al.*, 2003; Shizuta *et al.*, 1995) oder mithilfe heterologer Expression von CYP11B2 in verschiedenen Zelllinien (z.B. COS-1, COS-7 bzw. HCT116 p53<sup>-/-</sup> bzw. MA-10) (Nguyen, 2008; Zhang *et al.*, 1995; Shizuta *et al.*, 1995; Pascoe *et al.*, 1992). Die dabei verwendete transiente Transfektion von Zelllinien (Nguyen *et al.*, 2008, 2010; Pascoe *et al.*, 1992) hat den Nachteil, dass bei eventuellen Folgeuntersuchungen eine erneute Transfektion des zu untersuchenden Gens in den Organismus erforderlich ist. Desweiteren wurden in allen bisherigen Studien zu CYP11B2 radioaktiv markierte Substrate wie z.B. [<sup>14</sup>C]-DOC (Kuribayashi *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2008, 2010) verwendet. Der Einsatz radioaktiv markierter Substrate sowie die transiente Transfektion von Zelllinien erschweren eine parallele Untersuchung mehrerer Enzymmutanten und damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Es konnte in unserem Institut bereits gezeigt werden, dass CYP11B2 funktionell heterolog in *S. pombe* exprimiert werden kann (Bureik *et al.*, 2002). Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt daher auf der stabilen Transformation von CYP11B2 Mutanten in *S. pombe* und der vergleichenden Untersuchung der CYP11B2 Mutanten in einem auf Spaltheefe basierenden Ganzzellsystem. Die in diesem Ganzzellsystem erreichte CYP11B2 Aktivität ist hoch genug, um Steroidprodukte in einer Menge bereitzustellen, die mittels HPLC separiert werden kann. Die Steroidprodukte können anschließend spektrophotometrisch detektiert werden.

Neben der Analyse der Enzymaktivität werden die heterolog in *S. pombe* exprimierten CYP11B2 Mutanten auf ihre Selektivität, speziell auf ihre Fähigkeit, 18-Hydroxycorticosteron (18OHB) zu produzieren, überprüft. Diese Untersuchung gibt



Aufschluss darüber, ob sich genetisch modifizierte *S. pombe* Stämme zur Produktion des Steroidhormons 18OHB eignen. Im Rahmen der biotechnologischen Fragestellung wurden Doppelmutanten und weitere Einzelmutanten generiert mit der Intention, größere Mengen an 18OHB mithilfe der Spaltheife *S. pombe* zu produzieren, um die Grundlage für eine potentielle industrielle Anwendung zu schaffen.

## 3.1 Optimierung der Versuchsparameter

### 3.1.1 Evaluierung verschiedener Vektoren zur heterologen

#### Expression der humanen Aldosteronsynthase in *S. pombe*

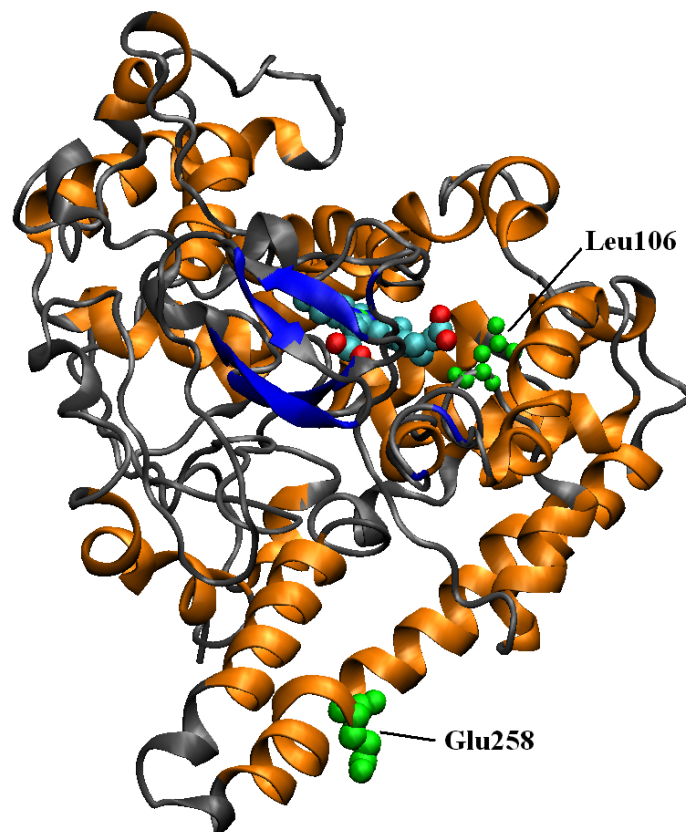
Ein Vorteil der Spaltheefe gegenüber den für die Untersuchung von CYP11B2 verwendeten Zelllinien besteht darin, dass für *S. pombe* verschiedene Expressionsvektoren mit starken, regulierbaren Promotoren zur Verfügung stehen, so dass die Bildung von CYP11B2 und damit einhergehend die Effizienz der Biotransformation potentiell gesteigert werden kann. Dies macht nicht nur die Verwendung radioaktiv markierter Substrate obsolet, sondern könnte zusätzlich auch für eine potentielle biotechnologische Anwendung relevant sein. Daher wurde zunächst überprüft, welcher Vektor zur Expression von CYP11B2 Mutanten und damit auch zur Bioproduktion von 18OHB geeignet ist.

Zur Expression der humanen Aldosteronsynthase stehen zwei Arten von *Shuttle*-Vektoren zur Verfügung, der Integrationsvektor pINT5 und der extra-chromosomaler Vektor pNMT1-TOPO. Beide Vektoren erlauben sowohl die Klonierungsarbeiten in Bakterien als auch die heterologe Proteinexpression in *S. pombe*. Der bereits etablierte Hefestamm MB164 enthält das Expressionsplasmid pINT5-CYP11B2 (Bureik *et al.*, 2002). pINT5 ist ein Integrationsvektor; somit enthält jede Hefezelle nur eine ihrem Ploidie-Status entsprechende Anzahl an Kopien der Expressionskassette. Im Allgemeinen korreliert die Aktivität des heterolog exprimierten Proteins mit der Anzahl der Kopien der Genkassette innerhalb des Wirts. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde das humane Aldosteronsynthase-Gen in pNMT1-TOPO kloniert und das daraus resultierende Plasmid in den entsprechenden Hefestamm transformiert. Als extra-chromosomaler Vektor repliziert pNMT1-TOPO mit der **autosomal replizierenden Sequenz** (*ars1*) unabhängig vom Hefechromosom (Heyer *et al.*, 1986).

### 3.1.1.1 Generierung der extra-chromosomalen Expressionsplasmide pMKT\_S0 und pMKT\_H0 und der diese Plasmide enthaltenden *S. pombe* Stämme

Mithilfe geeigneter Primer (Tabelle 2.3) wurde das Gen der humanen Aldosteronsynthese aus dem Vektor pSVL/CYP11B2 amplifiziert. Der Vergleich der *CYP11B2*-cDNA aus dem Plasmid pSVL/CYP11B2 und dem bereits vorliegenden pINT5-CYP11B2 führte zur Identifizierung zweier Unterschiede, die bislang nicht als natürliche Polymorphismen von *CYP11B2* bekannt sind: L106P und E258G. Während die Mutation E258G beschrieben ist (Bureik *et al.*, 2002), ist der Ursprung von L106P unklar.

Die Betrachtung der Positionen der Mutationen L106P und E258G in dem Homologie-Modell nach Belkina (Belkina *et al.*, 2001) (Abbildung 3.1) zeigt, dass sich L106P in der Nähe des aktiven Zentrums befindet, während E258G im G-Loop liegt.



**Abbildung 3.1: Homologie Modell von CYP11B2 (Belkina *et al.*, 2001).**

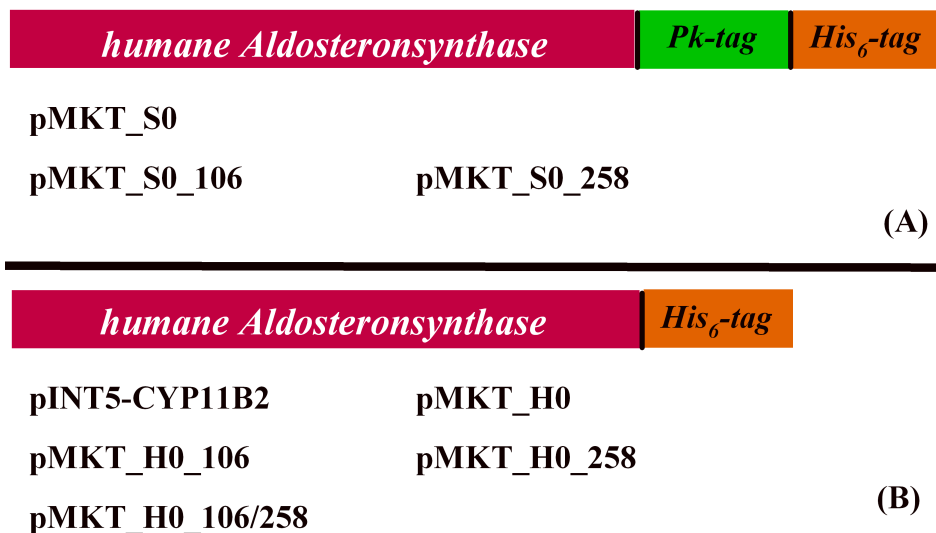
Die Aminosäurepositionen L106 und E258 sind grün dargestellt, die Helices gelb und die Faltschichten blau. In der Mitte des Modells befindet sich das aktive Zentrum mit dem Häm-Molekül (hellblau)

Insbesondere die L106P–Mutation könnte aufgrund ihrer Position die Enzymaktivität beeinflussen. Daher wurden beide Mutationen mittels ortsgerichteter Mutagenese singulär ins *CYP11B2* des Vektors pNMT1-TOPO eingeführt und untersucht (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1: Liste der generierten extrachromosomalen Expressionsvektoren inklusive dem Referenzplasmid pINT5-CYP11B2 und ihrer Merkmale.**

Expressionsvektor	<i>His</i> <sub>6</sub> -tag	<i>Pk</i> -tag	pNMT1-TOPO Derivate
pMKT_S0	X	X	<i>tags</i> vom pNMT1-TOPO Vektor: CYP11B2_WT
pMKT_S0_106	X	X	<i>tags</i> vom pNMT1-TOPO Vektor: CYP11B2_L106P
pMKT_S0_258	X	X	<i>tags</i> vom pNMT1-TOPO Vektor: CYP11B2_E258G
pMKT_H0	X	–	<i>tag</i> über PCR-Amplifizierung: CYP11B2_WT
pMKT_H0_106	X	–	<i>tag</i> über PCR-Amplifizierung: CYP11B2_L106P
pMKT_H0_258	X	–	<i>tag</i> über PCR-Amplifizierung: CYP11B2_E258G
pMKT_H0_106/258	X	–	<i>tag</i> über PCR-Amplifizierung: CYP11B2_L106P/E258G
pINT5-CYP11B2	X	–	Referenz:CYP11B2_L106P/E258G

Versuche mit CYP11B2 aus Ratten, welches heterolog in *E. coli* exprimiert wurde, haben gezeigt, dass das Vorliegen des *His*<sub>6</sub>-tags am C-Terminus eines Proteins einen positiven Einfluss auf die Enzymstabilität ausüben kann (Nonaka *et al.*, 1998). Deswegen wurden die Mutationen L106P und E258G nur bei dem Plasmid, in dem der *His*<sub>6</sub>-tag direkt am C-Terminus vorlag (pMKT\_H0), simultan eingeführt (Abbildung 3.2, Tabelle 3.1).



**Abbildung 3.2: Anordnung der tags in den verschiedenen Expressionsvektoren.**

(A) Die *tags* stammen vom pNMT1-TOPO Vektor (siehe Abbildung 6.1).

(B) Das *His*<sub>6</sub>-tag wurde mittels PCR an das amplifizierte *CYP11B2* angefügt.

### 3.1.1.2 Aktivitätsvergleich zwischen den generierten Stämmen mit extra-chromosomalem *Shuttle*-Vektor und dem Referenzstamm MB164

Nach der Transformation mit dem Vektor pNMT1-TOPO wurden die vorliegenden Hefestämme auf ihre Fähigkeit, DOC umzusetzen, getestet und diesbezüglich mit dem Referenzstamm MB164 verglichen. Die Substratkonzentration betrug  $100 \mu\text{M}$ . Um den Einfluss verschiedener Versuchsparameter zu verfolgen, wurde die relative Produktbildung betrachtet, die sich folgendermaßen aus den erhaltenen Absorptionswerten für B bzw. DOC berechnen lässt:

$$\text{Relative Produktbildung [\%]} = \frac{\frac{I(\text{B})}{\text{Steigung}(\text{B})}}{\frac{I(\text{B})}{\text{Steigung}(\text{B})} + \frac{I(\text{DOC})}{\text{Steigung}(\text{DOC})}} * 100$$

- ▶ I: gemessene Absorption bei 240 nm
- ▶ Steigung: Steigung der Kalibriergeraden für das jeweilige Steroid (siehe Abschnitt 2.2.3.2)

Die HPLC-Analyse der *in vivo* Umsätze zeigt, dass die generierten Stämme in der Lage waren, DOC umzusetzen (Daten nicht gezeigt). Die relative Produktbildung der Stämme (Umsetzung von DOC zu B) über einen Zeitraum von 72 h sind sowohl graphisch (Abbildung 3.3) als auch tabellarisch (Tabelle 3.2) dargestellt. Die Tabelle enthält zudem die Ergebnisse des *t*-Tests.

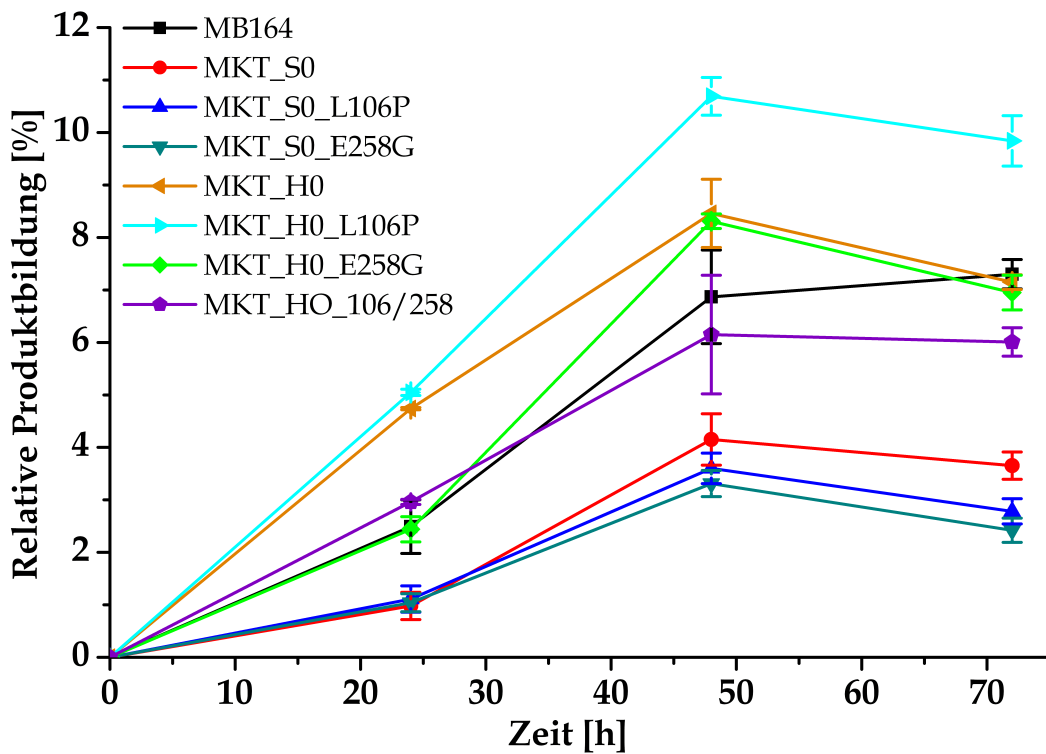


Abbildung 3.3: Vergleich zwischen den generierten Hefestämmen mit extra-chromsomalen Vektor und dem Referenzstamm MB164 hinsichtlich der Umsetzung von DOC über 72 h.

Tabelle 3.2: Relative Produktbildung der generierten Stämme mit extra-chromsomalen Vektor und dem Referenzstamm MB164 bei der Umsetzung von DOC über 72 h.

Die Werte des Referenzstammes sind gelb hinterlegt. Die in grau dargestellten Werte unterscheiden sich nicht signifikant von dem entsprechenden Wert des Referenzstammes MB164 ( $p < 0,05$ ).

	Relative Produktbildung [%] nach 24 h	Relative Produktbildung [%] nach 48 h	Relative Produktbildung [%] nach 72 h
MB164	2,49 ± 0,51	6,87 ± 0,89	7,30 ± 0,28
MKT_S0	0,98 ± 0,26	4,15 ± 0,49	3,65 ± 0,26
MKT_S0_L106P	1,11 ± 0,25	3,60 ± 0,29	2,78 ± 0,24
MKT_S0_E258G	1,04 ± 0,17	3,31 ± 0,25	2,42 ± 0,23
MKT_H0	4,74 ± 0,02	8,46 ± 0,65	7,15 ± 0,14
MKT_H0_L106P	5,05 ± 0,06	10,69 ± 0,36	9,84 ± 0,48
MKT_H0_E258G	2,44 ± 0,24	8,31 ± 0,14	6,95 ± 0,33
MKT_H0_106/258	2,96 ± 0,05	6,15 ± 1,13	6,01 ± 0,27

### **MKT\_S0 bzw. MKT\_H0 versus MB164**

Die Stämme MKT\_S0 und MKT\_H0 zeigen nach 72 h keine höhere relative Produktbildung als der Referenzstamm. Die relative Produktbildung des Stammes MKT\_S0 ist im Vergleich zu den beiden Stämmen MB164 und MKT\_H0 über den gesamten Zeitraum von 72 h am niedrigsten. Nach 24 h besitzt der Stamm MKT\_H0 die höchste relative Produktbildung, die sich jedoch nach weiteren 24 h nicht signifikant vom Referenzstamm unterscheidet. Die erhöhte relative Produktbildung des Stammes MKT\_H0 im Vergleich zum MKT\_S0 könnte auf den *His<sub>6</sub>-tag* am C-Terminus des Proteins zurückzuführen sein, da bekannt ist, dass eine entsprechende Modifikation bei CYP11B2 aus der Ratte einen positiven Einfluss auf die Enzymstabilität und somit indirekt auch auf die Produktbildung ausübt (Nonaka *et al.*, 1998).

### **MKT\_S0\_E285G bzw. pMKT\_H0\_E258G versus MB164**

Die Einführung der Mutation E258G in die *CYP11B2*-cDNA führte im Vergleich zum Referenzstamm MB164 zu keiner Erhöhung der relativen Produktbildung. Im Vergleich zu den Ausgangsstämmen MKT\_S0 bzw. MKT\_H0 ändert sich die relative Produktbildung auch durch diese Mutation nur geringfügig.

### **MKT\_S0\_L106P bzw. MKT\_H0\_L106P versus MB164**

Der Einfluss der Mutation L106P variiert in Abhängigkeit vom Ausgangsstamm: MKT\_S0\_L106P zeigt im Vergleich zu dem Referenzstamm MB164 weiterhin eine niedrige relative Produktbildung und keinen wesentlichen Unterschied zum Ausgangsstamm MKT\_S0. Im Gegensatz dazu zeigt MKT\_H0\_L106P bereits nach 48 h die höchste relative Produktbildung, sowohl im Vergleich zum Referenzstamm als auch zum Ausgangsstamm MKT\_H0. Die Produktbildung von MKT\_H0\_L106P ist nach dem beobachteten Zeitraum von 72 h weiterhin am stärksten.

### **MKT\_H0\_L106P/E258G versus MB164**

Der Stamm MKT\_H0\_106/258 zeigt ein Produktbildungsprofil, welches dem des Referenzstammes MB164 sehr ähnlich ist.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse konnte der vermutete positive Einfluss des *His<sub>6</sub>-tags* am C-Terminus des Proteins auf die Enzymstabilität und –aktivität des humanen CYP11B2 bestätigt werden. Die generierten Stämme, die CYP11B2 mit einem C-terminalem *His<sub>6</sub>-tag* exprimieren, zeigen eine durchgehend höhere Produktbildung als die entsprechenden Stämme mit *Pk-tag* am C-Terminus des CYP11B2.

Trotz der höheren Plasmid-Kopienzahl bei den generierten Stämmen, war keine markante Produktbildungserhöhung im Vergleich zum Referenzstamm MB164 erkennbar. Der Einfluss der Mutationen L106P und E258G muss ebenfalls als moderat bewertet werden. Beim Einsatz von extra-chromosomalen Vektoren liegt ein Nachteil darin, dass die Plasmid-Kopienzahl pro Zelle stark variiert (zwischen 5-30). Selbst in einer Kultur können unterschiedliche Anzahlen von Plasmiden pro Zelle vorliegen (Hayles & Nurse, 1992). Ein weiterer Nachteil beim Einsatz von extra-chromosomalen Vektoren ist die relativ hohe Wahrscheinlichkeit, das Episom trotz vorgegebenem Selektionsdruck aus den Zellen zu verlieren. Bei 10-50% der Hefezellen einer Population könnte der eingeführte Vektor aus den Zellen ausgeschleust sein (Hayles & Nurse, 1992).

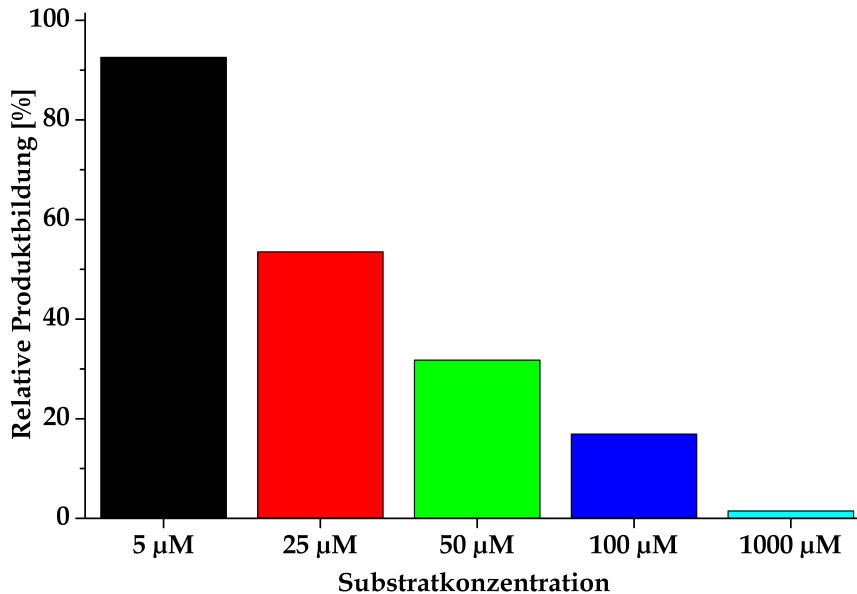
Da die Plasmid-Kopienzahl in den Stämmen, die den extra-chromosomalen Vektor pNMT1-TOPO enthalten, nicht regulierbar ist und auch nicht ermittelt werden kann, wurden alle nachfolgenden Untersuchungen mit dem Integrationsvektor pINT5-CYP11B2 durchgeführt, da dieser definierte Bedingungen hinsichtlich der Kopienzahl gewährleistet. Zusätzlich bietet die Verwendung des Integrationsvektors pINT5 die Möglichkeit, den entsprechenden auxotrophen Hefestamm mit einem weiteren Vektor zu transformieren. Nachdem die Wahl des *Shuttle*-Vektors für das Ganzzellsystem getroffen wurde, wurden Untersuchungen zur Substratkonzentration und Inkubationszeit durchgeführt.

### 3.1.2 Optimierung der Substratkonzentration und Inkubationszeit

Im Folgenden wird die Abhängigkeit der relativen Produktbildung von der Substratkonzentration und Umsatzzeit untersucht. Im Fokus steht die Frage, ob die Produktausbeute mit steigender Substratkonzentration und längerer Inkubationszeit erhöht werden kann. In Vorversuchen wurden MB164 Zellen mit verschiedenen DOC Konzentrationen (5  $\mu$ M bis



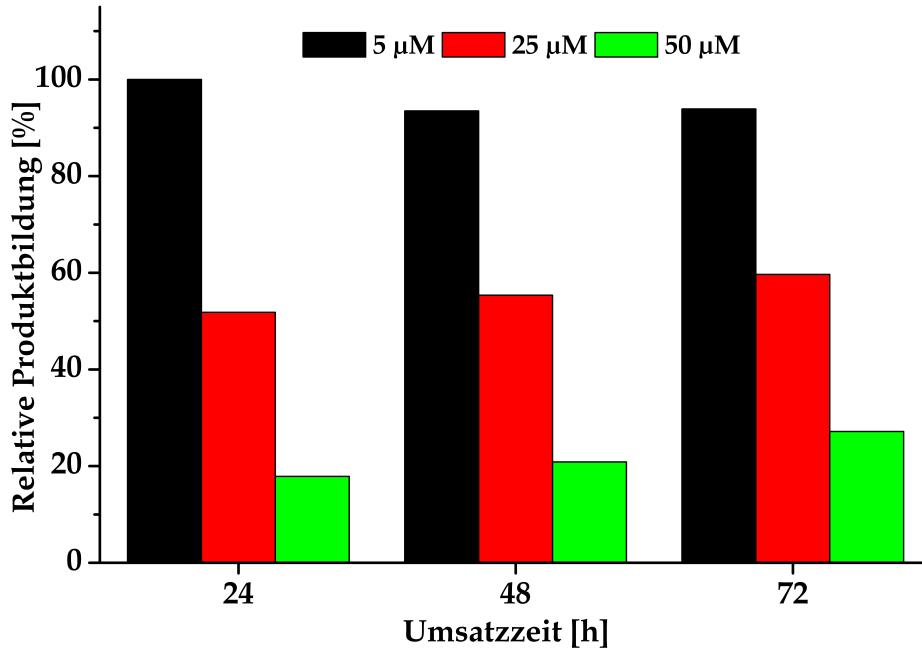
1000  $\mu\text{M}$ ) für 72 h inkubiert. Die Einfachmessungen zeigen, dass eine Erhöhung der Substratkonzentration nicht mit einer entsprechenden Erhöhung der absoluten Produktmenge an B einhergeht; entsprechend nimmt die relative Produktbildung ab (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4: Relative Produktbildung des Stammes MB164 in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.**

Inkubation von  $1 \cdot 10^8$  Zellen/ml mit verschiedenen DOC-Konzentrationen in EMM für 72 h bei  $30^\circ\text{C}$ .

Während bei der DOC Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  nahezu das gesamte Substrat zu B umgesetzt ist, ist es bei  $25 \mu\text{M}$  nur noch etwa die Hälfte. Bei der Vorgabe von 1 mM DOC sind sogar weniger als 2% des Substrats zu B umgesetzt worden. Das bedeutet, dass eine Erhöhung der Substratkonzentration nicht zu einer entsprechenden Erhöhung der Produktbildung führt. Weiterhin wurde die Produktbildung über die Zeit beobachtet. Hierfür wurden über einen Zeitraum von 72 h im Intervall von 24 h Proben genommen und analysiert. Die Substratkonzentrationen betragen 5, 25 bzw.  $50 \mu\text{M}$ . Wie aus Abbildung 3.5 ersichtlich ist, bleibt die relative Produktbildung über den beobachteten Zeitraum konstant. Das weist darauf hin, dass auch die Inkubationszeit keinen Einfluss auf den Umsatz von DOC hat. Unabhängig von der Substratkonzentration lassen sich keine wesentlichen Änderungen der Produktbildung im Zeitverlauf beobachten.



**Abbildung 3.5: Relative Produktbildung des Stammes MB164 in Abhängigkeit der Substratkonzentration und der Inkubationszeit.**

Inkubation von  $1 \cdot 10^8$  Zellen/ml mit verschiedenen DOC-Konzentrationen in EMM bei  $30^\circ\text{C}$ .

**Tabelle 3.3: Vergleich der relativen Produktbildung des Stammes MB164 mit 5 bzw. 25 μM DOC.**

Inkubation von  $1 \cdot 10^8$  Zellen/ml mit verschiedener DOC Konzentration in EMM für 24 h bei  $30^\circ\text{C}$ . Die Ergebnisse stammen von drei unabhängigen Experimenten.

Substratkonzentration [μM]	Relative Produktbildung [%]
5	$98,37 \pm 2,82$
25	$48,50 \pm 6,53$

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die folgenden Untersuchungen eine Inkubationszeit von 24 h festgelegt, da anschließend eine enzymatische Aktivität und damit das gebildete Corticosteron mittels HPLC messbar ist und auch bei einer längeren Inkubation mit keiner gesteigerten Produktbildung zu rechnen ist. Zur Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse bezüglich Substratkonzentration und Inkubationszeit wurden Dreifachmessungen für die Substratkonzentrationen von 5 und 25 μM durchgeführt und deren Ergebnisse verglichen. Dabei konnte die zuvor beschriebene Beobachtung bestätigt werden. Bei Vorgabe von 5 μM DOC wurde nahezu das gesamte, eingesetzte Substrat zu B umgesetzt, während bei 25 μM DOC nur etwa die Hälfte des Substrats zu B umgesetzt wurde (Tabelle 3.3).

### 3.1.3 Das *S. pombe* basierte Ganzzellsystem

Aus den Ergebnissen der Voruntersuchungen lässt sich das Ganzzellsystem ableiten, das als Basis für alle weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit dient. Als *Shuttle*-Vektor für die Mutagenese in *E. coli* und die Expression von CYP11B2 in *S. pombe* wird der Integrationsvektor pINT5 verwendet, da die Untersuchungen mit dem extra-chromosomalen Vektor pNMT1-TOPO keine ausgeprägte Aktivitätserhöhung des Enzyms gezeigt haben. Das Expressionsplasmid pINT5-CYP11B2 liegt bereits in dem etablierten Hefestamm MB164 vor. Dank der hohen Expressionsrate von CYP11B2 in der Spalthefe lassen sich die gebildeten Steroidmetabolite spektralphotometrisch erfassen, während die bisherigen Ergebnisse von CYP11B2 Mutanten auf Analysen basieren, bei denen radioaktiv markiertes Substrat eingesetzt wurde (Nguyen *et al.*, 2008, 2010). Da MB164 bei einer Vielzahl von Experimenten erfolgreich eingesetzt wurde, und hierbei zuverlässige und reproduzierbare Daten lieferte (Bureik *et al.*, 2004; Hakki *et al.*, 2011), wurde die CYP11B2-cDNA des pINT5-CYP11B2 als Template für die Erstellung der CYP11B2 Mutanten verwendet, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Die Voruntersuchungen im Hinblick auf die Substratkonzentration und die Inkubationszeit haben gezeigt, dass sowohl höhere Substratkonzentrationen als auch längere Inkubationszeit die Menge an Corticosteron nicht proportional erhöht. Für die Untersuchungen der CYP11B2 Mutanten in dem Ganzzellsystem wird daher 25  $\mu$ M DOC als Substrat vorgelegt, und für die Inkubation wird ein Zeitraum von 24 h angesetzt. Die Kultivierung der generierten Hefestämme und die Biotransformation von DOC werden bei einer Temperatur von 30°C im Schüttler bei 180 Upm durchgeführt. Als Referenzstamm zu den Hefestämmen, welche die CYP11B2 Mutanten exprimieren, wird der Hefestamm MB164, der CYP11B2\_WT exprimiert, bei allen Versuchen mitgeführt.

## 3.2 Evaluation des Ganzzellsystems anhand der CYP11B2 Mutanten

Aldosteronsynthese-Defizienz (CMO) Typ II beschreibt einen Defekt in der Aldosteronsynthese, bei der es im Blut bzw. Urin der Patienten aufgrund der fehlenden 18-Oxidationsaktivität zu einer Anreicherung des Aldosteron-Vorläufers 18OHB kommt. Als Ursache hierfür sind neben einer großen Anzahl an „*Missense*“-Mutationen auch „*Frameshift*“- , „*Nonsense*“- und Deletionsmutationen beschrieben.

In dieser Arbeit wurden neun „*Missense*“-Mutationen und eine Deletion-Mutation (Tabelle 3.4), die alle im Zusammenhang mit klinisch beobachteter Aldosteronsynthese-Defizienz stehen, mithilfe des zuvor etablierten Hefesystems untersucht. Hierfür wurden die Mutationen singulär in das im Integrationsplasmid pINT5 befindliche *CYP11B2* eingeführt. Das Resultat der Mutagenese wurde mittels Restriktionsanalysen nach der Präparation des Plasmides aus *E. coli* überprüft (siehe Abbildung 3.6).

**Tabelle 3.4: Auflistung der in dieser Arbeit untersuchten CYP11B2 Mutanten.**

<b>Mutation</b>	<b>Referenz</b>
CYP11B2_R181W	Pascoe <i>et al.</i> 1992
CYP11B2_R181Q	Dissertation Nguyen 2008
CYP11B2_D335G	Leshinsky-Silver <i>et al.</i> 2006
CYP11B2_173del	Peter <i>et al.</i> 1998
CYP11B2_V386A	Pascoe <i>et al.</i> 1992
CYP11B2_T318M	Zhang <i>et al.</i> 1995
CYP11B2_G435S	Kuribayashi <i>et al.</i> 2003
CYP11B2_T185I	Dunlop <i>et al.</i> 2003
CYP11B2_T498A	Dunlop <i>et al.</i> 2003
CYP11B2_E198D	Portrait-Doyen <i>et al.</i> 1998

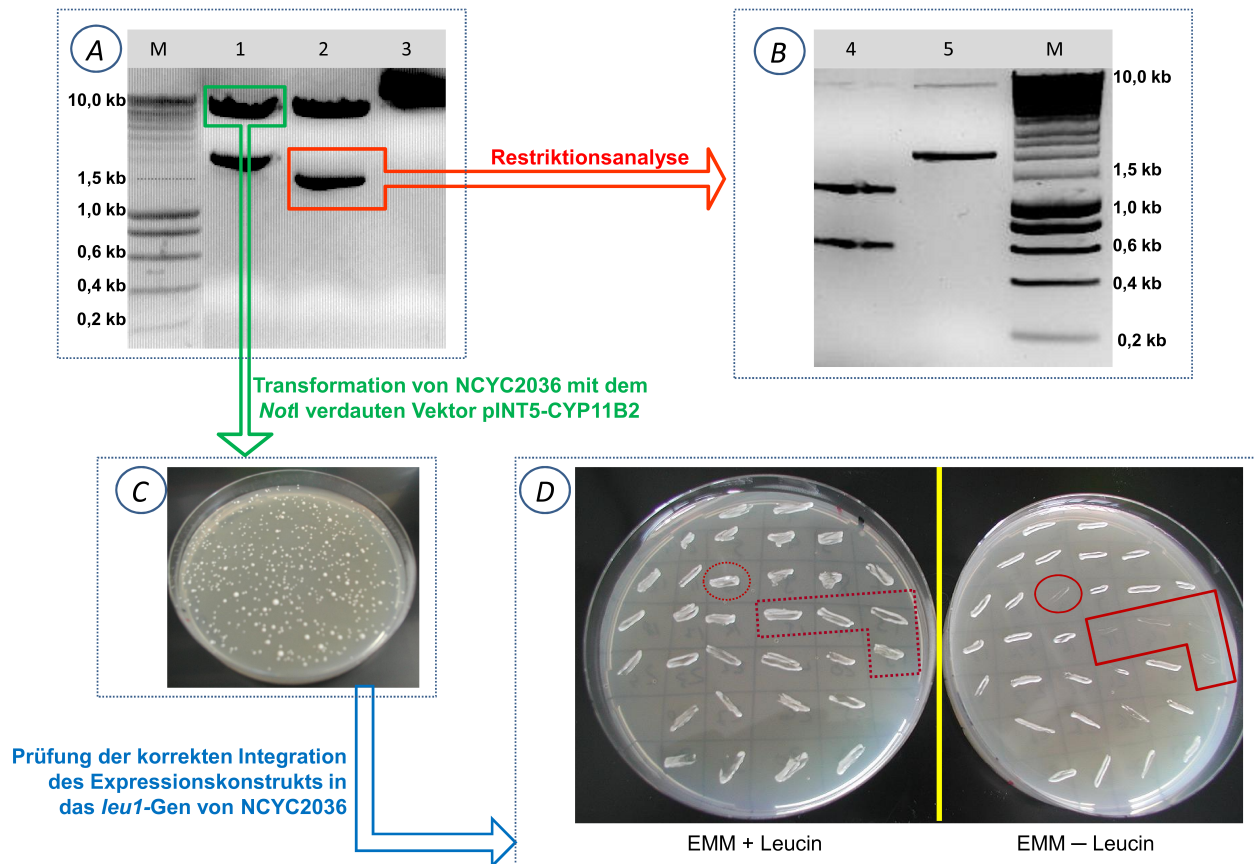
Nachfolgend werden die Arbeitsschritte, die zur Überprüfung des mutierten Expressionskonstrukts und zur Erstellung des dazugehörigen Hefestamms erforderlich sind, am Beispiel von pINT5-CYP11B2\_R181W beschrieben.

### 3.2.1 Erstellung der pINT-CYP11B2 Mutanten und der dazugehörigen Hefestämme

Zunächst wurden das unmutierte und das mutierte CYP11B2 Gen (Abbildung 3.6 A): Spur 2) über den Doppelverdau mit *NdeI* und *BamHI* aus dem Expressionskonstrukt pINT5-CYP11B2\_R181W isoliert. Das unmutierte Gen wurde ausschließlich zur Kontrolle mitgeführt. Zur Überprüfung der gewünschten Mutation R181W erfolgte ein analytischer Verdau mit *SmaI*. Abbildung 3.6 B) zeigt, dass durch die Mutation R181W die Schnittstelle für *SmaI* entfernt wurde. Während beim CYP11B2\_WT durch den enzymatischen Verdau zwei Fragmente vorliegen (Abbildung 3.6 B), Spur 4), ist CYP11B2\_R181W unverdaut (Abbildung 3.6 B), Spur 5) geblieben. Nach einer Bestätigung der Mutationen durch eine DNA-Sequenzierung, wurde das Integrationsfragment pINT5-CYP11B2\_R181W in den Hefestamm NCYC2036 transformiert.

Das Expressionsplasmid pINT5-CYP11B2\_R181W wurde mit *NotI* geschnitten und mittels Agarosegel-Elektrophorese vom 2 kb großen Fragment getrennt, welches die bakteriellen Sequenzen enthielt (Abbildung 3.6 A): Spur 1). Das 6,1 kb große Integrationsfragment wurde aus dem Agarosegel isoliert und zur Transformation des Hefestammes NCYC2036 verwendet (Abbildung 3.6 C)). Liegt eine korrekte Integration des Expressionsplasmids pINT5-CYP11B2\_R181W in das *leu1*-Gen von NCYC2036 vor, so sind die Zellen auf die Vorgabe von Leucin angewiesen. Durch diese Integration wird das *leu1*-Gen zerstört und der entstandene Hefestamm ist Leucin-auxotroph. Bei fehlerhafter Integration wurde das *leu1*-Gen nicht zerstört und die Zellen können auch ohne Leucinzusatz wachsen. Wie aus den Abbildungen 3.6 C) und 3.6 D) zu entnehmen, zeigen von den 36 untersuchten Klone nur fünf Klone eine korrekte Integration des Expressionskonstrukts pINT5 in das *leu1*-Gen. Diese Klone sind nicht in der Lage, auf einer EMM-Platte zu wachsen, der vorher kein Leucin zugesetzt war (Abbildung 3.6 D)).

Auf diese Art wurden im Rahmen dieser Dissertation 28 Hefestämme generiert, die CYP11B2 Mutanten heterolog exprimieren. Die erhaltenen Hefestämme wurden im Hinblick auf ihre Fähigkeit untersucht, DOC über die beiden Intermediate Corticosteron und 18-Hydroxycorticosteron zu Aldosteron umzusetzen.



**Abbildung 3.6: Darstellung der Schritte zur Überprüfung des mutierten Expressionsplasmids pINT-CYP11B2\_R181W und der Generierung des dazugehörigen Hefestamms.** Exemplarisch sind die Arbeitsschritte am pINT-CYP11B2\_R181W dargestellt.

**A) Restriktionsanalyse:**

Spur M: Marker, Spur 1: Verdau mit *NotI*, Spur 2: Verdau mit *NdeI* und *BamHI*, Spur 3: unverdauter Expressionsplasmid.

**B) Restriktionsanalyse zur Überprüfung der gerichteten Mutagenese.**

Spur 4: Verdau von CYP11B2\_WT mit *SmaI*, Spur 5: Verdau von CYP11B2\_R181W mit *SmaI*, Spur M: Marker.

**C) Abbildung einer bewachsenen EMM-Platte mit Hefekolonien.**

Transformation von NCYC2036 mit dem isolierten Integrationsfragment pINT5-CYP11B2\_R181W aus A).

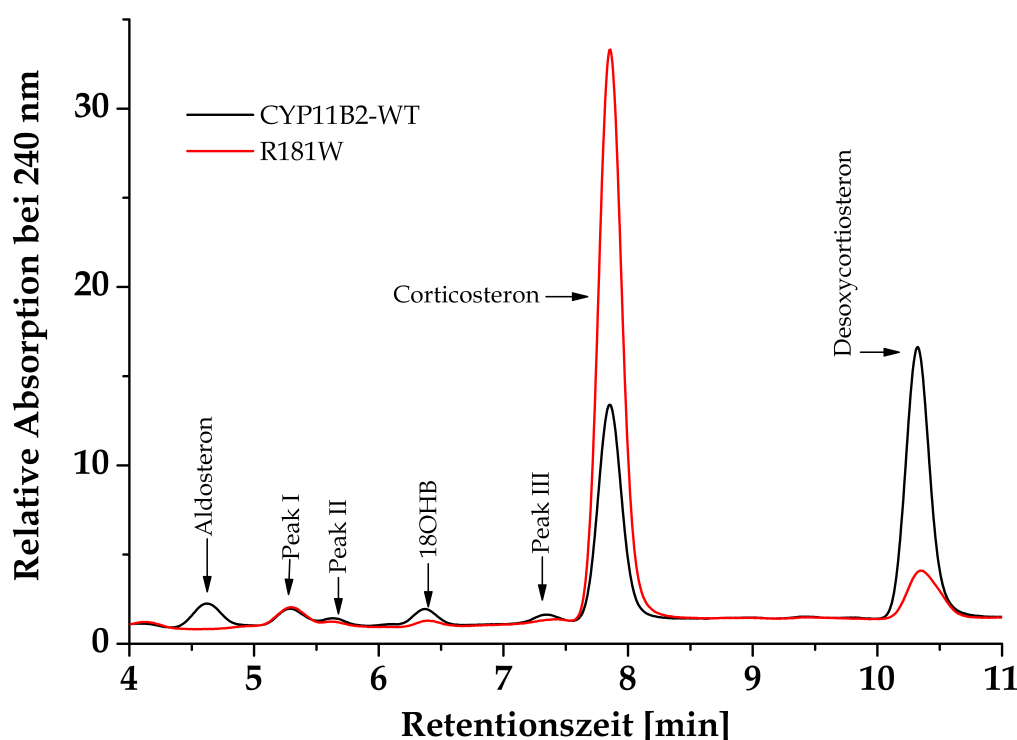
**D) Prüfung der korrekten Integration des Expressionskonstrukts pINT5-CYP11B2\_R181W in das *leu1*-Gen von NCYC2036.**

Übertragung der Klone von C): links: EMM-Platten mit Leucin  
rechts: EMM-Platten ohne Leucin: Bei der korrekten Integration von pINT5-CYP11B2\_R181W in das *leu1*-Gen kann auf der EMM-Platte ohne Leucinzusatz kein Wachstum des entsprechenden Hefestamms stattfinden (siehe rot markierte Bereiche).

### 3.2.2 *S. pombe*-Ganzzellsystem: Biotransformation des DOC

Nachdem die erforderlichen Hefestämme erstellt worden sind, erfolgte die Untersuchung der Enzymaktivität. Dazu wurden jeweils  $10^8$  Zellen/ml in 300 ml Erlenmeyer-Weithalskolben mit 10 ml EMM und  $25 \mu\text{M}$  DOC für 24 h inkubiert. Anschließend wurden

die Steroide extrahiert, mittels HPLC getrennt und anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7:** Exemplarisch sind die HPLC-Chromatogramme von Ganzzell-Biotransformationen der Stämme MB164 und R181W mit DOC als Substrat dargestellt. HPLC-Chromatogramme der extrahierten Proben nach 24 h Biotransformation bei 30°C mit 25  $\mu$ M DOC.

Zur Bewertung der einzelnen Mutationen auf die enzymatischen Aktivität von CYP11B2 wurden die Termini „Corticosteronbildung, 18-Hydroxycorticosteronbildung und Aldosteronbildung“ für die drei stattfindenden Reaktionsschritte 11 $\beta$ -Hydroxylierung, 18-Hydroxylierung und 18-Oxidation gewählt (siehe Abschnitt 2.2.3.2). Die Ergebnisse der Kalkulationen sind graphisch als Säulendiagramme dargestellt. Zusätzlich sind die Werte der Corticosteron-, 18-Hydroxycorticosteronbildungen auf den Wert des Wildtyps normiert einander gegenüber gestellt (Abbildung 3.8).

Die in dieser Arbeit untersuchten CYP11B2 Mutanten stehen im Zusammenhang mit CMO II. Charakteristisch für dieses Krankheitsbild ist eine gehemmte Aldosteronsynthese, mit der Konsequenz, dass Aldosteron nicht in ausreichenden Mengen gebildet werden. Die Analyse in der Spaltheife zeigen bei einigen der untersuchten Mutanten überraschenderweise eine Aldosteronbildung, die fast der Bildung von Aldosteron im CYP11B2 Wildtyp entspricht. Dies ist insbesondere bei den Mutanten CYP11B2\_D335G, CYP11B2\_V386A,

und CYP11B2\_G435S zu beobachten, und stehen damit im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen bei CMO Patienten, in deren Serum bzw. Urin kaum bzw. überhaupt kein Aldosteron nachweisbar ist.

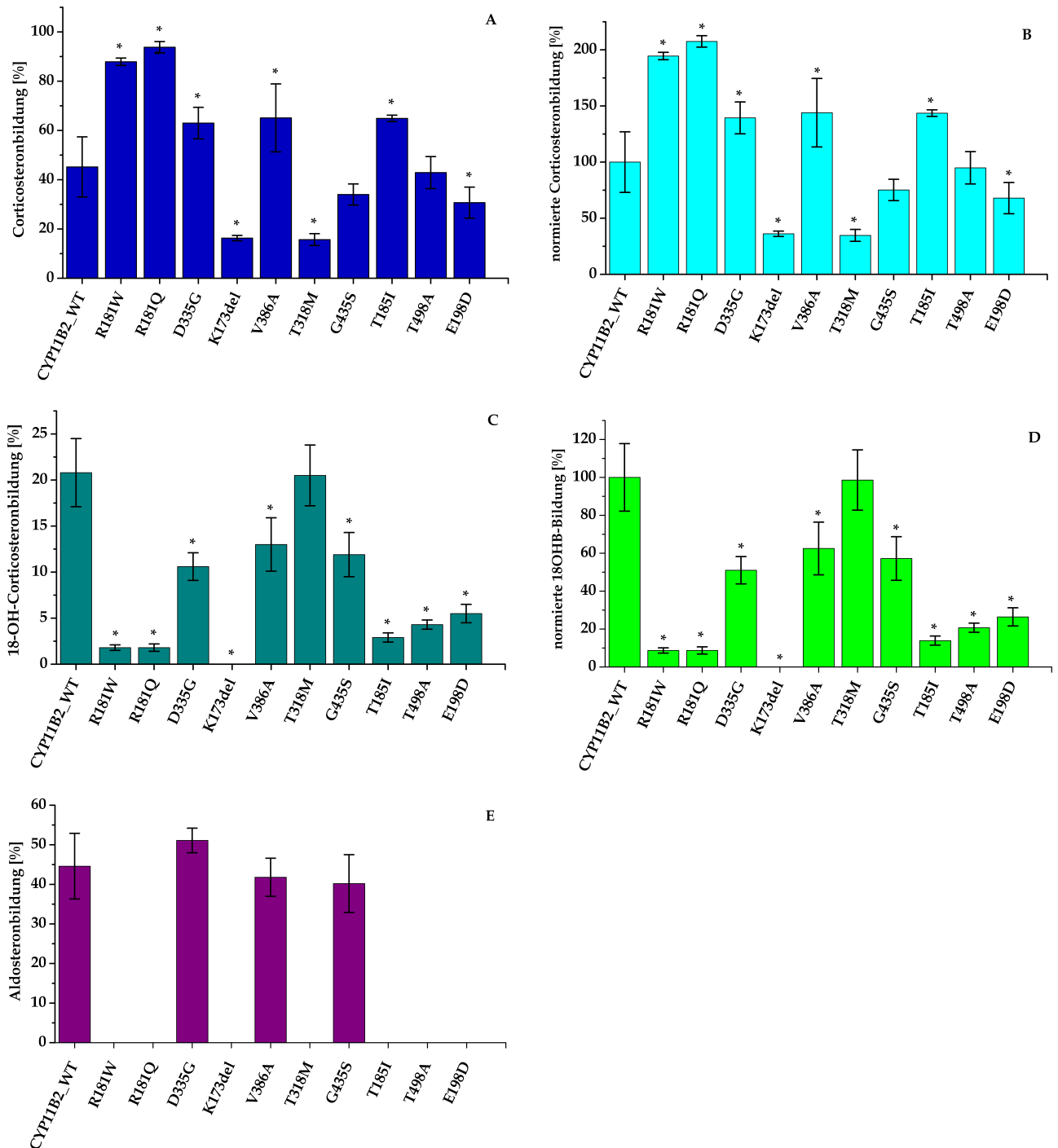
Die untersuchten CYP11B2 Mutationen zeigen verschiedene Effekte auf die von der Aldosteronsynthese katalysierte Teilschritte. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Untersuchungen in der Spaltheife näher beschrieben.

Die Mutation R181W war die erste Mutation, die im Zusammenhang mit Aldosteronsynthese-Defizienz Typ II beschrieben wurde (Pascoe *et al.*, 1992). In der Spaltheife zeigt R181W eine extrem gesteigerte Corticosteronbildung, während die 18-Hydroxycorticosteronbildung stark herabgesetzt ist und keine Aldosteronbildung zu verzeichnen ist. Vergleicht man die Corticosteronbildung der Mutanten mit der des Wildtyps, so zeigt die Mutante eine nahezu verdoppelte Corticosteronbildung.

Im Zusammenhang mit CMO II wurde für die Aminosäureposition 181 eine weitere Mutation, R181Q, beschrieben (Nguyen, 2008). Die heterologe Expression der Mutante R181Q in *S. pombe* zeigt eine ähnliche Steroidbildung wie die Mutante R181W. Die Corticosteronbildung ist im Vergleich zum Wildtyp viel höher, während die Fähigkeit, Corticosteron zu 18OHB zu hydroxylieren, stark reduziert ist und die Folgereaktion zu Aldosteron überhaupt nicht zu beobachten ist.

Die Mutante D335G wurde von Leshinsky-Silver *et al.* beschrieben (Leshinsky-Silver *et al.*, 2006). Die *in vivo* Untersuchung der CYP11B2 Mutante D335G in Spaltheife zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Corticosteronbildung und eine verringerte 18-Hydroxycorticosteronbildung, aber keine signifikante Änderung der Aldosteronbildung. Peter *et al.* fanden die bislang einzige Deletionsmutation in *CYP11B2*, die im Zusammenhang mit CMO II beschrieben wurde (Peter *et al.*, 1998). Der Verlust der Aminosäure an der Position 173 hat gravierende Auswirkungen auf die Enzymaktivität, die Corticosteronbildung ist weniger als halb so hoch wie die Corticosteronbildung des Wildtyps und die anschließenden Hydroxylierung und Oxidation an Position 18 des Steroidgerüsts bleiben aus.





**Abbildung 3.8: Graphische Darstellung der Corticosteron- (A, B) und 18-Hydroxycorticosteronbildungen (C, D) sowie der Aldosteronbildung (E) der verschiedenen CYP11B2 Mutanten.**

Die Corticosteron- und 18-Hydroxycorticosteronbildungen (A) bzw. (C) und auf den WT normierte Steroidbildung (B) bzw. (D) wurden graphisch dargestellt. Die Unterschiede der jeweiligen Mutante im Bezug zum Wildtyp wurden mittels eines *t*-Tests überprüft. Die Signifikanz-Grenze beträgt  $p < 0,05$ ; die Mutanten mit einem signifikanten Unterschied sind mit einem \* versehen.

Um eine Bewertung der generellen Eignung und Verlässlichkeit des neu etablierten Hefe-basierten Ganzzellsystems vornehmen zu können, wurden CYP11B2 Mutanten, die

bereits heterolog in Zelllinien exprimiert und bezüglich ihres Steroidprofils untersucht worden sind (Tabelle 3.4), ebenfalls mithilfe des *S. pombe*-Systems untersucht.

Die Mutation V386A wurde in Zusammenhang mit CMO II und gemeinsam mit R181W beschrieben (Pascoe *et al.*, 1992). Die Enzymaktivität der Einzelmutante V386A in *S. pombe* ähnelt dem des Wildtyps. Es zeigt sich eine normale Aldosteron- und eine leicht gestiegene Corticosteronbildung, während die 18-Hydroxycorticosteronbildung leicht herabgesetzt ist.

Die CYP11B2 Mutante T318M (Zhang *et al.*, 1995) zeigt einen vollständigen Verlust der Aldosteronbildung und besitzt nur noch etwa 1/3 der Corticosteronbildung des Wildtyps. Die 18-Hydroxycorticosteronbildung des CYP11B2 hingegen wird durch diese Mutation nicht beeinflusst.

In der japanischen Bevölkerung wurde bei Patienten mit CMO-Defizienz Typ II die Mutation G435S in *CYP11B2* ermittelt (Kuribayashi *et al.*, 2003). Die Mutation beeinflusst nur die 18-Hydroxycorticosteronbildung (WT:  $20,8 \pm 3,7\%$ ; G435S:  $11,9 \pm 2,4\%$ ), während die Corticosteron- und Aldosteronbildungen mit denen des Wildtyps vergleichbar sind.

Die *CYP11B2* Mutationen T185I und T498A (Dunlop *et al.*, 2003) zeigen jeweils einen vollständigen Verlust der Aldosteronbildung und eine reduzierte 18-Hydroxycorticosteronbildung. Der Einfluss der beiden Mutationen auf die Corticosteronbildung ist unterschiedlich. Im Fall der T185I Mutante ist die Corticosteronbildung leicht gesteigert, während die Corticosteronbildung der T498A Mutante keinen signifikanten Unterschied zu der des Wildtyps zeigt.

Die Mutation E198D (Portrat-Doyen *et al.*, 1998) hat einen negativen Einfluss auf die Steroidbildung von CYP11B2: sowohl die Corticosteron- als auch die 18-Hydroxycorticosteronbildungen sind herabgesetzt, und die Aldosteronbildung ist nicht nachweisbar.

### 3.3 Eignung des Ganzzellsystems zur biotechnologischen Produktion von 18-Hydroxycorticosteron

Der Vergleich der Steroidprofile der CYP11B2 Mutanten zeigt, dass die meisten Mutanten einen Defekt der 18-Oxidaseaktivität aufweisen. Dadurch ist nicht mehr Aldosteron, sondern 18OHB das Endprodukt des DOC Umsatzes. Die Enzymaktivitäten in den vorliegenden Hefestämmen sind jedoch für einen biotechnologischen Einsatz zu gering.

Durch rationales Proteindesign sollten daher im nächsten Schritt CYP11B2 Mutanten mit höherer Aktivität generiert werden, um mehr 18-Hydroxycorticosteron mithilfe des etablierten Hefesystems zu produzieren. In der Literatur sind einige Mutationen der Aldosteronsynthese beschrieben, die in Zelllinien höhere Steroidprodukte liefern als der Wildtyp. Deren Auswirkungen auf die Enzymaktivität der in *S. pombe* heterolog exprimierten Aldosteronsynthese werden daher im Folgenden untersucht, mit dem Ziel, die Enzymaktivität und somit die Steroidausbeute zu erhöhen.

#### 3.3.1 Generierung von CYP11B2 Mehrfachmutanten zur Aktivitätserhöhung

Als Ausgangsplasmide für die Generierung der Doppelmutanten wurden pCYP11B2\_R181Q, pCYP11B2\_R181W, pCYP11B2\_T185I, pCYP11B2\_E198D und pCYP11B2\_T318M ausgewählt. Gemeinsames Merkmal dieser Ausgangsmutanten ist die fehlende Aldosteronbildung, d.h. es war kein Aldosteron mittels der HPLC zu detektieren. Die Synthese von 18-Hydroxycorticosteron setzt die Bildung von Corticosteron voraus. Die Mutanten R181 und R181Q zeigten bei den Untersuchungen die größte Corticosteronbildung. Die Mutante T185I besitzt neben den 181er-Mutanten R181Q und R181W ebenfalls eine größere Corticosteronbildung als der Wildtyp. Im Hinblick auf die 18-Hydroxycorticosteronbildung zeigen jedoch fast alle untersuchten Mutanten eine niedrigere Bildungsrate als der CYP11B2\_WT. Lediglich T318M weist eine mit dem Wildtyp vergleichbare 18-Hydroxycorticosteronbildung auf. Die Mutante E198D wurde ebenfalls

als Ausgangsmutante für die Generierung der Doppelmutante gewählt. Portrat-Doyen et al. zeigten, dass die E198D Mutante in Zellkulturexperimenten als Einzelmutante eine dem Wildtyp ähnliche Aktivität besitzt, während E198D in Kombination mit anderen Mutationen die Enzymaktivität des CYP11B2 eindeutig verändert (Portrat-Doyen *et al.*, 1998). In der Spalthefe zeigt die Mutante E198D keine Aldosteronbildung. Im Folgenden wird untersucht, inwiefern Mehrfachmutationen auf der Basis von E198D einen positiven Einfluss auf die Aktivität der Aldosteronsynthese ausüben.

Die Mutationen Q404R, A414P bzw. H439Y zeigten in Experimenten mit JEG-3 Zellen eine allgemeine Aktivitätssteigerung (Holloway *et al.*, 2009), mit einer gesteigerten Produktion von Corticosteron und Aldosteron. Diese Mutationen sollten daher ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Produktion von 18OHB als Zwischenprodukt der Aldosteronsynthese zu haben, da mehr Vorläufer, Corticosteron, für die 18OHB-Synthese vorhanden ist.

Darüber hinaus beschrieben Fardella et al. eine vierfache Steigerung der 18-Hydroxycorticosteron-Bildung durch die Mutante K251R (Fardella *et al.*, 1995).

Die vier Mutationen Q404R, A414P, H439Y und K251R wurden daher im Hinblick auf ihr Potential zur Steigerung der Gesamtaktivität mit den Ausgangsplasmiden kombiniert (Tabelle 3.5):

**Tabelle 3.5: Mögliche Kombinationen der oben beschriebenen Mutationen zur Erhöhung der Steroidbildung.**

+: Hefestamm liegt vor, DOC-Umsätze wurden nicht durchgeführt

++: DOC-Umsätze wurden durchgeführt

-: Hefestamm liegt nicht vor

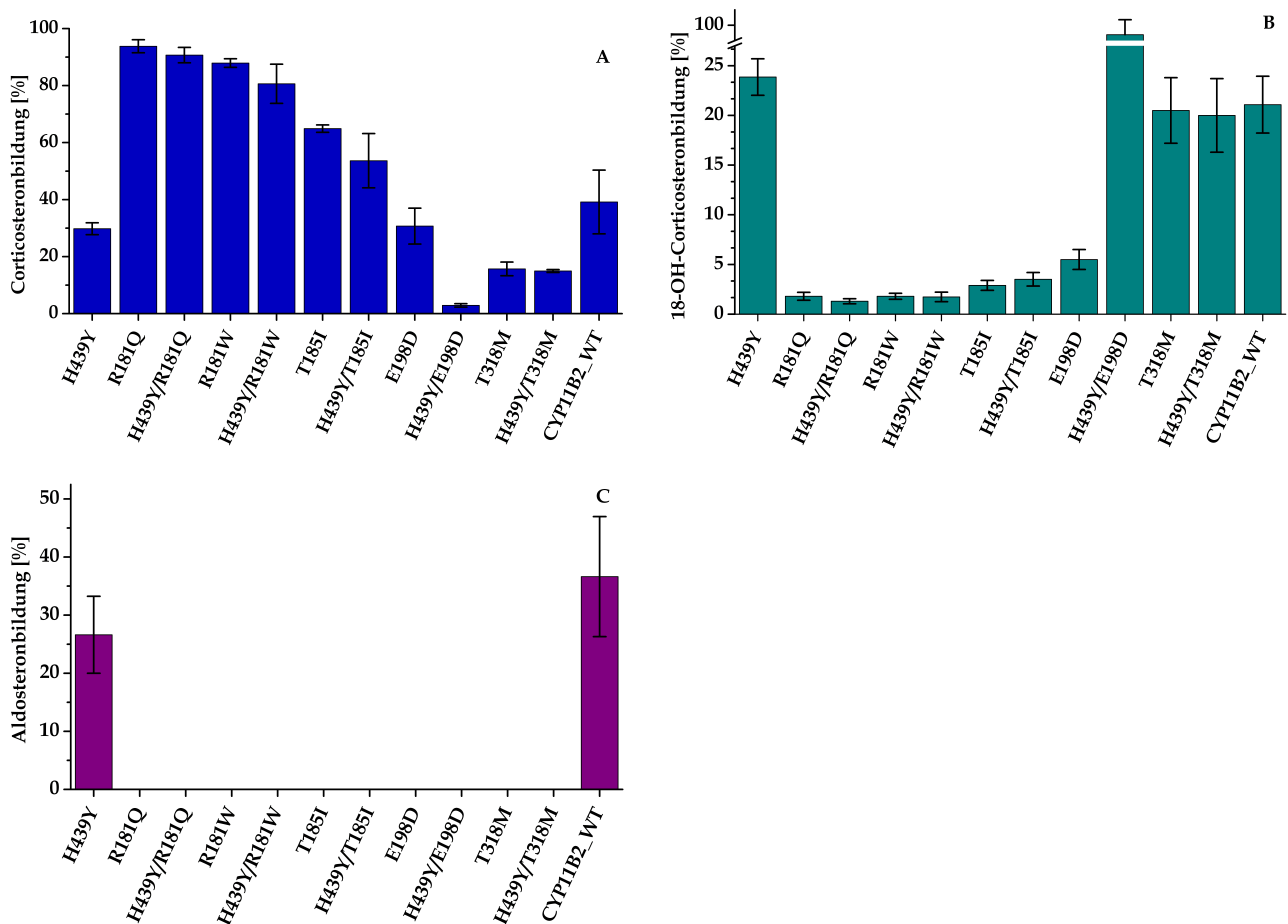
	<b>R181Q</b>	<b>R181W</b>	<b>T185I</b>	<b>E198D</b>	<b>T318M</b>
Q404R	++	+	++	++	+
A414P	++	++	++	++	-
H439Y	++	++	++	++	++
K251R	+	++	++	+	++

Im zeitlich begrenzten Rahmen dieser Dissertationen gelang es, 19 von 20 möglichen Doppelmutanten als transformierte Hefestämme zu generieren. Darüber hinaus konnten für 15 dieser Stämme *in vivo* Umsätze durchgeführt und ihre Eignung für eine potentielle biotechnologische Anwendung evaluiert werden. Zusätzlich wurden die Einzelmutanten

Q404R, A414P und H439Y als Hefestämme etabliert und die Biotransformation von DOC mit den entsprechenden Stämmen ebenfalls untersucht.

### 3.3.2 18OHB–Synthese: Biotransformation des DOC

Die Ergebnisse sind graphisch als Säulendiagramme dargestellt. Die Abbildungen stellen die kalkulierten Werte der Corticosteron- (A) und 18-Hydroxycorticosteronbildungen (B) sowie der Aldosteronbildung (C) der verschiedenen CYP11B2 Mutanten dar. In jeder Abbildung ist auch der Wert von MB164, dem Hefestamm, der den CYP11B2\_WT exprimiert, dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde jeder Doppelmutante die entsprechende Einzelmutante (Abschnitt 3.2.2) gegenübergestellt.



**Abbildung 3.9: Graphische Darstellung der Corticosteron- (A) und 18-Hydroxycorticosteronbildungen (B) sowie der Aldosteronbildung (C) der verschiedenen CYP11B2 Mutanten.**

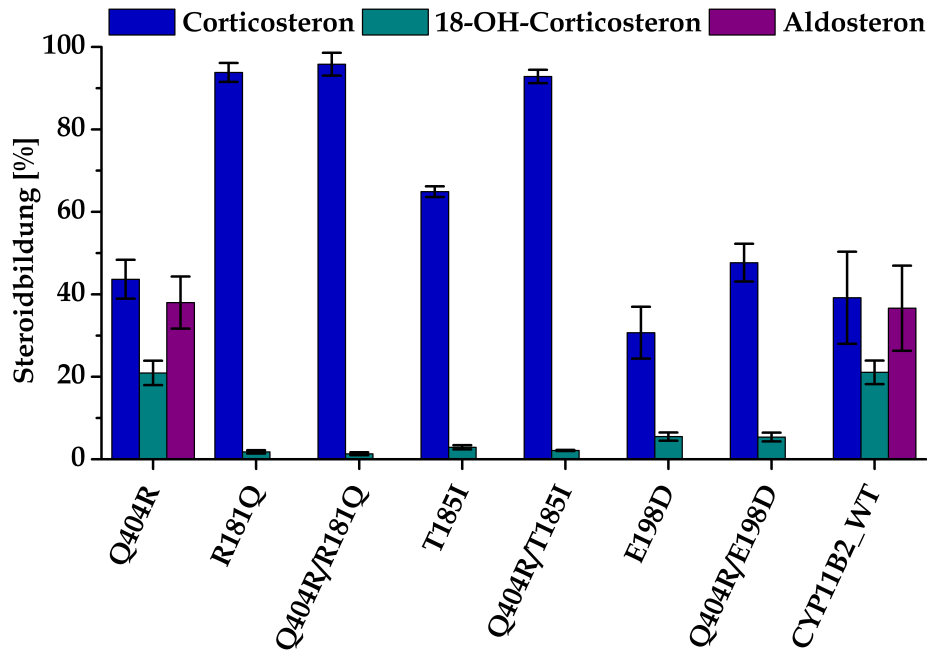
Die Ergebnisse stellen den Mittelwert aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar.

Holloway beobachtete bei der Mutante H439Y einen signifikanten Anstieg des gebildeten Corticosterons und Aldosterons im Vergleich zum CYP11B2\_WT (Holloway *et al.*, 2009). Daher wurde zunächst die Mutante H439Y sowohl als Einzelmutante als auch als Doppelmutante in Spaltheefe untersucht. Betrachtet man die Einzelmutante H439Y, so lassen sich bei der *in vivo* Analyse in der Hefe keine markanten Verbesserungen in der Steroidbildung zum Wildtyp erkennen. H439Y zeigt etwas niedrigere Corticosteron- und 18-Hydroxycorticosteronbildungen als der Wildtyp, während die Aldosteronbildung der des Wildtyps ähnelt. Die Steroidbildung der Doppelmutanten, bestehend aus der Kombination von H439Y mit der Mutation R181W, R181Q, T185I oder T318M, zeigen im Vergleich zu den Einzelmutanten R181W, R181Q, T185I bzw. T318M nur leichte Unterschiede. Diese Doppelmutanten sind ebenso wie die Einzelmutanten nicht in der Lage, Aldosteron zu bilden; auch die Corticosteron- und 18-Hydroxycorticosteronbildungen ähneln denen der entsprechenden Einzelmutanten (Abbildung 3.9). Dagegen zeigt sich bei der Doppelmutante H439Y/E198D eine drastische Reduktion der Corticosteronbildung. Diese sinkt auf ein Zehntel ( $2,9 \pm 0,6\%$ ) der Aktivität von E198D ( $30,7 \pm 6,3\%$ ) bzw. H439Y ( $29,8 \pm 2,1\%$ ). Die 18-Hydroxycorticosteronbildung hingegen ist deutlich gesteigert (H439Y/E198D:  $87,6 \pm 19,6\%$ , WT:  $21,1\%$ ), während die Aldosteronbildung nicht nachweisbar ist.

Holloway beobachtete neben der Mutation H439Y auch bei den Mutationen Q404R und A414P eine Steigerung der Gesamtaktivität. Diese beiden Mutationen wurden ebenfalls in der Spaltheefe sowohl als Einzelmutante als auch als Doppelmutante heterolog exprimiert und *in vivo* untersucht.

Die Einzelmutanten Q404R (Abbildung 3.10) und A414P (Abbildung 3.11) katalysieren im Hefesystem alle drei erforderlichen Reaktionsschritte, um Aldosteron aus DOC zu bilden und weisen keine markanten Unterschiede zum Wildtyp auf. Dagegen zeigen die Doppelmutanten keine messbare Aldosteronbildung. Im Fall der Doppelmutanten Q404R/R181Q und A414P/R181Q konnten im Vergleich zu der entsprechenden Einzelmutante R181Q keine entscheidenden Aktivitätsänderungen beobachtet werden. CYP11B2\_R181W zeigt in Kombination mit A414P ebenfalls keine gravierende Aktivitätsänderungen. Interessanterweise blieb die hohe Corticosteronbildung, die vermutlich auf die Mutation R181Q bzw. R181W zurückzuführen ist, durch die zusätzliche Mutation unverändert. Die Hefestämme, die die Doppelmutanten Q404R/R181Q, A414P/R181Q oder A414P/R181W exprimieren,

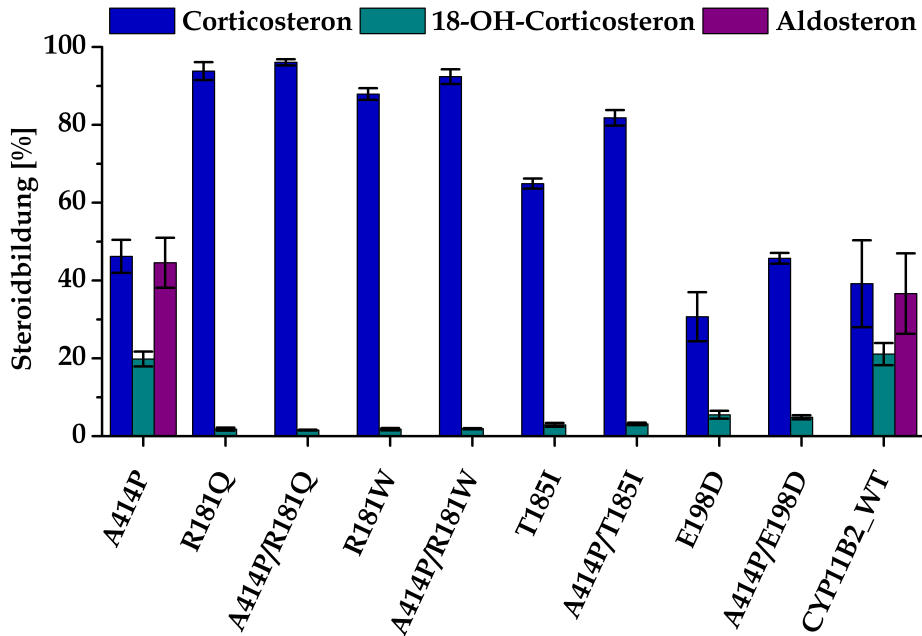
zeigen weiterhin eine ausgeprägte Corticosteronbildung. Bei den Mutationen T185I und E198D führen die zusätzlichen Mutationen, Q404R bzw. A414P, zwar zu einer Erhöhung der Corticosteronbildung. Die 18-Hydroxycorticosteronbildung blieb durch die zusätzliche Mutation leider weiterhin sehr gering.



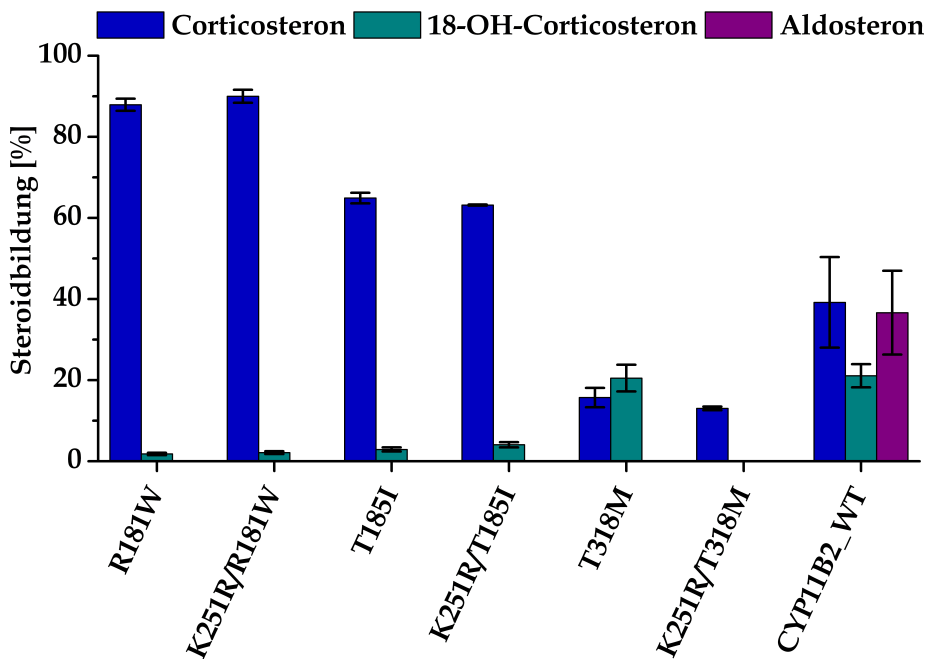
**Abbildung 3.10: Graphische Darstellung der Corticosteron- und 18-Hydroxycorticosteronbildungen sowie der Aldosteronbildung der CYP11B2 Einzel- und Doppelmutanten.**  
Die Ergebnisse stammen von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Damit kann festgestellt werden, dass die von Holloway beschriebenen CYP11B2 Mutationen *in vivo* mit Spalthefe nicht zu der gewünschten Erhöhung der Enzymaktivität bzw. der Steroidbildung führten. Weder die Einzelmutanten Q404R, A414P bzw. H439Y noch die Doppelmutanten der jeweiligen Kombinationen mit R181W, R181Q, T185I, E198D bzw. T318M zeigen die angestrebte Aktivitätssteigerung von CYP11B2 bezüglich einer 18OHB-Produktion.

Fardella beschrieb mit der Mutante K251R eine CYP11B2 Variante mit einer erhöhten Bildung von 18OHB (Fardella *et al.*, 1995). In *S. pombe* zeigt die Kombination K251R mit den jeweiligen Mutationen R181W, T185I oder T318M allerdings ebenfalls keine Verbesserung der Enzymaktivität bezüglich der 18OHB-Produktion. Die Doppelmutante K251R/T318M zeigt, im Gegenteil, sogar keine 18-Hydroxylaseaktivität mehr, während bei der Einzelmutante T318M 18OHB noch detektierbar war (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.11:** Graphische Darstellung der Corticosteron- und 18-Hydroxycorticosteronbildungen sowie der Aldosteronbildung der CYP11B2 Einzel- und Doppelmutanten. Die Ergebnisse stammen von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.



**Abbildung 3.12:** Graphische Darstellung der Corticosteron- und 18-Hydroxycorticosteronbildungen sowie der Aldosteronbildung der CYP11B2 Einzel- und Doppelmutanten. Die Ergebnisse stammen von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.



Die Ergebnisse von Abschnitt 3.3.2 zeigen, dass die untersuchten CYP11B2 Mutanten keine höhere 18-Hydroxylierungsaktivität hatten als der Wildtyp. Es liegen zwar zwei Mutanten vor, die vermehrt B aus DOC bilden, doch sinkt dafür die 18-Hydroxylierungsaktivität auf etwa ein Zehntel der des Wildtyps. Auch zeigt keine der erzeugten Doppelmutanten eine Steigerung der 11 $\beta$ -Hydroxylierungsaktivität in Kombination mit einer Steigerung der 18-Hydroxylierungsaktivität, so dass die Ausbeute von 18OHB im Vergleich zum Wildtyp nicht gesteigert werden konnte.

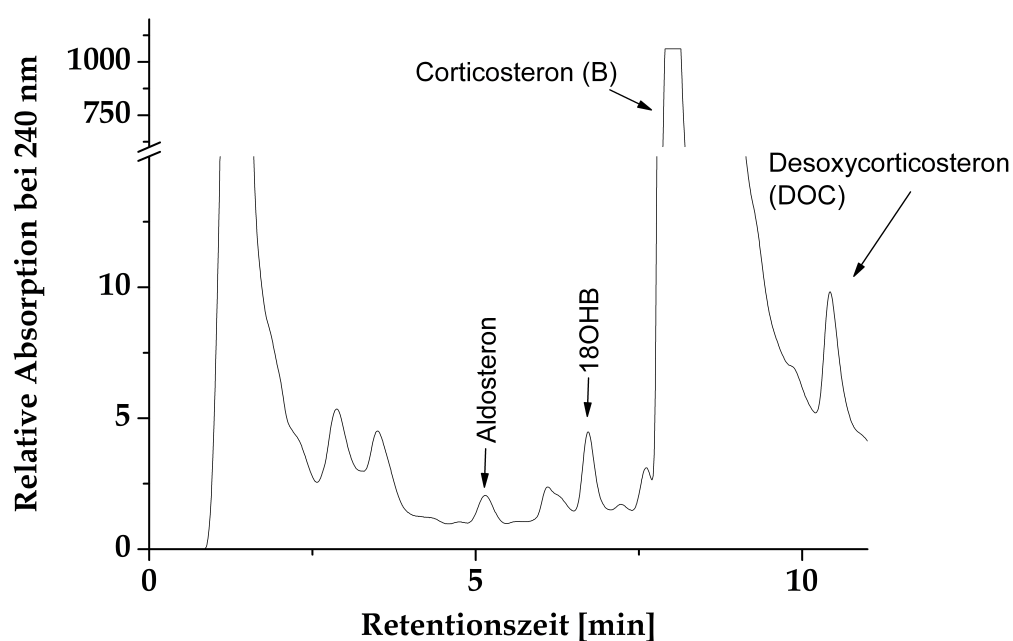
### **3.3.3 Optimierungsversuche des Ganzzellsystems bezüglich der 18OHB-Produktion**

In den beschriebenen Ansätzen wurde versucht, aus dem natürlichen Substrat von CYP11B2, DOC, das gewünschte Steroid 18OHB zu produzieren. Hierzu muss die Aldosteronsynthese zwei Hydroxylierungen hintereinander durchführen, um 18OHB als Produkt zu erhalten. Bei der Untersuchung der CYP11B2 Mutanten zeigte sich, dass die Enzymaktivität für eine biotechnologische 18OHB-Produktion zu niedrig ist. Für eine weitere Bewertung des Hefesystems zur biotechnologischen Synthese von 18OHB, wurde die erste Hydroxylierung ausgeblendet, um zu prüfen, ob mehr 18OHB gebildet wird, wenn das Enzym nur den zweiten Schritt der Aldosteronsynthese katalysieren muß, also nur die 18-Hydroxylierung von Corticosteron. Desweiteren wurde auch überprüft, ob die gleichzeitige Vorgabe von DOC und B das chemische Gleichgewicht in Richtung 18OHB, dem Zielsteroid, verlagern würde. Abschließend wird der Einfluss zusätzlicher Elektronentransferproteine auf die Enzymaktivität und damit auf die Steroidbildung untersucht.

#### **3.3.3.1 Corticosteron als Substrat**

Die Beschränkung auf nur einen Schritt in der Aldosteronsynthese hätte den Vorteil, dass nur Mutationen zur Steigerung der 18-Hydroxylierungsaktivität berücksichtigt werden müssten, und nicht wie im ersten Ansatz die 11 $\beta$ -Hydroxylierungsaktivität und parallel die 18-Hydroxylierungsaktivität. Es wurden daher Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Ausbeute von 18OHB unter der Vorgabe von Corticosteron als Substrat gemessen wurde. Jedoch stellte sich heraus, dass das Substrat Corticosteron mit einer Konzentration

von  $25 \mu\text{M}$  von der Aldosteronsynthase nicht angenommen wird. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich im hohen  $K_D$  für Corticosteron (Hobler *et al.*, 2010). Hobler zeigte, dass beim WT der  $K_D$  für Corticosteron das 86-fache des  $K_D$  von Desoxycorticosteron, dem natürlichen Substrat von CYP11B2, beträgt ( $K_D$  (DOC):  $1,34 \pm 0,13 \mu\text{M}$ ,  $K_D$  (B):  $115 \pm 6 \mu\text{M}$ ). Die Affinität des Enzyms zum Intermediat Corticosteron ist im Vergleich zum natürlichen Substrat DOC stark reduziert. Damit CYP11B2 Corticosteron in die Substratbindungstasche aufnimmt, muß wesentlich mehr B vorgelegt werden. Mit einer Erhöhung der Konzentration von B von  $25 \mu\text{M}$  auf  $600 \mu\text{M}$  konnte die Bildung von 18OHB und Aldosteron detektiert werden (Abbildung 3.13). Leider sind die produzierten Mengen im Vergleich zur eingesetzten Substratmenge nicht rentabel (ca.  $10 \text{ nmol}$  18OHB bei Vorgabe von  $6000 \text{ nmol}$  B  $\hat{=} 0,2\%$  18OHB aus B), so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

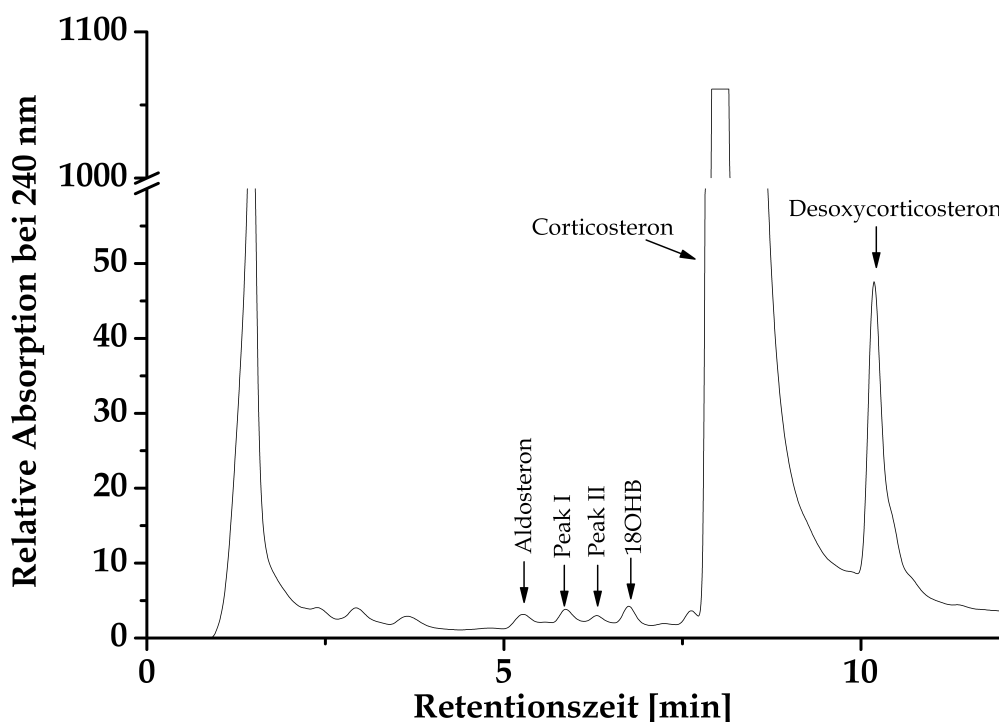


**Abbildung 3.13: HPLC-Chromatogramm des *in vivo* Umsatzes von Corticosteron ( $600 \mu\text{M}$ ) mit MB164.**

Die vorgegebene Konzentration von B ( $600 \mu\text{M}$ ) lag über dem Meßbereich des verwendeten Detektors. Die messbare Menge an Desoxycorticosteron stammt vermutlich aus dem eingesetzten Corticosteron. Das Corticosteron stammt von Sigma Aldrich®, das mit einer Reinheit von  $\geq 98,5\%$  deklariert ist.

Es wird angenommen, dass für die *in vivo* Bildung von Aldosteron bzw. 18OHB das Steroidmolekül während der gesamten Reaktion im aktiven Zentrum verbleiben muß und das Steroid nach dem ersten Reaktionsschritt eine Positionsänderung durchläuft, um das

Molekül für die anschließenden C<sub>18</sub>-Reaktion optimal auszurichten. Sobald eines der Intermediate, Corticosteron oder 18-Hydroxycorticosteron, die Substrattasche verlässt, wird nur noch DOC als Substrat aufgenommen (Hobler *et al.*, 2011). In der Annahme, dass die Aldosteronsynthese ein chemisches Gleichgewicht darstellt, soll durch die zusätzliche Zugabe von B verhindert werden, dass B das aktive Zentrum verlässt. Nach dem „Prinzip vom kleinsten Zwang“ sollen die hohen Konzentrationen von DOC und B die Weiterreaktion zu 18OHB bewirken. Es wurde daher untersucht, ob eine gleichzeitige Vorgabe von DOC und B als Substrate die Bildung von 18OHB erhöht.



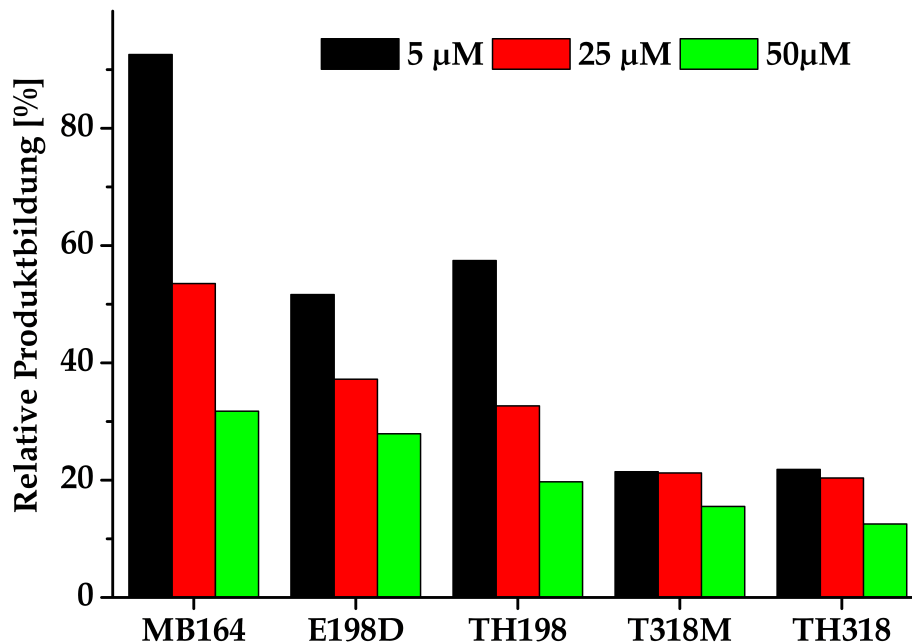
**Abbildung 3.14: HPLC-Chromatogramm des *in vivo* Umsatzes von Corticosteron (600 µM) und DOC (25 µM) mit MB164.**

Die vorgegebene Konzentration von B (600 µM) lag über dem Meßbereich des verwendeten Detektors.

Auch hier wurde B in 24-fach höherer Konzentration als DOC (25 µM) vorgelegt, da CYP11B2 eine geringere Affinität zu B als zu DOC aufweist (Hobler *et al.*, 2010). Jedoch ist auch hier keine gesteigerte Bildung von 18OHB zu erkennen (Abbildung 3.14). Es wird angenommen, dass der Reaktionsmechanismus von CYP11B2 keine einfache Gleichgewichtsreaktion darstellt, sondern komplexe und bislang unentdeckte Schritte im aktiven Zentrum ablaufen.

### 3.3.3.2 Einfluss von zusätzlichen Elektronentransferproteine auf die 18OHB–Ausbeute

Ein entscheidender Punkt bei der Bildung von 18OHB ist die ausreichende Versorgung von CYP11B2 mit Elektronen, die über ein Elektronentransfersystem an das Cytochrom übertragen werden (vgl. Kapitel 1.1). Die Spaltheefe *S. pombe* verfügt über ein solches Elektronentransfersystem und die Analyse der Umsätze zeigt, dass diese auch genügend Elektronen zur Verfügung stellen, um eine Aldosteronbildung zu gewährleisten. Doch ist nicht auszuschließen, dass das endogene Elektronentransfersystem von *S. pombe* unzureichend ist, um mehr Steroidmetabolite zu produzieren. Aus diesem Grund wurden versuchsweise die Hefestämme, die die Mutanten CYP11B2\_E198D und CYP11B2\_T318M exprimieren, mit dem extra-chromosomalen Vektor pTH2 (Hakki *et al.*, 2008) transformiert, der für Adx<sup>WT</sup> und AdR<sup>WT</sup> codiert. Leider führt auch die Co-Expression von Adx und AdR zu keiner Steigerung der relativen Produktbildung in *S. pombe* (Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.15: Vergleich der relativen Produktbildung der verschiedenen Hefestämme ohne bzw. mit der Co-Expression von Adx und AdR.**

Inkubation von  $1 \cdot 10^8$  Zellen/ml mit verschiedenen DOC-Konzentrationen in EMM für 72 h bei 30°C.

MB164: CYP11B2\_WT; E198D bzw. T318M: CYP11B2\_E198D bzw. CYP11B2\_T318M; TH198 bzw. TH318: CYP11B2\_E198D bzw. CYP11B2\_T318M + Adx<sup>WT</sup> und AdR<sup>WT</sup>

### 3.3.4 Quantifizierung von 18-Hydroxycorticosteron

Bei den bisherigen Untersuchungen des Hefesystems im Hinblick auf die biotechnologische Produktion von 18OHB wurde ausschließlich die relative Enzymaktivität der Mutanten im Vergleich zur Aktivität des Wildtyps zur Bewertung herangezogen. Bei der biotechnologischen Produktion von 18OHB ist die Ausbeute des Ziel-Steroids von Interesse. Für die Aktivitätsmessungen der CYP11B2 Mutanten wurden 25  $\mu\text{M}$  DOC vorgelegt. Die Biotransformation von DOC erfolgte in 10 ml EMM, so dass theoretisch 250 nmol (=82,6  $\mu\text{g}$ ) DOC vorliegen sollten.

Bei der Analyse der Umsätze zeigt sich eine Diskrepanz zwischen der vorgelegten Steroidmenge und den gemessenen Steroidmengen in den Proben (Abbildung 3.16).

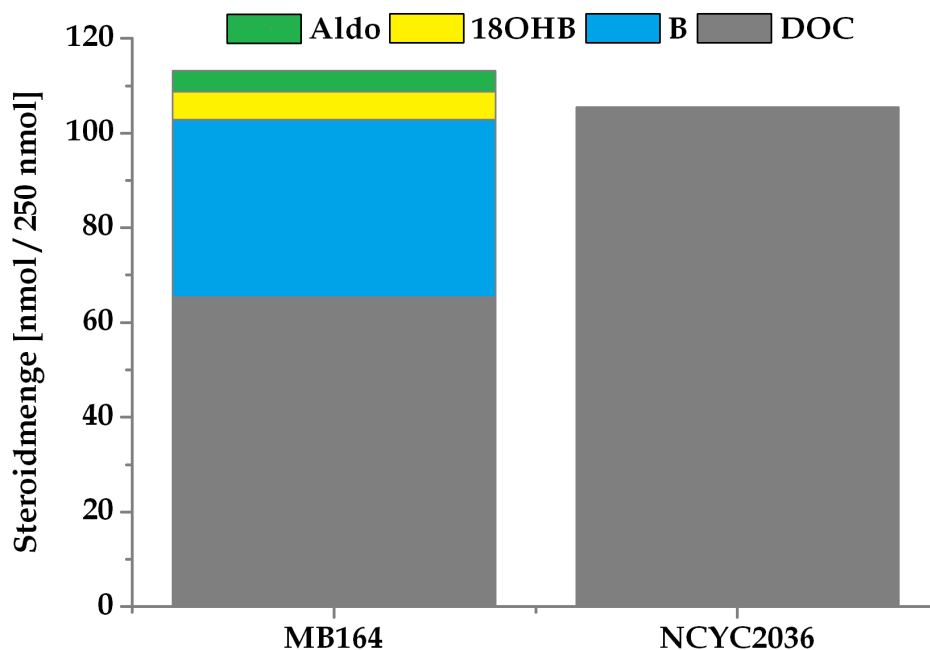
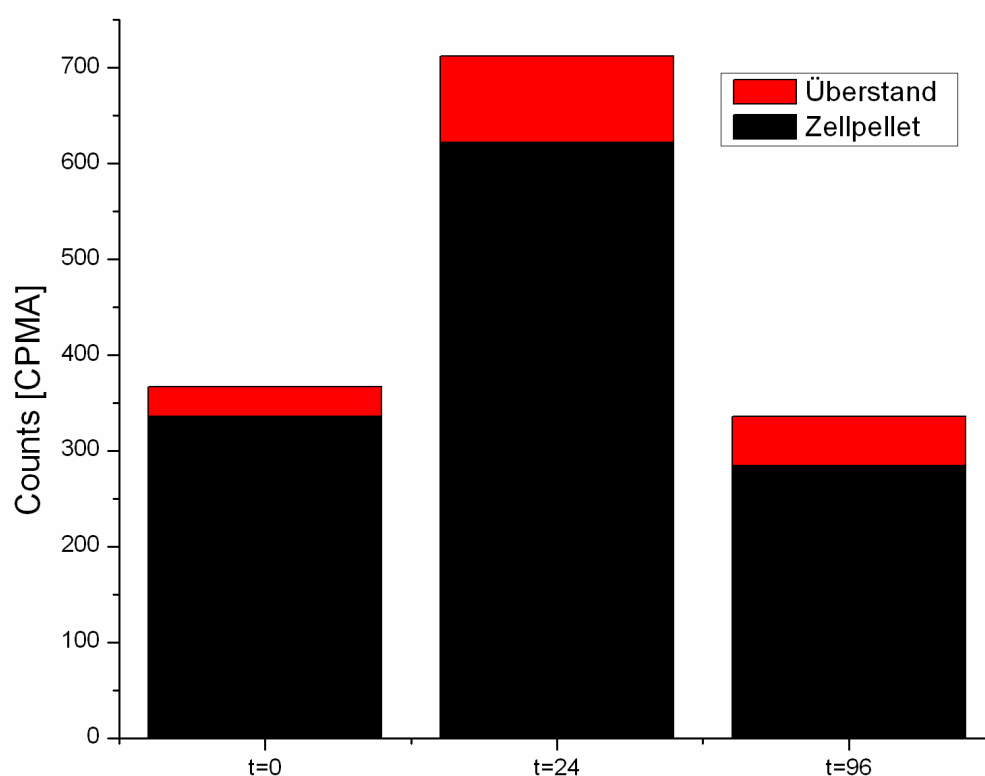


Abbildung 3.16: Steroidmenge nach der Extraktion der 24 h Probe von den Stämmen MB164 und NCYC2036.

Für die Biotransformation wurden 250 nmol DOC vorgelegt.

Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied könnte in einer Speicherung oder anderweitigen Verwendung des DOC durch die Hefe selbst liegen. Daher wurden *in vivo* Umsätze mit radioaktiv markiertem DOC durchgeführt. Die Analyse mit radioaktiv markiertem  $^{14}\text{C}$ -DOC zeigte, dass die Radioaktivität in den Hefezellen nach 24 h am höchsten war (Abbildung 3.17). Aus bislang nicht bekannten Gründen speichern die Hefezellen das vorgelegte DOC und sekretieren dieses nach 96 h wieder ins Medium zurück. In

einem weiteren Versuch, bei dem die Biotransformationszeit von DOC in den Hefezellen 4 Tage betrug, konnte festgestellt werden, dass bei längerer Inkubationszeit mehr Steroide ins Medium sekretiert werden, so dass eine höhere Wiederfindungsrate erreicht wurde (Daten nicht gezeigt). Bislang sind aber keine aktiven Transportmechanismen für Steroide in der Hefe bekannt (Mendel, 1989), so dass die Gründe für die beobachteten Ergebnisse unklar sind.



**Abbildung 3.17: Radioaktivitätsmessung der Biotransformations-Proben von MB164 zu verschiedenen Zeitpunkten.** Die Inkubationszeit betrug insgesamt 96 Stunden, die Proben wurden zu den Zeiten t=0, t=24 und t=96 entnommen und analysiert. Die Zellsuspension wurden dreimal mit Chloroform extrahiert. Nach dem Extrahieren wurde das Zellpellet und das Medium mittels Zentrifugation separiert und die verbliebene Radioaktivität im Zellpellet und Überstand mit einem Szintillationszähler gemessen.

Um trotzdem eine Aussage über die absolut produzierte Menge von 18OHB machen zu können, wird die gemessene 18OHB Menge in Relation zur theoretisch vorgelegten Steroidmenge von 250 nmol betrachtet. Bei einer Inkubationszeit von 24 h entstanden 5,9 nmol 18OHB. Da beim CYP11B2\_WT die anschließende 18-Oxidation von 18OHB zu Aldosteron stattfindet, würden unter Berücksichtigung der Aldosteronmenge 10,3 nmol 18OHB vorliegen (Daten nicht gezeigt). Somit beträgt die theoretische 18OHB Ausbeute

nach 24 h Inkubationszeit  $3,6 \mu\text{g } 10 \text{ ml}^{-1}$ . Rechnet man diesen Wert auf 1 Liter hoch, so beträgt die Produktivität  $0,36 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Lediglich 4% des Substrats wurden zu 18OHB und Aldosteron umgesetzt, der größte Teil des Substrats wird zu Corticosteron transformiert, und aus bislang nicht geklärten Gründen wird das gebildete Corticosteron aus der Substrattasche des Enzyms entlassen und stellt somit das Hauptprodukt der CYP11B2 vermittelten Reaktion von DOC in der Hefe dar. Von den untersuchten CYP11B2 Einzel- und Doppelmutanten war leider keine Mutante dabei, die eine höhere Menge an 18OHB zu liefern vermag (Daten nicht gezeigt).

## 4 Diskussion

Im Zusammenhang mit der Aldosteronsynthese sind eine Reihe von Erkrankungen bekannt, darunter auch überaus schwerwiegende, die unbehandelt zum Tod des Patienten führen. Sind die molekularen Ursachen für die Erkrankung bekannt, so leisten Untersuchungen zur Struktur–Funktionsbeziehung einen wertvollen Beitrag zum besseren Verständnis der Enzymfunktion. Neben einer Vielzahl von Säuger–Zelllinien ist auch die Spaltheife *S. pombe* zur heterologen Expression von humanem CYP11B2 geeignet. Da *S. pombe* erst seit 2002 für die heterologe Expression von humanem CYP11B2 zur Verfügung steht (Bureik *et al.*, 2002), wurden zuvor und werden z.T. immer noch alternativ verschiedene Zelllinien zur Untersuchung von CYP11B2 Mutanten verwendet (Pascoe *et al.*, 1992; Dunlop *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2010).

Bei der Verwendung von Zelllinien wird das *CYP11B2* transient in die Zelle eingeschleust. Hierbei ist die Menge an heterolog in der Zelllinie exprimierten Proteinen relativ gering, weswegen man bei Aktivitätsuntersuchungen radioaktiv markierte Substrate verwendet, die dann mit entsprechenden Detektoren ausgewertet werden müssen (Denner *et al.*, 1995; Nguyen *et al.*, 2010). Die Verwendung von radioaktiv markiertem Substrat und die aufgrund der nur transienten Transfektion von Zelllinien erforderlichen erneuten Transfektion bei Folgeuntersuchungen erschweren eine parallele Untersuchung mehrerer Enzymvarianten bzw. schränken die Anzahl von simultan untersuchbaren Enzymen stark ein. Daher ist ein alternatives Expressionssystem mit stabiler Integration des CYP11B2 Gens sowie einer höheren Expressionsrate von großem wissenschaftlichem Interesse.

Die Spaltheife *S. pombe* konnte als ein solches Expressionsmodell für die humane Aldosteronsynthese etabliert werden (Bureik *et al.*, 2002). Ein großer Vorteil bei der Verwendung von *S. pombe* ist in der Tatsache begründet, dass sie nur über zwei endogene CYPs verfügt, die beide an der Ergosterolbiosynthese beteiligt sind (Wood *et al.*, 2002). Zusätzlich verfügt *S. pombe* über endogene Elektronentransferproteine, so dass eine ausreichende Versorgung von Elektronen für die CYP11B2–vermittelte Steroidhydroxylierung gewährleistet ist (Bureik *et al.*, 2002; Schiffler *et al.*, 2004; Ewen *et al.*, 2008). Ein weiterer Vorteil der Spaltheife *S. pombe* als Expressionssystem ist die im Vergleich zur Zellkultur deut-



lich gesteigerte Ausbeute an heterolog exprimiertem CYP11B2. Dadurch werden genügend Steroidmetabolite produziert, mit denen eine photometrische Detektion der Steroide durchführbar ist.

In dieser Arbeit wurde die Eignung von *S. pombe* als Modellorganismus für die Untersuchung von CYP11B2 Mutanten analysiert. Hierbei wurde zunächst ein geeignetes Expressions- und Testsystem entwickelt. Nach der Optimierung der Versuchsparameter wurden zehn CYP11B2 Varianten ausgewählt und in *S. pombe* heterolog exprimiert. Die Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchungen wurden mit den publizierten Ergebnissen, die auf der heterologen Expression in Zelllinien basieren, verglichen.

Desweiteren sollte auch die Möglichkeit geprüft werden, die in *S. pombe* heterolog exprimierte humane Aldosteronsynthase zur Biotransformation von DOC bzw. der Produktion von 18-Hydroxycorticosteron zu nutzen. Bislang wird 18-Hydroxycorticosteron meist aus tierischem Gewebe extrahiert, da die chemische Totalsynthese sehr aufwendig und kostenintensiv ist. Die Spalthefe *S. pombe* könnte eine kostengünstige Alternative zur biotechnologischen Gewinnung von 18OHB darstellen.

## 4.1 Bewertung des Ganzzellsystems

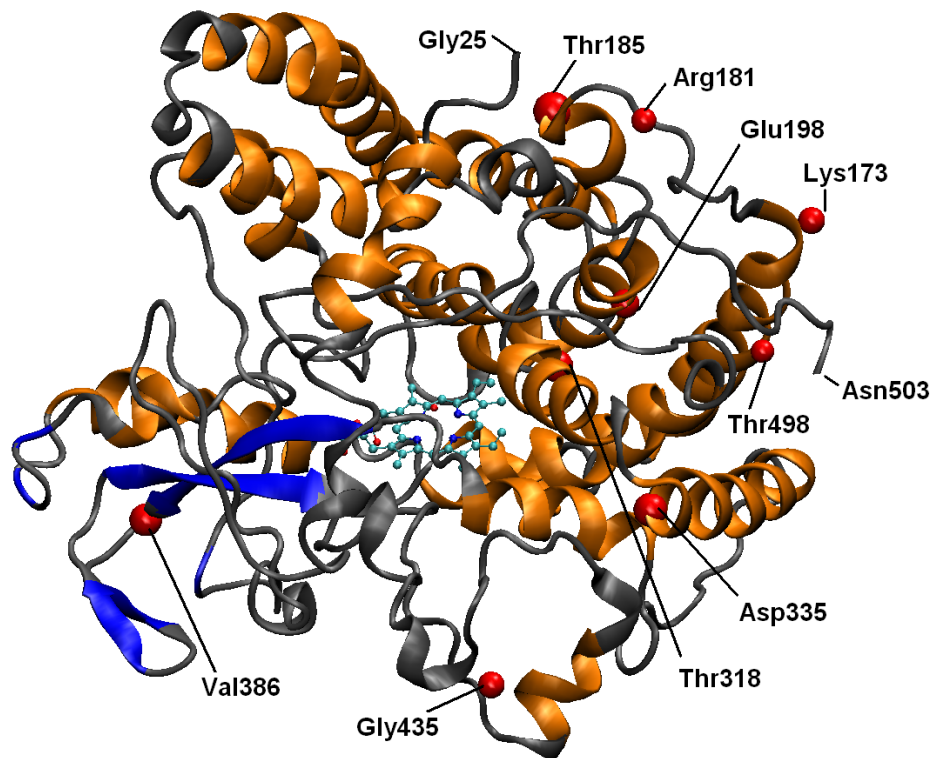
Mutationen im CYP11B2 Gen können unter anderem zum Hypoaldosteronismus führen, der je nach Schweregrad des Enzymdefekts beim Patienten eine lebensbedrohliche Situation hervorrufen kann. Die im Rahmen der Dissertation untersuchten CYP11B2 Mutanten sind im Zusammenhang mit der Erkrankung CMO beschrieben worden (Tabelle 3.4). Zum besseren Verständnis der Auswirkung der Mutationen auf die Aldosteronsynthese wurden die ermittelten CYP11B2 Mutanten heterolog in Zelllinien exprimiert und hinsichtlich ihres Einflusses auf die Enzymaktivität untersucht (Pascoe *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1995; Nguyen *et al.*, 2008).

Die Mutationen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, sind in zwei Kategorien einzuteilen:

- Mutationen, die bislang nur beschrieben wurden, aber nicht auf ihren Einfluss auf die Enzymaktivität hin untersucht wurden:
  - D335G: Leshinsky-Silver *et al.*, 2006
  - 173del: Peter *et al.*, 1998
- Mutationen, die beschrieben und auch mit Hilfe von Zelllinien heterolog exprimiert wurden, um die enzymatische Aktivität der Mutanten zu untersuchen:
  - R181W: Pascoe *et al.*, 1992
  - R181Q: Dissertation Nguyen 2008<sup>1</sup>
  - V386A: Pascoe *et al.*, 1992
  - T318M: Zhang *et al.*, 1995
  - G435S: Kuribayashi *et al.*, 2003
  - T185I: Dunlop *et al.*, 2003
  - T498A: Dunlop *et al.*, 2003
  - E198D: Portrat-Doyen *et al.*, 1998

<sup>1</sup> Im Rahmen seiner Dissertation untersuchte Nguyen die CYP11B2 Mutation R181Q. Die gewonnenen Ergebnisse sind nicht veröffentlicht worden (Nguyen, 2008).

Die untersuchten CYP11B2 Mutanten sind im Homologie-Modell (Belkina *et al.*, 2001) dargestellt (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1:** Die untersuchten Aminosäurepositionen sind im Homologie-Modell von CYP11B2 markiert (Belkina *et al.*, 2001). Die roten Bälle stellen die Aminosäurepositionen dar, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Die verschiedenen Farben im Modell repräsentieren die unterschiedlichen strukturellen Bereiche (orange:  $\alpha$ -Helices, blau:  $\beta$ -Faltblätter, grau: Schleife oder random coil). In der Mitte des Modells liegt das CPK-Modell (hellblau) vom Häm).

#### 4.1.1 Etablierung eines Ganzzellsystems mit R181W und R181Q

Für die Analyse von CYP11B2 Mutanten in der Spaltheife wurden die Mutationen mittels ortsgerechter Mutagenese in das Expressionsplasmid pINT5-CYP11B2 eingebracht. Das Vorliegen der entsprechenden CYP11B2 Mutation in pINT5-CYP11B2 wurde über eine DNA-Sequenzierung bestätigt. Durch die Transformation des Hefestamms NCYC2036 mit dem mutierten Expressionskonstrukt pINT5-CYP11B2 entstanden die Hefestämme, die die jeweiligen CYP11B2 Mutanten exprimieren. Die neu etablierten Hefestämme wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, DOC mittels der mutierten Aldosteronsynthese umzusetzen.

Die Bewertung der Enzymmutanten erfolgte im Hinblick auf ihre enzymatische Aktivität, DOC über Corticosteron und 18-Hydroxycorticosteron zu Aldosteron umzusetzen. Hierfür wurden, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, für die drei stattfindenden Reaktionen 11 $\beta$ -Hydroxylierung, 18-Hydroxylierung und 18-Oxidation die Termini Corticosteron-, 18-Hydroxycorticosteron- und Aldosteronbildung verwendet. Die Ergebnisse der Biotransformationsanalysen in *S. pombe* wurden mit den bereits publizierten Daten verglichen (Tabelle 4.2). Die Tabelle fasst die kalkulierten Ergebnisse dieser Arbeit zusammen. Zudem enthält sie eine knappe Zusammenfassung der publizierten Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten. Die Konformität der Ergebnisse beider Systeme ist ebenfalls gezeigt. Zunächst wurde das etablierte Hefemodell mit der Mutante R181W getestet, die zusammen mit V386A als die ersten *Missense*-Mutationen beim Krankheitsbild CMO II beschrieben wurden (Pascoe *et al.*, 1992). R181 ist bislang die einzige Aminosäureposition, die im Kontext mit CMO II zwei verschiedene Mutationen aufweist, R181W und R181Q (Pascoe *et al.*, 1992; Nguyen, 2008). Im Homologie-Modell liegt R181 zwischen den Helices D und E (Abbildung 4.1). Beide Mutanten zeigen in *S. pombe* eine sehr hohe Corticosteronbildung (R181W: 194,50%; R181Q: 207,50%). Jedoch ist bei beiden Mutanten die 18-Hydroxycorticosteronbildung stark reduziert (jeweils 8,7% der WT-Aktivität) und eine Aldosteronbildung ist in beiden Fällen nicht mehr nachweisbar (Tabelle 4.2). Diese Beobachtungen stimmen mit bereits publizierten, durch Studien mit COS-1 Zellen erhaltenen Ergebnissen überein (Pascoe *et al.*, 1992; Nguyen, 2008).

#### 4.1.2 Analyse der noch nicht untersuchten CYP11B2 Mutanten

Nachdem anhand der Mutationen R181W und R181Q nachgewiesen werden konnte, dass das Hefesystem Ergebnisse liefert, die mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen mit Zellkulturen vergleichbar sind, wurden die Mutationen D335G und 173del untersucht. Beide Mutationen sind bislang nur im Zusammenhang mit dem klinischen Krankheitsbild beschrieben, jedoch noch nicht hinsichtlich ihrer Enzymaktivität charakterisiert worden.

Die Mutation D335G wurde im CYP11B2 Gen von Patienten beschrieben, die an CMO erkrankt sind (Leshinsky-Silver *et al.*, 2006). In unserem heterologen Hefesystem ist die Corticosteronbildung signifikant erhöht und die Aldosteronbildung ist mit der des Wildtyps

vergleichbar. Allein die 18-Hydroxycorticosteronbildung ist im Vergleich zum Wildtyp gesunken. Da das Enzym weiterhin in der Lage ist, Aldosteron zu bilden, ist es vermutlich nicht für den Phänotyp der Erkrankung verantwortlich. Die heterozygote Mutation D335G liegt bei den Patienten zusammen mit weiteren Mutationen im *CYP11B2* vor (Leshinsky-Silver *et al.*, 2006), so dass möglicherweise erst das Zusammenwirken der Mutationen zum Krankheitsbild CMO führt. Beispielsweise führen die homozygoten Einzelmutationen V386A bzw. R181W für sich genommen nicht zum Ausbruch der Krankheit bei den Trägern; auch die Träger beider Mutationen waren klinisch unauffällig, wenn die beiden Mutationen R181W und V386A heterozygot vorlagen. Pascoe *et al.* stellen daher die Annahme, dass beim CMO II die beiden Mutationen R181W und V386A in Kombination homozygot vorliegen müssen (Pascoe *et al.*, 1992).

Bislang ist in Bezug auf CMO II nur eine Aminosäuredeletion für die Position 173 beschrieben worden. Die Publikation beschränkte sich jedoch auf die Nennung der Mutation, die im *CYP11B2* des Patienten vorlag. Enzymatische Untersuchungen wurden in der betreffenden Studie nicht durchgeführt (Peter *et al.*, 1998). In der Spaltheft zeigt die Deletionsmutante eine stark eingeschränkte Enzymaktivität. Sie ist nur noch in der Lage, Corticosteron in geringem Maße zu bilden. Die Corticosteronbildung liegt bei etwas mehr als einem Drittel der Corticosteronbildung des Wildtyps. Weitere Produkte waren nicht zu detektieren, d.h. es liegen keine Anzeichen für eine 18-Hydroxylierungs- oder 18-Oxidationsaktivität vor. Seit kurzem ist die heterologe Expression von humanem CYP11B2 in *E. coli* soweit optimiert, dass eine erfolgreiche Expression dieses Enzyms in aktiver Form möglich ist (Hobler *et al.*, 2010). Auch die Mutante 173del konnte so heterolog in *E. coli* exprimiert, gereinigt und in einem *in vitro* System hinsichtlich ihres Substratumsatzes analysiert werden (Neunzig, 2009; Hobler *et al.*, 2011). Mit dem gereinigten Enzym wurden auch Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) für das Substrat DOC und das Intermediat B ermittelt. Es konnte mittels *in vitro* Studien gezeigt werden, dass die Deletionsmutante weiterhin B aus DOC bildet, jedoch betrug der ermittelte  $K_D$ -Wert für DOC das Dreifache des  $K_D$ -Wertes des Wildtyps. Dies bedeutet eine geringere Affinität der Enzymmutante zum DOC, für B konnte keine  $K_D$  ermittelt werden (Neunzig, 2009). Neunzig konnte *in vitro* die Bildung von 18OHB bei der Mutante nachweisen, bei der Untersuchung mit *S. pombe* ist dies nicht der Fall. Ein Blick auf die Versuchsparameter offenbart, dass die *in vitro* Untersuchungen mit 400  $\mu$ M DOC

durchgeführt wurden und hierbei nur 11% der vom Wildtyp produzierten 18OHB-Menge entstanden sind. Die Experimente mit der Spalthefe hingegen wurden nur mit 25  $\mu$ M DOC durchgeführt, so dass die in der Spalthefe gebildete Menge an 18OHB höchstwahrscheinlich unter der Detektionsgrenze des Systems liegt.

Interessanterweise wurden im Blutplasma des Patienten mit der Deletionsmutation sehr hohe Mengen an B und 18OHB gemessen. Dagegen konnten nur geringe Mengen von Aldosteron nachgewiesen werden (siehe Tabelle 4.1) (Peter *et al.*, 1998).

**Tabelle 4.1: Klinische Patientendaten eines 4 Monate alten CMO II Patienten vor seiner Behandlung.**  
Im CYP11B2 Gen des betroffenen Patienten liegt eine Deletion des Codons 173 vor.

	Steroid [ng/ml]	Normalwerte: < 3 Monate bis 1 Jahr alt
18OHB/Aldosteron	1180	1-10
Aldosteron	<0,02	0,06-0,09
18OHB	23,6	0,2-0,53
B	33,7	0,05-5,51

Die gefundenen Mengen von 18OHB im Blutplasma der Patienten stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen aus den Ganzzellsystem. Die Aminosäure an der Position 173 befindet sich in Helix D (Abbildung 4.1) und ist somit weder in der Nähe des katalytischen Zentrums, noch ist davon auszugehen, dass sie bei der Substraterkennung eine tragende Rolle spielt. Es wird daher vermutet, dass die Aminosäure für die Enzymstabilität entscheidend ist. Die Quelle bzw. das Enzym, welche die extrem hohe Menge an 18OHB im Blut des Patienten erklären könnte, ist bisher unbekannt. Zur Zeit sind keine weiteren Enzyme bekannt, die in der Lage wären, 18OHB zu bilden. Das Isoenzym CYP11B1 vermag zwar die 18-Hydroxylierung von Corticosteron durchzuführen, doch ist die Aktivität zu niedrig, als dass diese Reaktion die hohe 18OHB Menge im Plasma des Patienten erklären könnte.

### 4.1.3 Vergleichende Analyse von CY11B2 Mutanten

Das Hefe basierte Ganzzellsystem wurde zunächst anhand der Mutanten R181W und R181Q etabliert. R181W ist die erste Mutation, die im Zusammenhang mit dem klinischen Krankheitsbild CMO II beschrieben war. Die Aminosäureposition 181 weist im Kontext mit CMO II eine weitere Mutation auf. Nguyen zeigte, dass ein CMO II Patient in seinem

CYP11B2 Gen die Mutation R181Q besitzt. Die Ergebnisse zu diesen beiden Mutationen basieren auf Erkenntnissen aus Zellkultur-Experimenten. Mit dem Hefe Ganzzellsystem sind die Ergebnisse der Zellkultur erfolgreich reproduziert worden (Tabelle 4.2, Abbildung 3.8). Somit ist *S. pombe* prinzipiell geeignet, um CYP11B2 Mutanten parallel zum Wildtyp zu untersuchen.

Um das Ganzzellsystem auf seine Eignung als Alternative zum bislang verwendeten Zelllinien-Modell weitergehend zu bewerten, wurden sechs weitere bereits untersuchte CYP11B2 Mutanten heterolog in der Spaltheefe exprimiert. Die Ergebnisse aus den Zelllinien-Experimenten wurden mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen der Biotransformation von DOC in *S. pombe* verglichen. Hierbei konnten im Wesentlichen die Ergebnisse aus den Versuchen mit Zelllinien verifiziert werden (siehe Tabelle 4.2).

Lediglich bei der Mutante G435S wurde hinsichtlich der Bildung von Aldosteron eine Diskrepanz zwischen den beobachteten Werten aus dem Hefe basierten Ganzzellsystem und den Ergebnissen von Kuribayashi (Kuribayashi *et al.*, 2003) festgestellt. Während die 18-Oxidationsaktivität der Mutante G435S in *S. pombe* dem des Wildtyp ähnelt, war in COS-7 Zellen die Aldosteron-Ausbeute im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Kuribayashi *et al.* verwendeten für die enzymatische Untersuchung der Mutante die isolierte Mitochondrienfraktion aus COS-7 Zellen. Die *in vitro* Untersuchung erfolgte mit 1 mg mitochondrialen Proteinen und einer Inkubationsdauer von 20 Minuten (Kawamoto *et al.*, 1990; Wada *et al.*, 1985). Kawamoto zeigte anhand von Western Blots, dass die präparierten Mitochondrien aus COS-7 Zellen heterolog exprimierte Aldosteronsynthase enthielten (Kawamoto *et al.*, 1990, 1992; Shizuta *et al.*, 1992, 1995; Kuribayashi *et al.*, 2003). Es ist nicht auszuschließen, dass die CYP11B2 Mutanten für die Durchführung der verschiedenen Reaktionen längere Zeiten benötigen als der Wildtyp. Daher kann die Inkubationszeit von 20 Minuten zu kurz gewesen sein, um eine Aldosteronbildung bei der CYP11B2 Mutante festzustellen. Unterstützt wird diese Theorie bei der detaillierten Betrachtung der Publikation von Shizuta *et al.*, die ebenfalls die Mutationen R181W und V386A mittels isolierter Mitochondrienfraktion aus COS-7 Zellen untersuchten (Shizuta *et al.*, 1995). Ihre Untersuchungen zur Mutante R181W zeigten keine gesteigerte Bildung von Corticosteron. Im Gegensatz dazu zeigten *in vivo*- (in Zelllinien und in *S. pombe*) und *in vitro* (mit heterolog exprimierten CYP11B2 aus *E. coli*)-Untersuchungen, dass die Mutante R181W eine ausgeprägte Cor-

ticosteronbildung katalysiert. Bei den *in vivo* Untersuchungen wurden die Zelllinien bzw. *S. pombe* für mindestens 24 h mit dem Substrat inkubiert, bevor die Proben auf ihr Steroidprofil hin untersucht wurden (Pascoe *et al.*, 1992; Dunlop *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1995). Sogar die *in vitro* Untersuchung zu R181W mit gereinigtem Protein aus *E. coli* wurden bei einer Inkubationszeit von 40 min durchgeführt, bevor die Enzymreaktion durch Zugabe von Lösungsmittel unterbrochen wurde (Hobler *et al.*, 2011). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Diskrepanz zwischen den bereits publizierten und den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen auf eine zu kurz angesetzte Reaktionszeit bei der Untersuchung von CYP11B2 Mutanten in der Literatur zurückzuführen ist.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Spaltheefe *S. pombe* bei der Untersuchung von CYP11B2 Mutanten eine hervorragende Alternative zu den bislang verwendeten Zelllinien darstellt. Es wurde erfolgreich ein Testsystem etabliert und optimiert, mit dem verschiedene CYP11B2 Mutanten hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität untersucht werden konnten. Die Bestätigung für das etablierte Hefesystem findet sich in den Ergebnissen der „Kontrollmutanten“. Diese wurden in Zelllinien untersucht und die Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den beiden Organismen zeigt, dass die Spaltheefe *S. pombe* vergleichbare Ergebnisse liefert wie sie zuvor für die entsprechenden Mutanten in den Zelllinien beschrieben wurden (Tabelle 4.2).



Tabelle 4.2: Vergleich der im Rahmen der Dissertation erzielten Ergebnissen mit den aus Zellkultur gewonnenen Ergebnissen

	<b>S. pombe Ganzellsystem</b>				<b>Zelllinie in vivo</b>						
	Corticosteron- bildung <sup>1</sup>	18-Hydroxy- corticosteron- bildung <sup>1</sup>	Aldosteron- bildung <sup>1</sup>	Konformität	B- Ausbeute <sup>2</sup>	18OHB- Ausbeute <sup>2</sup>	Aldo- Ausbeute <sup>2</sup>	Detektion	Zelllinie	Quelle	Anmerkung
<b>R181W</b>	194,50%	8,70%	n.d.	✓	↑	↓	n.d.	TLC & RIA	COS-1	Pascoe <i>et al.</i> , 1992	
<b>R181Q</b>	207,50%	8,70%	n.d.	✓	↑	↓	n.d.	HPTLC	COS-1	Dissertation Nguyen 2009	
<b>D335G</b>	139,40%	51%	100%		--	--	--	--	--	Leshinsky-Silver <i>et al.</i> , 2006	nur DNA-Sequenzierung
<b>173del</b>	36,10%	n.d.	n.d.		--	--	--	--	--	Peter <i>et al.</i> , 1998	nur DNA-Sequenzierung
<b>V386A</b>	144%	62,50%	100%	✓	↑	↓	TLC: ↑ bzw. RIA: →	TLC & RIA	COS-1	Pascoe <i>et al.</i> , 1992	
<b>T318M</b>	34,70%	100%	n.d.	✓	--	--	↓	RIA	MA-10	Zhang <i>et al.</i> , 1995	
<b>G435S</b>	100%	57,20%	100%	✗	→	↓	↓	HPLC	COS-7	Kuribayashi <i>et al.</i> , 2003	<i>in vitro</i> Analysen mit isolierten mitochondrialen Proteinen
<b>T185I</b>	143,60%	13,90%	n.d.	✓	messbar	messbar	TLC: n.d. bzw. RIA: ↓	TLC & RIA	COS-1	Dunlop <i>et al.</i> , 2003	
<b>T498A</b>	100%	20,70%	n.d.	✓	messbar	messbar	↓	TLC & RIA	COS-7	Portrat-Doyen <i>et al.</i> , 1998	starker Aktivitätsverlust & kein Aldo messbar
<b>E198D</b>	67,90%	26,40%	n.d.	✓	messbar	messbar	↓	TLC & RIA	COS-7		

**Legende**

<sup>1</sup> bezogen auf den Wildtyp (100%)

<sup>2</sup> bezogen auf den Wildtyp

n.d. nicht detektierbar

↑ höhere Menge

→ kein Unterschied

↓ geringere Menge

-- nicht ermittelt

Im Vergleich zu den bislang verwendeten Zelllinien weist die Spalthefe viele Vorzüge (siehe Tabelle 4.3) auf. Ein großer Vorteil bei der Verwendung von *S. pombe* ist die verhältnismäßig einfache und schnelle stabile Transformation der Hefe. Die etablierten Hefestämme können als hochkonzentrierte Hefekultur problemlos eingefroren, über Jahre hinweg gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut werden. Somit können jederzeit zukünftige Untersuchungen durchgeführt werden, ohne die zeit- und arbeitsintensive Notwendigkeit einer erneuten Transfektion wie bei der Anwendung von Zelllinien.

Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass die zehn vorgestellten Mutanten parallel mit dem Wildtyp zusammen in *S. pombe* untersucht wurden. Sowohl die Versuchsdurchführung mit den Hefestämmen, die Aufbereitung der Proben als auch die Auswertung der Analysedaten erfolgten innerhalb eines engen Zeitraumes und wurden von einer Person durchgeführt. Dagegen basieren die zuvor gewonnenen Ergebnisse auf heterologer Expression von CYP11B2 Mutanten in verschiedenen Zelllinien und auf unterschiedlicher Probenaufbereitung durch diverse Bearbeiter. Des Weiteren erfolgten die Auswertungen der Zellkultur-Experimente mit unterschiedliche Systemen wie z.B. Radioimmunoassay (RIA) oder Dünnschichtchromatographie (TLC), obwohl alle enzymatischen Analysen mithilfe von radioaktiv markiertem Substrat durchgeführt wurden. Auf der einen Seite erschweren die oben beschriebenen Umstände bei den Zellkultur-Experimenten den Vergleich der vorliegenden Daten untereinander. Auf der anderen Seite sind unterschiedliche Quellen von Ergebnissen notwendig, um systematische Fehler, bedingt durch Labor-Performance des Bearbeiters, Umwelt- und instrumentelle Einflüsse die zu „falschen“ Ergebnissen führen könnten, zu erkennen und zu beheben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das etablierte Hefesystem eine innovative, kostengünstige und Radioaktivitätsunabhängige Alternative zur Charakterisierung von CYP11B2 Mutanten darstellt. Die Bestätigung für das etablierte Hefesystem findet sich in den Ergebnissen der bereits untersuchten Mutanten wieder. Diese Mutanten wurden in Zelllinien untersucht und der Vergleich der Ergebnisse aus den beiden Organismen demonstriert, dass die Spalthefe *S. pombe* übereinstimmende Ergebnisse liefert wie sie zuvor für die entsprechenden CYP11B2 Mutanten in den Zelllinien beschrieben wurden.

Tabelle 4.3: Auflistung der CYP11B2-Expressionssysteme mit ihren Eigenschaften

	<i>E. coli</i>	<i>S. pombe</i>	Zelllinien
<b>Medien</b>	einfach	einfach	anspruchsvoll
<b>Generationszeit</b>	ca. 20 min	ca. 2-4 h	> 20 Stunden bis Tage
<b>Transformation</b>	stabil	stabil	transient (stabil nur beim WT)
<b>Arbeits-, Geräte-, Kosten- &amp; Zeitaufwand</b>	minimal	gering	anspruchsvoll
<b>Proteinausbeute</b>	90 nmol/l Kultur <sup>1</sup>	2 nmol/l Kultur <sup>2</sup>	ausreichend für <i>in vivo</i> -Assay
<b>scale-up Möglichkeiten</b>	ja	ja	schwierig
<b>post-translationale Modifikationen</b>	nein	ja	ja
<b>enzymatische Untersuchung</b>	<i>in vitro</i> Untersuchung: Isolierung und Reinigung des Proteins	<i>in vivo</i> Untersuchung	<i>in vivo</i> Untersuchung
<b>Redoxsystem</b>	NADPH-Regenerationssystem & Präparation von Adx und AdR	keine Co-Expression von Redoxpartnern notwendig	Co-Expression von Adx
<b>Anmerkung</b>	<i>in vitro</i> Analyse in definiertem Puffer	<i>in vivo</i> Untersuchung: keine definierte Bedingung wie in <i>in vitro</i> Analysen mit gereinigten Proteinen	
	<i>inclusion bodies</i> : Proteinkonzentrat, Schutz vor proteolytischem Abbau, erleichtert die Isolierung des heterolog exprimierten Proteins	HPLC-Analyse des Steroidprofils durch die Inhaltsstoffe des Mediums erschwert	
	induzierbare heterologe Proteinexpression		Verwendung von radioaktiv markiertem Substrat
	<i>in vitro</i> : mehrere Liter Expressionsvolumen erforderlich, um eine rentable Proteinmenge für die Reinigung zu erhalten		erneute Transfektion einer Mutante bei zukünftigen Analysen erforderlich

## Legende

- <sup>1</sup> Angabe bezieht sich auf WT: Hobler *et al.*, 2011  
<sup>2</sup> Bureik *et al.*, 2002

## 4.2 Bewertung der Eignung des Ganzzellsystems zur biotechnologischen Produktion von 18-Hydroxycorticosteron

Die chemische Totalsynthese von Steroidhormonen ist aufgrund der komplexen Stereochemie äußerst diffizil bis nicht durchführbar. Die stereo- und regiospezifische Einführung von Schutzgruppen sowie ihre Entfernung nach Ablauf der gewünschten Reaktion ist mit großem Aufwand verbunden. Kirk beschrieb 1976 die chemische Synthese von 18-Hydroxycorticosteron (Kirk & Rajagopalan, 1976). Ausgehend vom  $3\beta$ -Acetoxypregn-5-ene-11,20-dione sind bis zum gewünschten Steroidprodukt 18-Hydroxycorticosteron mehr als 9 Arbeitsschritte erforderlich (Abbildung 4.2). Aufgrund des Hinweises im Artikel (Kirk & Rajagopalan, 1976), dass weitere Optimierungen beabsichtigt waren, um die Steroidausbeute zu erhöhen, und wegen der fehlenden Angabe zur Steroidausbeute selbst, ist anzunehmen, dass Aufwand und Ertrag der Synthese in keinem Verhältnis zueinander stehen. Das System ist insgesamt wenig rentabel, so dass nach alternativen Ansätzen zur Herstellung von Steroidhormonen gesucht wird.

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von Steroidhormonen ist die Extraktion aus tierischem Gewebe, die jedoch unter Umständen mit gesundheitlichen Risiken für den Präparator verbunden sein kann (z.B. BSE). Außerdem stellen Kontaminationen mit weiteren endogenen, jedoch unerwünschten Steroiden ein häufiges Problem dar. Des Weiteren ist aufgrund der biologischen Varianz die Ausbeute an gewünschtem Steroid nicht konstant. Die biologische Varianz wird durch eine Vielzahl von Faktoren wie z.B. Alter und Geschlecht des Tieres bestimmt, die sich normalerweise nicht beeinflussen lassen.

Mit dem Aufkommen und der Weiterentwicklung der sogenannten weißen Biotechnologie werden vermehrt rekombinante Mikroorganismen genutzt, um verschiedenste Substanzen ökologisch und kostengünstig zu produzieren. Eine wichtige Anforderung mit Hinblick auf die industrielle Produktion ist, dass die eingesetzten Mikroorganismen in Haltung und Kultivierung kostengünstig und die Substrate möglichst preisgünstig verfügbar sind. Die Produkte sollten optimalerweise ohne weitere Nebenprodukte zu isolieren sein und durch die Biotransformation eine hohe Wertsteigerung erfahren.

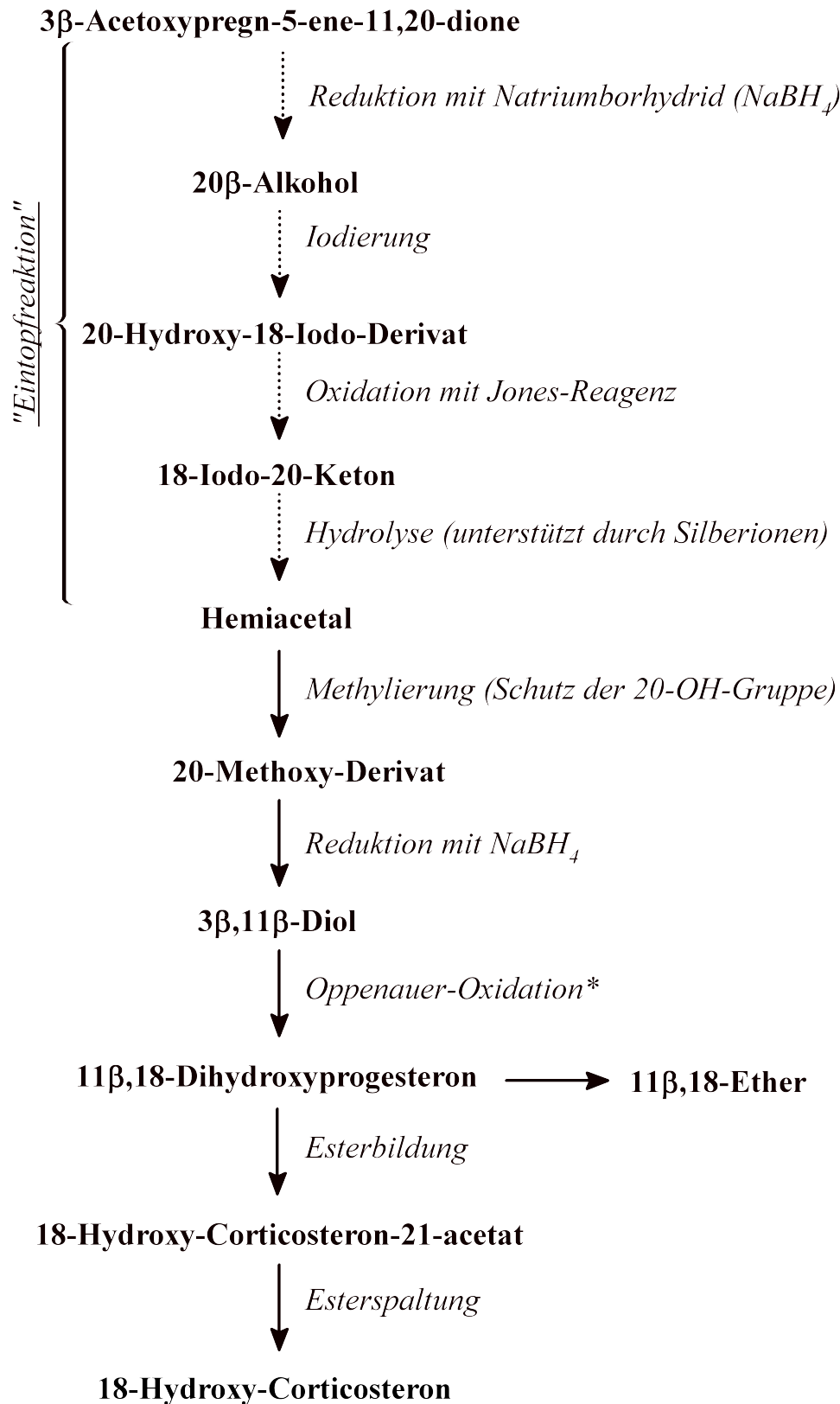


Abbildung 4.2: Zusammenfassung der 9-stufigen Synthese von 18-Hydroxy-Corticosteron (Kirk & Rajagopalan, 1976).

\* Reinigung/Vorbehandlung des Oppenauer-Reagenz: 11 $\beta$ ,18-Dihydroxyprogesteron im wässrigen Milieu Säure-instabil, Bildung von 11 $\beta$ ,18-Ether möglich.

Die Spaltheefe *S. pombe* besitzt ein großes Potential für die biotechnologische Anwendung. Aus betriebswirtschaftlicher und juristischer Sicht ist *S. pombe* für den industriellen Einsatz interessant, da für sie, im Gegensatz zu den etablierten „Industrie-Hefen“, wie z.B. *S. cerevisiae* oder *Pichia pastoris*, noch relativ wenige Patente vorliegen. Rekombinante Spalthesysteme konnten bereits erfolgreich bei der biotechnologischen Produktion von Wirkstoffmetaboliten eingesetzt werden und eignen sich hervorragend zur Biotransformation von Steroiden (Dragan *et al.*, 2005; Bernhardt, 2006; Hakki *et al.*, 2008). Zusätzlich ist die Spaltheefe für die Validierung von Inhibitoren (Ehmer *et al.*, 2002; Bureik *et al.*, 2004) geeignet, und durch die Verwendung von 96-well Mikrotiterplatten konnte ein Ganzzell-Screeningsystem etabliert werden (Hakki *et al.*, 2011).

18-Hydroxycorticosteron ist als Zielsubstanz für den Aufbau eines Ganzzellsystems für die Bioproduktion von Steroidmetaboliten hochinteressant, da das Substrat Desoxycorticosteron in der Anschaffung relativ günstig ist (107€ pro g), während der Marktpreis für 18OHB 331€ pro mg<sup>2</sup>, also das 3093-fache vom DOC-Einkaufspreis, beträgt. Es besteht ein großes Interesse, ein kostengünstigeres, biotechnologisches Verfahren für die Gewinnung von 18OHB zu entwickeln, da herkömmliche Methoden für die industrielle Produktion nicht geeignet sind. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass das Steroid 18OHB nicht immer kommerziell verfügbar war. Zudem ist 18OHB nur in einer Reinheit von 98% zu erhalten, da es vermutlich einer tierischen Quelle (z.B. Rindernebennieren) entstammt. Insbesondere für analytische Untersuchungen stellt dieser Reinheitsgrad ein potentiell Problem dar.

#### 4.2.1 CMO II Mutation als Basis für die 18OHB-Produktion

Zur biotechnologischen Produktion von 18OHB liegt die Verwendung von CYP11B2 Mutanten nahe, da beim Krankheitsbild CMO II die 18OHB Konzentration im Blut bzw. Urin der Patienten aufgrund der inaktiven 18-Oxidationsaktivität extrem erhöht ist. Zwar kann CYP11B1 ebenfalls 18-Hydroxylierungen durchführen, doch ist die Aktivität zu gering, um die hohe Konzentration an 18OHB bei den Patienten zu erklären. Da bislang kein weiteres Enzym bekannt ist, das eine 18-Hydroxylierung zu katalysieren vermag, wird angenom-

---

<sup>2</sup>Quelle:  
Sigma Aldrich®, November 2011

men, dass der hohe 18OHB Spiegel auf eine gesteigerte 18-Hydroxylierungsaktivität der CYP11B2 Mutanten zurückzuführen ist. Daher wurden einige ausgewählte CYP11B2 Mutanten hinsichtlich ihrer Eignung für die biotechnologische Produktion von 18OHB untersucht.

Von den zehn in dieser Arbeit untersuchten CYP11B2 Mutanten zeigen sieben keine 18-Oxidationsaktivität, d.h. das Endprodukt Aldosteron war bei diesen Mutanten nicht detektierbar, und es war anzunehmen, dass stattdessen 18OHB als direkter Aldosteron-Vorläufer verstärkt gebildet wird. Alle untersuchten CYP11B2 Mutanten sind in der Lage, 11-Desoxycorticosteron zu Corticosteron umzusetzen, welches seinerseits die Vorstufe von 18OHB ist (Tabelle 4.2). Jedoch ist die Enzymaktivität, insbesondere die 18-Hydroxylierungsaktivität, der untersuchten Einzelmutanten sehr niedrig (siehe Abbildung 3.8). Die Mutanten sind daher für sich genommen für die biotechnologische Produktion von 18OHB noch nicht geeignet. Daher sollte die Aktivität der vielversprechendsten Mutanten durch rationales Proteindesign verbessert werden.

#### 4.2.2 Erhöhung der Enzymaktivität durch rationales Proteindesign

In Zellkulturexperimenten mit COS-1 Zellen konnte eine vierfache Steigerung der 18OHB-Bildung durch die Mutante K251R erzielt werden (Fardella *et al.*, 1995). Eine allgemeine Aktivitätssteigerung wurde ebenfalls für die Mutationen Q404R, A414P und H439Y in Experimenten mit JEG-3 Zellen beschrieben (Holloway *et al.*, 2009). Diese vier Mutationen wurden zur Aktivitätserhöhung mit den zuvor untersuchten Mutanten R181Q, R181W, T185I, E198D bzw. T318M, die kein Aldosteron bilden, kombiniert (siehe Tabelle 3.5). Von den 20 möglichen wurden 19 Plasmide erfolgreich generiert und in den entsprechenden Hefestamm eingeschleust. Des Weiteren wurden für 15 dieser Hefestämme *in vivo* Umsätze durchgeführt. Zusätzlich wurden die Einzelmutanten Q404R, A414P und H439Y erstellt und ebenfalls in Hefezellen transformiert. Die 15 Doppelmutanten und die drei neuen Einzelmutanten wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, 18OHB im *S. pombe* Ganzzellsystem zu produzieren, bewertet.

Die Ergebnisse von Holloway ließen sich durch die Untersuchungen in der Spalthefe allerdings nicht bestätigen. Holloway beobachtete bei den drei Einzelmutanten Q404R, A414P

und H439Y eine gesteigerte Bildung von Corticosteron und Aldosteron, 18OHB wurde von ihm leider nicht analysiert (Holloway *et al.*, 2009). Die Auswertung der *in vivo* Analysen in der Spalthefe zeigt jedoch keine eindeutige Verbesserung der Gesamt-Enzymaktivität.

Leider führte auch die Einführung dieser Mutationen in die bestehenden Plasmide pINT5-CYP11B2\_R181Q, \_R181W, \_T185I, \_E198D bzw. \_T318M in den meisten Fällen zu keiner augenfälligen Veränderung der Enzymaktivität im Hinblick auf die Möglichkeit einer biotechnologischen Produktion von 18OHB. Die generierten Doppelmutanten behalten das Steroidbildungsprofil der bereits vorliegenden Einzelmutanten, die auf CMO Mutationen beruhen (siehe Abbildung 3.9-3.11). Lediglich die Doppelmutante H439Y/E198D zeigt durch die zusätzliche Mutation eine eindeutige Veränderung der Steroidbildung. Die Corticosteronbildung ist erheblich gesunken. Im Vergleich zu den Einzelmutanten E198D bzw. H439Y beträgt die Corticosteronbildung von H439Y/E198D nur noch etwa ein Zehntel. Die 18-Hydroxycorticosteronbildung ist zwar extrem gesteigert (Abbildung 3.9), allerdings muss man hierbei berücksichtigen, dass die Steroidbildungen anhand eines einzelnen Quotienten ermittelt wurden (Abschnitt 2.2.3.2). Um eine Aussage über den Effekt der Mutation auf die Gesamt-Enzymaktivität bzw. ihr biotechnologisches Potential treffen zu können, müssen alle Steroidbildungen - Corticosteron-, 18-Hydroxycorticosteron- wie auch Aldosteronbildungen – im Gesamten betrachtet werden (Tabelle 4.4, Abbildung 3.9).

**Tabelle 4.4: Vergleich der Corticosteron- und 18-Hydroxycorticosteronbildungen der CYP11B2 Mutanten H439Y/E198D, H439Y, E198D und dem CYP11B2\_WT.**

	<b>Corticosteronbildung [%]</b>	<b>18-Hydroxycorticosteronbildung [%]</b>
H439Y/E198D	2,9 ± 0,6	87,6 ±
E198D	30,7 ± 6,3	5,5 ± 1,0
H439Y	29,8 ± 2,1	23,9 ± 1,8
CYP11B2_WT	39,2 ± 11,2	21,1 ± 2,9

Für die biotechnologische Produktion von 18OHB ist es erforderlich, sowohl die Ausbeute an Corticosteron als auch 18-Hydroxycorticosteron zu erhöhen. Sinkt die Verfügbarkeit des direkten 18OHB Vorläufers B, so kann auch nur wenig 18OHB gebildet werden. Daher stellt die stark reduzierte Corticosteronbildung der Doppelmutante H439Y/E198D



trotz der relativ gesteigerten 18-Hydroxycorticosteronbildung ein Problem dar. Die restlichen CYP11B2 Mutationen, bei denen Holloway eine gesteigerte Gesamt-Enzymaktivität beobachtet hat, liefern ebenfalls keine brauchbaren Resultate hinsichtlich des Ziels der Produktion von 18OHB. Die Einzelmutanten A414P und H439Y weisen im Vergleich zum Wildtyp keine offensichtliche Aktivitätssteigerung auf; entsprechend zeigen auch die abgeleiteten Doppelmutanten keine Aktivitätssteigerung, die eine biotechnologische Produktion von 18OHB in Aussicht stellen würde.

Insgesamt ließen sich die Ergebnisse von Holloway in der Spalthefe nicht bestätigen. Holloway stellte bei den Mutanten eine signifikante Steigerung der Corticosteron- und Aldosteronausbeute fest. Die Untersuchungen mit dem Spalthefe-System zeigen, dass die Mutationen, im Vergleich zum Wildtyp, die Steroidbildung hinsichtlich der 18OHB-Synthese nicht erhöhen. Sowohl die Einzelmutanten als auch die Doppelmutanten zeigen keine ausreichend verbesserte Steroidbildung, welche für einen biotechnologischen Einsatz erforderlich wären.

Fardella untersuchte in Zellkulturexperimenten die Enzymaktivität der CYP11B2 Mutanten K251R und E136D. Dahl R-Ratten entwickeln im Gegensatz zu den Dahl S-Ratten bei erhöhter Salzaufnahme keinen Bluthochdruck. Der Grund hierfür liegt in einer gesteigerten Aktivität der Aldosteronsynthase (Cover *et al.*, 1995). Der Vergleich der 500 Aminosäure umfassenden Primärstruktur zwischen der normalen Sprague-Dawley Ratte und der Dahl R-Ratte zeigt, dass sich die Sequenzen an zwei Positionen unterscheiden, E136D und K251R. Die Mutationen wurden in das humane *CYP11B2* integriert und die Mutanten *in vivo* in Säuger-Zelllinien untersucht. K251R zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine 3 bis 4-fach gesteigerte 18OHB Produktion (Fardella *et al.*, 1995).

Diese Beobachtung konnte in der Spalthefe nicht bestätigt werden. Wie bereits bei den Mutanten von Holloway beobachtet, konnte auch für die von Fardella beschriebenen Mutationen keine Aktivitätssteigerung in *S. pombe* beobachtet werden (Abbildung 3.12).

### 4.2.3 Optimierungsversuche des Ganzzellsystems bezüglich der 18OHB-Produktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Potential der Aldosteronsynthese in der Spaltheife *S. pombe* für die biotechnologische Produktion von 18-Hydroxycorticosteron untersucht. Hierfür wurden CYP11B2 Mutanten mittels ortsgerichteter Mutagenese generiert, die in der Spaltheife heterolog exprimiert und anschließend hinsichtlich ihrer Fähigkeit bewertet wurden, 18-Hydroxycorticosteron zu bilden. Leider zeigen die Untersuchungen, dass die CYP11B2 Mutanten eine viel zu geringe Enzymaktivität aufweisen, um für einen biotechnologischen Einsatz geeignet zu sein. Daher wurden weitere Versuchsparameter angepasst, um weitere Erkenntnisse über die Eignung des Hefesystems zur biotechnologischen Synthese von 18OHB zu gewinnen:

- Vorgabe von Corticosteron als Substrat bzw. Verschiebung des chemischen Gleichgewichts hinsichtlich 18OHB,
- Einbindung zusätzlicher Elektronentransferproteine und
- Erhöhung der Anzahl der Expressionskassetten pro Hefezelle.

Die Auswirkungen dieser Anpassungen werden im Folgenden im Detail bewertet.

#### 4.2.3.1 Erhöhung der 18OHB-Ausbeute durch die Vorgabe von Corticosteron

Ausgehend vom Desoxycorticosteron muss die Aldosteronsynthese zwei Hydroxylierungsschritte katalysieren, um 18OHB zu erhalten. Es galt zu überprüfen, ob die 18OHB-Ausbeute erhöht werden kann, wenn das Enzym nur einen Schritt durchführen muss, also nur die 18-Hydroxylierung von Corticosteron. Leider zeigte sich hierbei, dass die Aldosteronsynthese Corticosteron nur widerwillig in die Substrattasche aufnimmt. Vermutlich ist dies auf den hohen  $K_D$  für Corticosteron zurückzuführen (Hobler *et al.*, 2010). Dieser beträgt das 86-fache des  $K_D$  von Desoxycorticosteron, dem natürlichen Substrat von CYP11B2. Damit CYP11B2 Corticosteron in die Substratbindungstasche aufnimmt, muß wesentlich mehr B vorgelegt werden. Mit einer Erhöhung der Konzentration von B von 25  $\mu\text{M}$  auf 600  $\mu\text{M}$  konnte die Bildung von 18OHB und Aldosteron detektiert werden (Ab-

bildung 3.13). Leider waren die produzierten Mengen im Vergleich zur eingesetzten Substratmenge nicht rentabel (ca. 10 nmol 18OHB bei Vorgabe von 6000 nmol B  $\cong$  0,2% 18OHB aus B), so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

Auch der Versuch, das chemische Gleichgewicht in Richtung 18OHB, durch die gleichzeitige Vorgabe von DOC und B zu verschieben, zeigte nicht den gewünschten Effekt. Theoretisch sollte nach dem „Prinzip vom kleinsten Zwang“ durch die Anwesenheit von DOC und B die Weiterreaktion zu 18OHB erfolgen. Da aber keine gesteigerte Bildung von 18OHB ersichtlich war, muss angenommen werden, dass der Reaktionsmechanismus von CYP11B2 keine einfache Gleichgewichtsreaktion darstellt.

#### **4.2.3.2 Erhöhung der 18OHB–Ausbeute durch zusätzliche Elektronentransferproteine**

Hakki konnte beim Isoenzym CYP11B1 zeigen, dass die zusätzliche Versorgung von Elektronen die Enzymaktivität von CYP11B1 signifikant steigerte (Hakki *et al.*, 2008). Bereits bei der Co-Expression von Adx war eine Aktivitätssteigerung von CYP11B1 zu beobachten, die Cortisolproduktionsrate stieg von 12% auf 25%. Die höchste Biotransformationsaktivität war bei dem Stamm vorzufinden, der neben CYP11B1 zusätzlich Adx und AdR co-exprimiert, hier betrug die Cortisolproduktionsrate 40%. Die Co-Expression von Adx und AdR steigerte die 11 $\beta$ -Hydroxylaseaktivität von CYP11B1 um das 3,4-fache (Hakki *et al.*, 2008).

Daher wurden die Hefestämme, die die Mutanten CYP11B2\_E198D und CYP11B2\_T318M exprimieren, mit dem extra-chromosomalen Vektor pTH2 (Hakki *et al.*, 2008) transformiert, der für Adx<sup>WT</sup> und AdR<sup>WT</sup> codiert. Jedoch führte die Co-Expression von Adx und AdR zu keiner Aktivitätssteigerung der Aldosteronsynthese in *S. pombe* (Abbildung 3.15).

CYP11B1 und CYP11B2 gehören der gleichen Familie, sogar Unterfamilie an. Dennoch handelt es sich hierbei um zwei distinkte Enzyme, die auch in unterschiedlichen Zonen der Nebennierenrinde exprimiert werden. Beide Enzyme gehören der Klasse I des Elektronentransfersystems an und erhalten ihre Elektronen von den selben Proteinen, Adx und AdR. Die Ergebnisse zeigen aber, dass die Versorgung der Isoenzyme mit Elektronen

anscheinend unterschiedlich kontrolliert wird.

#### **4.2.3.3 Erhöhung der 18OHB–Ausbeute durch zusätzliche CYP11B2 Expressionskassetten pro Hefezelle**

Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der 18OHB Produktion ist die Annahme, durch vermehrt exprimiertes CYP11B2 die Steroidausbeute erhöhen zu können. Beim MB164 ist die Expressionskassette ins Hefechromosom integriert. Damit ist die Anzahl an *CYP11B2* abhängig von dem Ploidie–Status der Zelle. Beim MB164 liegt nur ein CYP11B2 Gen pro Zelle vor. Extra–chromosomale Vektoren replizieren sich unabhängig vom Hefechromosom und liegen in mehrfacher Kopienanzahl vor (Hayles & Nurse, 1992). Daher wurde zusätzlich zum bereits vorliegenden Stamm MB164 ein Hefestamm etabliert, bei dem CYP11B2 in einem extra–chromosomalen Vektor in den Zellen vorliegt. Jedoch erwies sich dieser Ansatz als nicht rentabel. Die Untersuchungen zeigten nicht die erwünschte Aktivitätssteigerung (Abbildung 3.3, Tabelle 3.2). Da die Anzahl an extra–chromosomalen Vektoren in den Zellen einer Kultur stark variieren (zwischen 5–30) kann und jede Zelle einer Kultur eine unterschiedliche Plasmid-Kopienzahl aufweisen kann (Hayles & Nurse, 1992), wurden die Arbeiten mit dem extra–chromosomalen Vektor an dieser Stelle abgebrochen.

Abschließend muss bilanziert werden, dass der Reaktionsmechanismus, der von CYP11B2 katalysiert wird, ein sehr komplexes System darstellt, welches mit den hier untersuchten Mechanismen nicht bzw. kaum zu beeinflussen ist. Weder durch die Vorgabe von Corticosteron, dem direkten Vorläufer von 18OHB, noch durch die gleichzeitige Vorgabe von DOC und B konnte die Ausbeute an 18OHB erhöht werden. Anscheinend ist die Synthese von Aldosteron keine einfache Gleichgewichtsreaktion, welche nach dem „Prinzip vom kleinsten Zwang“ gesteuert werden kann. Auch eine erhöhte Versorgung mit Elektronen hatte keinen Einfluss auf die Enzymaktivität; genauso wenig wie die Erhöhung der Anzahl der Expressionskassetten pro Hefezelle. Es sind weitere Untersuchungen zur Aldosteronsynthese erforderlich, um CYP11B2 für biotechnologische Anwendung zu modifizieren.

## 4.3 Eignung von 18OHB zur biotechnologischen Produktion mittels Mikroorganismen

Bisher wurden die Untersuchungsergebnisse und Resultate der Optimierungsversuche zur biotechnologischen Produktion von 18OHB dargestellt, die das Enzym, die humane Aldosteronsynthase, betreffen. Eine wichtige Frage ist, ob Mikroorganismen wie die Spaltheife *S. pombe* überhaupt für die biotechnologische Produktion von 18OHB einsetzbar sind. Mikroorganismen werden bereits zur biotechnologisch Produktion von Feinchemikalien, Arzneimittel usw. eingesetzt. Die Mikroorganismen werden neben der organischen Synthese in einem mehrstufigen Prozess eingesetzt, um das gewünschte Produkt zu erhalten. Im Fall von 18OHB zeigen sich jedoch Komplikationen seitens des Steroidhormons selbst, so dass nach jetzigem Kenntnisstand eine biotechnologische Produktion schwierig sein dürfte. So ist beschrieben, dass gelöstes 18-Hydroxycorticosteron in mehreren Formen vorliegen kann, diese Beobachtung wurde auch für 18-Hydroxy-11-Desoxycorticosteron (18OH-DOC) gemacht (Dominguez, 1965). Hierbei wird zwischen einer polaren, „M“ (**m**ore polar), und einer weniger polaren, „L“ (**l**ess polar), Form differenziert (Usa *et al.*, 1979). Im Fall von 18OH-DOC vermutet Dominguez, dass es sich bei den beiden 18OH-DOC Formen um Tautomere handelt (Dominguez, 1965). Dahingegen hält Roy die beiden Formen des 18OH-DOC für ein zyklisches Hemiketal und ein gemischtes Ketal für möglich (Roy *et al.*, 1976). 18OHB scheint ebenfalls dazu zu tendieren, in verschiedenen Formen vorzuliegen (Usa *et al.*, 1979; Aragonés *et al.*, 1978; Damasco & Lantos, 1975). Die strukturelle Aufklärung erfordert eine relativ große Menge des Steroidhormons. Da die chemische Synthese aufwendig ist und die Gewinnung aus tierischem Gewebe nur kleine Menge von 18OHB zur Verfügung stellt, sind aufwendige Untersuchungen zur Strukturaufklärung bislang nur begrenzt möglich bzw. stehen noch aus. Die Umlagerung von 18OHB wird u.a. durch folgende Parameter gefördert (Usa *et al.*, 1979; Aragonés *et al.*, 1978; Damasco & Lantos, 1975):

- Temperatur: je wärmer, desto schneller erfolgt die Umlagerung
- Inkubationsdauer: je länger es im ungeeigneten Lösungsmittel aufbewahrt wird, desto höher ist der Anteil an „L“ (auch bei 4°C)

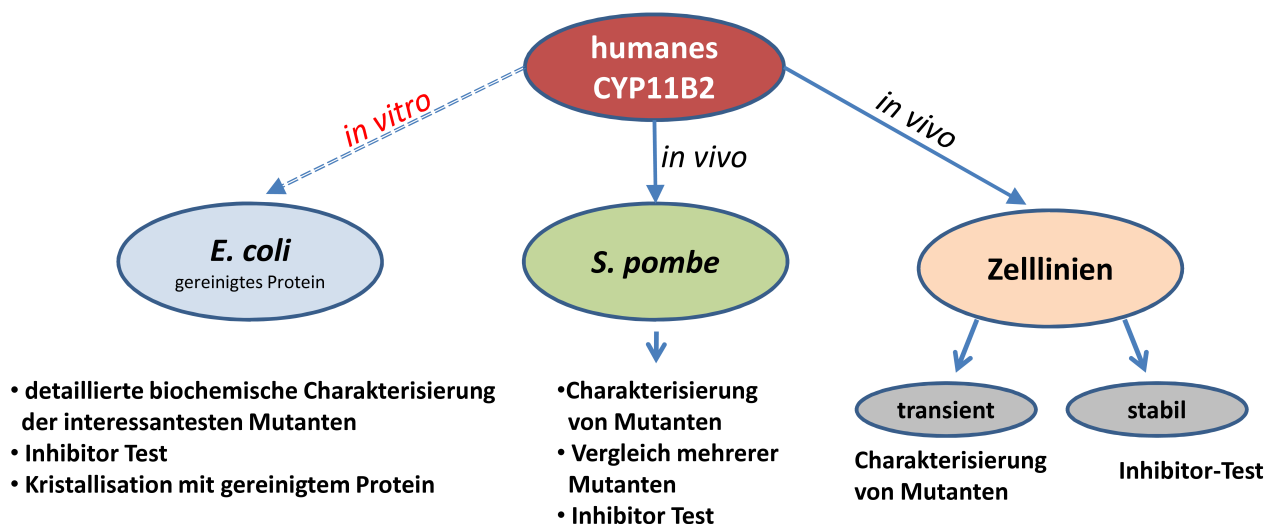
- Azidität: fördert die Bildung von „L“ (auch bei 4°C)
- Lösungsmittel: kurzkettige Alkohole führen zur spontanen Bildung von „L“, (auch bei 4°C)

Die oben beschriebenen Punkte betreffen in einigen Aspekten die biotechnologische 18OHB-Produktion in *S. pombe*. Die Kultivierung der Hefezellen erfolgt im wässrigen Milieu, das bereits einen pH von 5,5 hat. Mit zunehmender Kultivierungsdauer sinkt der pH-Wert der Hefekultur auf einen pH von etwa 4, bedingt durch die ausgeschiedenen Abfallstoffe der Hefezellen. Die Umlagerung von 18OHB ist auch bei den *in vitro* Umsätzen festzustellen. Die Umsätze mit gereinigtem Protein aus *E. coli* erfolgten bei einem pH von 7,5 und auch hierbei fand eine Umlagerung von 18OHB statt, wenn auch verzögert (persönliche Kommunikation mit Hobler). Sowohl die Kultivierung der Hefezellen als auch die *in vivo* Biotransformation von DOC erfolgten bei 30°C. Bei der Auswertung der vorliegenden Ergebnisse wurde angenommen, dass das 18OHB aufgrund der 24 stündigen Inkubation bei 30°C und dem sauren wässrigen Milieu, in welcher die Biotransformation von DOC stattfand, nahezu vollständig in der „L“ Form vorliegt und der Anteil der „M“ Form vergleichsweise gering ist. Theoretisch sind reversible Rückreaktionen nicht auszuschließen, doch muss hierfür die strukturelle Aufklärung der beiden Formen von 18OHB zunächst abgeschlossen sein. Leider fehlt es jedoch an ausreichender Menge von 18-Hydroxycorticosteron, die für die Strukturaufklärung und Untersuchungen zu möglichen Rückreaktionen aufzubringen sind.

# 5 Ausblick

## 5.1 *S. pombe* als Modellorganismus zur Untersuchung von Enzymmutanten

Die Spaltheefe *S. pombe* ist ein hervorragender Organismus zur Untersuchung von Mutanten der Aldosteronsynthese. Allerdings wird das Hefe–Ganzzellensystem die alternativen Expressionsorganismen, Zelllinien und *E. coli*, nicht vollständig ersetzen können. Jedes System bietet seine Vor- und Nachteile, die bei der Wahl des Untersuchungssystems abgewogen werden müssen. Die bislang verwendeten Säugerzelllinien haben den Vorteil, dass das zu exprimierende *CYP11B2* in dem System heterolog exprimiert wird, aus dem es stammt und somit am ehesten die natürlichen post–translationalen Modifikationen erhält. Im Gegensatz dazu können in *E. coli* keinerlei post-translationalen Modifikationen durchgeführt werden, und die Hefe neigt dazu, das heterolog exprimierte Protein zu hyperglykosylieren. Abbildung 5.1 liefert einen Überblick über die möglichen Anwendungsfelder der drei Expressionssysteme:



**Abbildung 5.1: Anwendungsmöglichkeiten der drei Expressionssysteme von humanem CYP11B2**  
Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich die Systeme nicht gegenseitig ausschließen.

Liegt eine neue Mutante vor, so könnten Untersuchungen in der Spaltheefe erste Hinweise über den Einfluss der Mutation auf die katalytische Aktivität liefern. Sind die gewonnenen Re-

sultate interessant, könnte ein nächster Schritt die *in vitro* Charakterisierung des Enzyms sein. Hier wären Analysen zur Substratbindung und Protein–Protein–Wechselwirkung mit der reinen und konzentrierten Proteinlösung denkbar. Desweiteren könnten Kristallisationsversuche durchgeführt werden, die jedoch sehr aufwendig und zeitintensiv sind.

Untersuchungen zu Inhibitoren sind in allen drei Systemen durchführbar, hierbei kommt es auf den Schwerpunkt der Untersuchung an. *S. pombe* stellt ein kostengünstiges und schnell einsetzbares System dar. Der Hefestamm, der die entsprechende Mutante exprimiert, wäre aufgrund der Voruntersuchung sofort anwendbar. Beim Einsatz von *E. coli* müssen als erstes genügend Proteine exprimiert werden, die ihrerseits bis zur Homogenität gereinigt werden müssen. Anschließend stehen diese dann aber jederzeit für Untersuchungen zur Verfügung. Die Zelllinie ist das zeit- und kostenaufwendigste System. Bislang wurden nur transient transformierte Zellen zur Untersuchung von CYP11B2 Mutanten beschrieben. Diese haben den entscheidenden Nachteil, dass bei Folgeuntersuchungen die erneute Transfektion der Zellen erforderlich sein wird. Die stabile Transfektion ist wiederum sehr zeitintensiv und wurde bislang nur für den Wildtyp durchgeführt (Denner *et al.*, 1995).

## 5.2 *S. pombe* als 18OHB–Produzent

Die Diskrepanz zwischen den hohen *in vivo* gemessenen 18OHB Konzentrationen bei den Patienten und den im Labor erhaltenen experimentellen Daten aus rekombinanten Systemen – seien es Zelllinien oder das im Rahmen dieser Arbeit etablierte *S. pombe* System – kann vom heutigen Wissensstand aus nicht erklärt werden. Möglicherweise ist die hohe 18OHB–Konzentration im Plasma bzw. Urin der CMO II Patienten auf eine Restaktivität der CYP11B2 Mutanten zurückzuführen. Diese, wenn auch minimale, Restaktivität produziert stetig 18OHB, das jedoch aufgrund der vorhandenen Mutation nicht zu Aldosteron umgesetzt wird, sondern sich im Blut bzw. Urin der Patienten anreichert (Hobler *et al.*, 2011). Andere Synthesequellen für 18OHB, die im menschlichen Organismus vorliegen und somit die hohe 18OHB–Konzentration erklären würden, sind nicht bekannt.

Alles in allem bedarf es weiterer Optimierungsschritte, um die humane Aldosteronsynthese zur biotechnologischen Produktion von 18OHB einsetzen zu können. Im Gegensatz zu den Plasma- bzw. Urinalysen der Patienten, bei denen große Mengen 18OHB



gefunden wurden, konnte die Analyse der *in vivo* Untersuchungen mit *S. pombe* keine vermehrte Bildung von 18OHB nachweisen. Für eine höhere Ausbeute an 18OHB muss die Corticosteronbildung gesteigert werden, um genügend B, den direkten Vorläufer von 18OHB, zu gewinnen. Zusätzlich muss auch die 18-Hydroxycorticosteronbildung in einem Maße gesteigert werden, dass eine 18OHB Gewinnung rentabel wird. Damit das 18OHB nach seiner Produktion auch isoliert werden kann, sollte die 18-Oxidationsaktivität der Aldosteronsynthese unterbunden werden, um eine Weiterreaktion des gebildeten 18OHB zu Aldosteron zu verhindern.

In dieser Arbeit sind mehrere CYP11B2 Mutanten vorgestellt worden, die kein Aldosteron mehr bilden. Hierbei sind zwei CYP11B2 Mutanten besonders hervorzuheben, R181Q und R181W. Beide Mutanten zeichnen sich nicht nur durch die fehlende 18-Oxidation aus, sondern zeigen zudem eine extrem gesteigerte Corticosteronbildung. Leider ist die anschließende 18-Hydroxycorticosteronbildung durch die Mutationen ebenfalls stark beeinträchtigt worden. Die beiden CYP11B2 Mutationen können als Basis für weitere Mutagenese zu Erhöhung der 18-Hydroxycorticosteronbildung dienen.

So werden in der Biotechnologie Proteine mittels *Protein-Engineering* für den biotechnologischen Einsatz konstruiert. Dabei werden zwei Strategien unterschieden, das rationale Proteindesign und die gerichtete Evolution.

Das rationale Proteindesign basiert auf Strukturanalysen eines Proteins, um Vorhersagen für nützliche Mutationen treffen zu können, die dann mittels ortsgerichteter Mutagenese in das Protein eingeführt werden. Für die humane Aldosteronsynthese stehen jedoch nur Homologie-Modelle zur Verfügung (Belkina *et al.*, 2001; Ulmschneider *et al.*, 2005; Roumen *et al.*, 2007). Da seit kurzem eine reine und hochkonzentrierte CYP11B2-Proteinlösung zur Verfügung steht, werden Vorbereitungen getroffen, um die Kristallisation der humanen Aldosteronsynthese in naher Zukunft zu beginnen. Jedoch ist anzumerken, dass es nicht einfach sein wird, CYP11B2 als Membranprotein zu kristallisieren. So liegt trotz jahrzehntelanger intensiver Bemühungen erst seit kurzem die Struktur von CYP11A1 vor (Strushkevich *et al.*, 2011). Die Aminosäuresequenz von CYP11A1 und CYP11B2 weisen ein hohen Grad an Übereinstimmung auf, daher gehören sie der gleichen Familie an. Aber auch wenn die Struktur von CYP11B2 aufgedeckt ist, so ist zu berücksichtigen, dass die Veränderung einer Eigenschaft eines Proteins oftmals uner-

wünschte Auswirkungen auf andere Eigenschaften, wie z.B. der strukturellen Stabilität des Proteins haben. Daher sind insbesondere die Auswirkungen multipler Mutationen auf das Protein schwierig vorherzusagen. Im Hinblick auf die Produktion von 18OHB mit DOC als Ausgangssubstrat sind aber mindestens zwei Eigenschaften von CYP11B2 anzupassen. Zum einen muss die 18-Hydroxylierung erhöht werden, zum anderen muss gleichzeitig die 18-Oxidation blockiert werden, um eine Weiterreaktion des gebildeten 18OHB zu Aldosteron zu vermeiden. Auch wenn von der 11 $\beta$ -Hydroxylierung abstrahiert wird und Corticosteron als Ausgangssubstrat verwendet wird, so ist zu berücksichtigen, dass dann neben den eben beschriebenen Anforderungen für DOC auch noch eine Anpassung der Substrattasche erforderlich ist, damit B als Substrat in das aktive Zentrum aufgenommen wird. Untersuchungen mit gereinigtem CYP11B2 zeigten, dass CYP11B2 nur dann das Corticosteron in die Substratbindungstasche aufnimmt, wenn eine ausreichend hohe Menge von Corticosteron vorgelegt wird. Im Vergleich zum natürlichem CYP11B2-Substrat DOC beträgt der  $K_D$  für Corticosteron das 86-fache des  $K_D$  von Desoxycorticosteron (Hobler *et al.*, 2010). Die Affinität von CYP11B2 zu Corticosteron ist wesentlich schwächer als die Affinität des Enzyms zum natürlichen Substrat Desoxycorticosteron. Somit wäre bei der Vorgabe von Corticosteron als Substrat eine Anpassung der Substrattasche eine notwendige Voraussetzung. Vermutlich müssten mehrere Aminosäureaustausche vollzogen werden, die perfekt zusammenspielen müssen, ohne negative Seiteneffekte auszulösen. Eine rationale Lösung für diese komplexe Anforderungen, bei der eine Anpassung der Substrattasche vorgenommen werden muss, während gleichzeitig die 18-Hydroxylierungsaktivität erhöht und die 18-Oxidationsaktivität blockiert wird, ist so gut wie unmöglich.

Eine Alternative zum rationalen Proteindesign ist die gerichtete Evolution. Hierbei werden im ersten Schritt Mutantenbibliotheken generiert, die dann in einem zweiten Schritt hinsichtlich der gewünschten Eigenschaft gescreent werden. Dieser Prozess wird mehrmals wiederholt, bis sich anfänglich kleine Verbesserungen über mehrere Mutantengenerationen akkumulieren und letztlich zur großen gewünschten Veränderung der Enzymeigenschaft führen. Vorteil hierbei ist die Unabhängigkeit von Strukturdaten oder Kenntnissen zu katalytischen Mechanismen. Jedoch ist ein geeignetes Screeningsystem erforderlich, um die Mutantenbibliothek schnell und effizient zu begutachten. Hier wäre ein

Ganzzellensystem von Vorteil, welches das CYP11B2 in seiner Enzymaktivität unterstützt. Ein solches *S. pombe* Ganzzellensystem, das für das Screening der Mutantenbibliothek eingesetzt werden kann, liegt bereits vor. Hakki setzte sein *S. pombe* Ganzzellensystem bereits erfolgreich bei der Suche nach selektiven CYP11B2–Inhibitoren ein (Hakki *et al.*, 2011). Das System basiert auf dem Einsatz von Mikrotiterplatten und HPLC–Analysen. Hakki konnte mit seinem System 6000 Substanzen innerhalb einer Woche auf ihre Fähigkeit, CYP11B2 selektiv zu inhibieren, testen (Hakki, 2008).

Weiterhin konnte Virus mithilfe der gerichteten Evolution erfolgreich Mutanten von der 15 $\beta$ -Hydroxylase (CYP106A2) aus *Bacillus megaterium* ATCC13368 herstellen, die eine erhöhte Aktivität und veränderte Regioselektivität der Steroidhydroxylierung aufwiesen (Virus, 2006).

Weitere Untersuchungen zum Enzym selbst sind notwendig, um eine ausreichende Aktivität für den biotechnologischen Einsatz zu erhalten. Zu beachten ist hierbei, dass das gewünschte Steroid 18-Hydroxycorticosteron aufgrund seiner speziellen Struktur schwer zu untersuchen ist. Die zwei Hydroxygruppen und die Ketogruppe des Moleküls führen dazu, dass 18OHB in Lösung höchst instabil ist. Sowohl Keto-Enol Tautomerie als auch Umlagerungsprodukte sind beschrieben worden (Usa *et al.*, 1979; Aragones *et al.*, 1978; Damasco & Lantos, 1975). Die Molekül–Instabilität ist von der Umgebung abhängig, in dem das Steroid gelöst vorliegt. Zu den Parameter, die das Steroid destabilisieren, zählen niedriger pH Wert, hohe Temperatur und bei ungeeigneten Lösungsmittel die Inkubationsdauer von 18OHB darin. Die Bewältigung dieser Probleme sind nicht einfach. Die organische Chemie hat aufgrund der hohen Instabilität von 18OHB nicht kommerziell herstellen können. Die einzige Publikation zur Herstellung von 18OHB beinhaltet viele Arbeitsschritte, in der 18OHB mit hohem Aufwand isoliert und dessen Identität bestätigt wurde (Kirk & Rajagopalan, 1976).

Die biotechnologische Produktion von 18OHB in Mikroorganismen wie *S. pombe* ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht durchführbar. Doch konnte bereits *in vitro* mit dem rekombinanten CYP11B2 aus *E. coli* 18OHB gebildet und isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Es wurde beobachtet, dass der CYP11B2 Wildtyp prinzipiell zur 18OHB Produktion geeignet ist. Nach 30 Minuten Umsatzzeit wurde nahezu das komplett vorgelegte DOC (1  $\mu$ M)

umgesetzt und ein Großteil lag als 18OHB vor. Die Menge an Aldosteron blieb relativ gering und konnte auch durch höherer DOC Konzentration nicht gesteigert werden. Anscheinend liegen Kontrollmechanismen vor, die das Verhältnis der Intermediate reguliert, aber zur Zeit noch nicht verstanden sind. Nur bei bestimmter Enzymkonzentration und einer definierten Umsatzdauer lässt sich 18OHB *in vitro* mit Hilfe von CYP11B2 Wildtyp „produzieren“.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit den erzielten Resultaten ein großer Schritt in Richtung einer zukünftigen Verwendung von CYP11B2 zur biotechnologischen Synthese von 18-Hydroxycorticosteron gemacht worden ist. Bis zur tatsächlichen biotechnologischen Anwendung der Aldosteronsynthase sind jedoch noch weitere Grundlagenforschungen und auch biotechnologische Optimierungen notwendig.

# Literaturverzeichnis

- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M. & Warbrick, E., Hg. (1993) *Experiments with fission yeast. A laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Press.
- Appel, D., Schmid, R.D., Dragan, C.A., Bureik, M. & Urlacher, V.B. (2005) "A fluorimetric assay for cortisol." *Anal Bioanal Chem* 383(2): 182–186.
- Aragones, A., Gros, E.G., Lantos, C.P. & Locascio, G.A. (1978) "Less polar forms and derivatives of 18 hydroxy-corticosterone." *J Steroid Biochem* 9(2): 175–180.
- Arai, H. & Escobedo, J.A. (1996) "Angiotensin II type 1 receptor signals through Raf-1 by a protein kinase C-dependent, Ras-independent mechanism." *Mol Pharmacol* 50(3): 522–528.
- Arriza, J.L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T.M., Handelin, B.L., Housman, D.E. & Evans, R.M. (1987) "Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor." *Science* 237(4812): 268–275.
- Baneyx, F. (1999) "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*." *Curr Opin Biotech* 10(5): 411–421.
- Belkina, N.V., Lisurek, M., Ivanov, A.S. & Bernhardt, R. (2001) "Modelling of three-dimensional structures of cytochromes P450 11B1 and 11B2." *J Inorg Biochem* 87(4): 197–207.
- Bernhardt, R. (1996) "Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species." *Rev Physiol Bioch P* 127: 137–221.
- Bernhardt, R. (2006) "Cytochromes P450 as versatile biocatalysts." *J. Biotechnol.* 124(1): 128–145.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A.,

- Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. & Shao, Y. (1997) "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." *Science* 277(5331): 1453–1462.
- Bradwell, J.C.A., McGovern, K. & Beckwith, J. (1991) "Identification of a protein required for disulfid bond formation *in vivo*." *Cell* 67: 581–589.
- Buchner, J. & Rudolph, R. (1991) "Routes to active proteins from transformed microorganisms." *Curr Opin Biotech* 2(4): 532–538.
- Bureik, M., Jungbluth, A., Drescher, R. & Wagner, P. (1997) "Human p53 restores DNA synthesis control in fission yeast." *Biol Chem* 378(11): 1361–1371.
- Bureik, M., Hübel, K., Dragan, C.A., Scher, J., Becker, H., Lenz, N. & Bernhardt, R. (2004) "Development of test systems for the discovery of selective human aldosterone synthase (CYP11B2) and 11 $\beta$ -hydroxylase (CYP11B1) inhibitors. Discovery of a new lead compound for the therapy of congestive heart failure, myocardial fibrosis and hypertension." *Mol Cell Endocrinol* 217(1-2): 249–254.
- Bureik, M., Schiffler, B., Hiraoka, Y., Vogel, F. & 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.
- Chappell, T.G. & Warren, G. (1989) "A galactosyltransferase from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *J Cell Biol* 109(6 Pt 1): 2693–2702.
- Clyne, C.D., White, P.C. & Rainey, W.E. (1996) "Calcium regulates human CYP11B2 transcription." *Endocr Res* 22(4): 485–492.
- Cover, C.M., Wang, J.M., St Lezin, E., Kurtz, T.W. & Mellon, S.H. (1995) "Molecular variants in the P450c11AS gene as determinants of aldosterone synthase activity in the Dahl rat model of hypertension." *J Biol Chem* 270(28): 16555–16560.
- Curnow, K.M., Slutsker, L., Vitek, J., Cole, T., Speiser, P.W., New, M.I., White, P.C. & Pascoe, L. (1993) "Mutations in the CYP11B1 gene causing congenital adrenal hyperplasia and hypertension cluster in exons 6, 7, and 8." *P Natl Acad Sci Usa* 90(10): 4552–4556.

- Curnow, K.M., Tusie-Luna, M.T., Pascoe, L., Natarajan, R., Gu, J.L., Nadler, J.L. & White, P.C. (1991) "The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex." *Mol Endocrinol* 5(10): 1513–1522.
- Damasco, M.C. & Lantos, C.P. (1975) "The existence of two interconvertible forms of 18-hydroxycorticosterone: is one of them an active precursor of aldosterone?" *J Steroid Biochem* 6(1): 69–74.
- Denner, K., Doehmer, J. & Bernhardt, R. (1995) "Cloning of CYP11B1 and CYP11B2 from normal human adrenal and their functional expression in COS-7 and V79 Chinese hamster cells." *Endocr Res* 21(1-2): 443–4448.
- Dominguez, O.V. (1965) "The presence of two interconvertible forms of 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone." *Steroids* 2: 29–49.
- Dragan, C.A., Zearo, S., Hannemann, F., Bernhardt, R. & Bureik, M. (2005) "Efficient conversion of 11-deoxycortisol to cortisol (hydrocortisone) by recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Fems Yeast Res* 5(6-7): 621–625.
- Dunlop, F.M., Crock, P.A., Montalto, J., Funder, J.W. & Curnow, K.M. (2003) "A compound heterozygote case of type II aldosterone synthase deficiency." *J Clin Endocr Metab* 88(6): 2518–2526.
- Ehmer, P.B., Bureik, M., Bernhardt, R., Müller, U. & 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." *J Steroid Biochem* 81(2): 173–179.
- Evans, R.M. & Arriza, J.L. (1989) "A molecular framework for the actions of glucocorticoid hormones in the nervous system." *Neuron* 2(2): 1105–1112.
- Ewen, K.M., Schiffler, B., Uhlmann-Schiffler, H., Bernhardt, R. & Hannemann, F. (2008) "The endogenous adrenodoxin reductase-like flavoprotein arh1 supports heterologous cytochrome P450-dependent substrate conversions in *Schizosaccharomyces pombe*." *Fems Yeast Res* 8(3): 432–441.

- Fardella, C.E., Rodriguez, H., Hum, D.W., Mellon, S.H. & Miller, W.L. (1995) "Artificial mutations in P450c11AS (aldosterone synthase) can increase enzymatic activity: a model for low-renin hypertension?" *J Clin Endocr Metab* 80(3): 1040–1043.
- Funder, J.W., Pearce, P.T., Smith, R. & 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." *Arch. Biochem. Biophys.* 77(2): 493–509.
- Geley, S., Kapelari, K., Joehrer, K., Peter, M., Glatzl, J., Vierhapper, H., Schwarz, S., Helmsberg, A., Sippell, W.G., White, P.C. & Kofler, R. (1996) "CYP11B1 mutations causing congenital adrenal hyperplasia due to 11  $\beta$ -hydroxylase deficiency." *J Clin Endocr Metab* 81(8): 2896–2901.
- Giga-Hama, Y. & Kumagai, H., Hg. (1997) *Foreign gene expression in fission yeast: Schizosaccharomyces pombe*. Springer Verlag.
- Gunsalus, I.C. & Sligar, S.G. (1978) "Oxygen reduction by the P450 monooxygenase systems." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 47: 1–44.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J. (2004) "Codon bias and heterologous protein expression." *Trends Biotechnol* 22(7): 346–353.
- Hakki, T. (2008) *Development of efficient cytochrome P450-dependent whole-cell biotransformation reactions for steroid hydroxylation and drug discovery* Dissertation Universität des Saarlandes.
- Hakki, T. & Bernhardt, R. (2006) "CYP17- and CYP11B-dependent steroid hydroxylases as drug development targets." *Pharmacol Therapeut* 111(1): 27–52.
- Hakki, T., Hübel, K., Waldmann, H. & 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." *J Steroid Biochem Mol Biol* 125: 120–128.



- Hakki, T., Zearo, S., Dragan, C.A., Bureik, M. & Bernhardt, R. (2008) "Coexpression of redox partners increases the hydrocortisone (cortisol) production efficiency in CYP11B1 expressing fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *J Biotechnol* 133(3): 351–359.
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M. & Bernhardt, R. (2007) "Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains." *Biochim Biophys Acta* 1770(3): 330–344.
- Hannig, G. & Makrides, S.C. (1998) "Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*." *Trends Biotechnol* 16(2): 54–60.
- Hanukoglu, I. (1992) "Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis" *J Steroid Biochem Mol Biol* 43: 779–804.
- Hayaishi, D. & Nozaki, M. (1969) "Nature and mechanisms of oxygenases" *Science* 164: 389–396.
- Hayles, J. & Nurse, P. (1992) "Genetics of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Annual review of genetics* 26: 373–402.
- Helmberg, A. (1993) "Twin genes and endocrine disease: CYP21 and CYP11B genes." *Acta endocrinol* 129(2): 97–108.
- Heyer, W.D., Sipiczki, M. & Kohli, J. (1986) "Replicating plasmids in *Schizosaccharomyces pombe*: improvement of symmetric segregation by a new genetic element." *Mol Cell Biol* 6(1): 80–89.
- Hobler, A., Kagawa, N., Hannemann, F. & Bernhardt, R. (2010) "Human aldosterone synthase (CYP11B2): Heterologous expression in *E. coli*, purification and functional characterization" *14th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, September 21-24, 2010, Edinburgh, Scotland*.
- Hobler, A., Neunzig, J., Kagawa, N., Hutter, M., Wudy, S., Hartmann, M., Hannemann, F. & Bernhardt, R. (2011) "Human aldosterone synthase: recombinant expression in *E. coli* and purification enables the detailed biochemical analysis of clinically relevant mutants on the molecular level." In Vorbereitung.

- Holloway, C.D., MacKenzie, S.M., Fraser, R., Miller, S., Barr, M., Wilkinson, D., Forbes, G.H., Friel, E., Connell, J.M.C. & Davies, E. (2009) "Effects of genetic variation in the aldosterone synthase (CYP11B2) gene on enzyme function." *Clin Endocrinol* 70(3): 363–371.
- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W.J. & Azhar, S. (2010) "Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones." *Nutr Metab (Lond)* 7(47).
- Ishimura, K. & Fujita, H. (1997) "Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes." *Microsc. Res. Techn.* 36: 445–453.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2004) *Histologie* Springer Verlag.
- Kallen, C.B., Billheimer, J.T., Summers, S.A., Stayrook, S.E., Lewis, M. & Strauss, J.F. (1998) "Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein." *J Biol Chem* 273(41): 26285–26288.
- Kawamoto, T., Mitsuuchi, Y., Ohnishi, T., Ichikawa, Y., Yokoyama, Y., Sumimoto, H., Toda, K., Miyahara, K., Kuribayashi, I., Nakao, K., Hosoda, K., Yamamoto, Y., Imura, H. & Shizuta, Y. (1990) "Cloning an expression of a cDNA for human Cytochrome P-450<sub>aldo</sub> as related to primary aldosteronism" *Biochem Biophys Res Commun.* 173: 309–316.
- Kawamoto, T., Mitsuuchi, Y., Toda, K., Yokoyama, Y., Miyahara, K., Miura, S., Ohnishi, T., Ichikawa, Y., Nakao, K., Imura, H., Ulick, S. & Shizuta, Y. (1992) "Role of steroid 11 $\beta$ -hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans" *P Natl Acad Sci Usa* 89: 1458–1462.
- Kayes-Wandover, K.M., Schindler, R.E., Taylor, H.C. & White, P.C. (2001) "Type 1 aldosterone synthase deficiency presenting in a middle-aged man." *J Clin Endocr Metab* 86(3): 1008–1012.
- Keilin, D. (1925) "On Cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants." *Proc Roy Soc Lon B Biol Sci* 98: 312–339.
- Kirk, D.N. & Rajagopalan, M.S. (1976) "A synthesis of 11 $\beta$ ,18,21-trihydroxypregn-4-ene-3,20-dione ("18-hydroxy-corticosterone")." *J Chem Soc, Chem Commun* 2: 77–78.

- Klingenberg, M. (1958) "Pigments of rat liver microsomes" *Arch. Biochem. Biophys.* 75(2): 376–386.
- Klinke, R. & Silbernagl, S., Hg. (2003) *Lehrbuch der Physiologie* Thieme.
- Kohli, J., Hottinger, H., Munz, P., Strauss, A. & Thuriaux, P. (1977) "Genetic Mapping in *Schizosaccharomyces pombe* by mitotic and meiotic analysis and induced haploidization" *Genetics* 87(3): 471–489.
- Krozowski, Z. (1999) "The 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases: functions and physiological effects." *Mol Cell Endocrinol* 151(1-2): 121–127.
- Krozowski, Z., Li, K.X., Koyama, K., Smith, R.E., Obeyesekere, V.R., Stein-Oakley, A., Sasano, H., Coulter, C., Cole, T. & Sheppard, K.E. (1999) "The type I and type II 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes." *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69(1-6): 391–401.
- Kuribayashi, I., Kuge, H., Santa, R.J., Mutlaq, A.Z., Yamasaki, N., Furuno, T., Takahashi, A., Chida, S., Nakamura, T., Endo, F., Doi, Y., Onishi, S. & Shizuta, Y. (2003) "A missense mutation (GGC[435Gly]→AGC[Ser]) in exon 8 of the CYP11B2 gene inherited in Japanese patients with congenital hypoaldosteronism." *Horm Res* 60(5): 255–260.
- Langer, T., Lu, C., Echoles, H., Flanagan, J., Hayer, M. & Hartl, F. (1992) "The *E. coli* heat shock proteins GroEL and GroES modulate the folding of the  $\beta$ -lactamase precursor" *EMBO J* 9: 2315–2319.
- Leshinsky-Silver, E., Landau, Z., Unlubay, S., Bistrizer, T., Zung, A., Tenenbaum-Rakover, Y., Devries, L., Lev, D. & Hanukoglu, A. (2006) "Congenital hyperreninemic hypoaldosteronism in Israel: sequence analysis of CYP11B2 gene." *Horm Res* 66(2): 73–78.
- Lindner, P. (1893) "*Schizosaccharomyces pombe nova species*, ein neuer Gahrungserreger." *Wochenschrift fur Brauerei* 10: 1298–1300.
- Lithgow, T., Glick, B.S. & Schatz, G. (1995) "The protein import receptor of mitochondria." *Trends Biochem Sci* 20(3): 98–101.

- Losson, R. & Lacroute, F. (1983) "Plasmids carrying the yeast OMP decarboxylase structural and regulatory genes: transcription regulation in a foreign environment." *Cell* 32(2): 371–377.
- Margoliash, E. & Schejter, A. (1984) "100 and 70 years ago: Myohaematin and histohaematin (cytochromes)" *Trends Biochem Sci* 9: 364–367.
- Mayer, M. & Buchner, J. (2004) "Refolding of inclusion body proteins." *Methods Mol Med* 94: 239–254.
- McMunn, C. (1885) "On myohaematin, an intrinsic muscle-pigment of vertebrates and invertebrates, on histohaematin, and on the spectrum of the suprarenal bodies." *J Physiol* 5: XXIV–XXVI.
- Mendel, C.M. (1989) "The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model." *Endocr Rev* 10(3): 232–274.
- Miller, W.L. (2011) "Role of mitochondria in steroidogenesis." *Endocr Dev* 20: 1–19.
- Mitraki, A., Fane, B., Haase-Pettingell, C., Sturtevant, J. & King, J. (1991) "Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation." *Science* 253(5015): 54–58.
- Moreno, S., Klar, A. & Nurse, P. (1991) "Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Method Enzymol* 194: 795–823.
- Morishima, Y., Kanelakis, K.C., Murphy, P.J., Shewach, D.S. & Pratt, W.B. (2001) "Evidence for iterative ratcheting of receptor-bound hsp70 between its ATP and ADP conformations during assembly of glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplexes." *Biochemistry* 40(4): 1109–1116.
- Mornet, E., Dupont, J., Vitek, A. & White, P.C. (1989) "Characterization of two genes encoding human steroid 11  $\beta$ -hydroxylase (P-450<sub>11 $\beta$</sub> )." *J Biol Chem* 264(35): 20961–20967.
- Nakagawa, Y., Yamada, M., Ogawa, H. & Igarashi, Y. (1995) "Missense mutation in CYP11B1 (CGA[Arg-384]→GGA[Gly]) causes steroid 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency." *Eur J Endocrinol* 132(3): 286–189.

- 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. & Levin, W. (1987) "The P450 gene superfamily: recommended nomenclature." *DNA* 6(1): 1–11.
- Nelson, D.R. (2009) "The Cytochrome P450 Homepage." *Human Genomics* 4: 59–65.
- Neunzig, J. (2009) *Analyse natürlicher, Kortikosteron-Methyloxidase Defizienz verursachender Varianten des humanen CYP11B2* Diplomarbeit Universität des Saarlandes.
- Nguyen, H.H. (2008) *Molecular genetic investigations of patients with defects in steroid hormone production* Dissertation Universität des Saarlandes.
- Nguyen, H.H., Hannemann, F., Hartmann, M.F., Malunowicz, E.M., Wudy, S.A. & Bernhardt, R. (2010) "Five novel mutations in CYP11B2 gene detected in patients with aldosterone synthase deficiency type I: Functional characterization and structural analyses." *Mol Genet Metab* 100(4): 357–364.
- Nguyen, H.H., Hannemann, F., Hartmann, M.F., Wudy, S.A. & Bernhardt, R. (2008) "Aldosterone synthase deficiency caused by a homozygous L451F mutation in the CYP11B2 gene." *Mol Genet Metab* 93(4): 458–467.
- Nonaka, Y., Fujii, T., Kagawa, N., Waterman, M.R., Takemori, H. & Okamoto, M. (1998) "Structure/function relationship of CYP11B1 associated with Dahl's salt-resistant rats—expression of rat CYP11B1 and CYP11B2 in *Escherichia coli*." *Eur J Biochem* 258(2): 869–878.
- Ogishima, T., Mitani, F. & Ishimura, Y. (1989a) "Isolation of aldosterone synthase cytochrome P-450 from *zona glomerulosa* mitochondria of rat adrenal cortex." *J Biol Chem* 264(19): 10935–10938.
- Ogishima, T., Mitani, F. & Ishimura, Y. (1989b) "Isolation of two distinct cytochromes P-450<sub>11 beta</sub> with aldosterone synthase activity from bovine adrenocortical mitochondria." *J Biol* 105(4): 497–499.
- Ogishima, T., Shibata, H., Shimada, H., Mitani, F., Suzuki, H., Saruta, T. & Ishimura, Y. (1991) "Aldosterone synthase cytochrome P-450 expressed in the adrenals of patients with primary aldosteronism." *J Biol Chem* 266(17): 10731–1074.

- Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K. & Okayama, H. (1990) "High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*." *Nucleic Acids Res* 18(22): 6485–6489.
- Omura, T. & Sato, R. (1964a) "Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature." *J Biol Chem* 239(7): 2370–2378.
- Omura, T. & Sato, R. (1964b) "Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties" *J Biol Chem* 239(7)(7): 2379–2385.
- Pascoe, L., Curnow, K.M., Slutsker, L., Rösler, A. & White, P.C. (1992) "Mutations in the human CYP11B2 (aldosterone synthase) gene causing corticosterone methyloxidase II deficiency." *P Natl Acad Sci Usa* 89(11): 4996–5000.
- Peter, M., Nikischin, W., Heinz-Erian, P., Fussenegger, W., Kapelari, K. & Sippell, W.G. (1998) "Homozygous deletion of arginine-173 in the CYP11B2 gene in a girl with congenital hypoaldosteronism. Corticosterone methyloxidase deficiency type II." *Horm Res* 50(4): 222–225.
- Pezzi, V., Clyne, C.D., Ando, S., Mathis, J.M. & Rainey, W.E. (1997) "Ca<sup>2+</sup>-regulated expression of aldosterone synthase is mediated by calmodulin and calmodulin-dependent protein kinases." *Endocrinology* 138(2): 835–838.
- Pfanner, N., Craig, E.A. & Meijer, M. (1994) "The protein import machinery of the mitochondrial inner membrane." *Trends Biochem Sci* 19(9): 368–372.
- Portrat-Doyen, S., Tourniaire, J., Richard, O., Mulatero, P., Aupetit-Faisant, B., Curnow, K.M., Pascoe, L. & Morel, Y. (1998) "Isolated aldosterone synthase deficiency caused by simultaneous E198D and V386A mutations in the CYP11B2 gene." *J Clin Endocr Metab* 83(11): 4156–4161.
- Pratt, W.B. (1993) "The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor." *J Biol Chem* 268(29): 21455–21458.
- Pratt, W.B. & Welsh, M.J. (1994) "Chaperone functions of the heat shock proteins associated with steroid receptors." *Semin Cell Biol* 5(2): 83–93.

- Roumen, L., Sanders, M.P.A., Pieterse, K., Hilbers, P.A.J., Plate, R., Custers, E., de Gooyer, M., Smits, J.F.M., Beugels, I., Emmen, J., Ottenheijm, H.C.J., Leysen, D. & Hermans, J.J.R. (2007) "Construction of 3D models of the CYP11B family as a tool to predict ligand binding characteristics." *J Comput Aid Mol Des* 21(8): 455–471.
- Roy, A.K., Ramirez, L.C. & Ulick, S. (1976) "Structure and mechanism of formation of the two forms of 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone." *J Steroid Biochem* 7(2): 81–87.
- Rösler, A. (1984) "The natural history of salt-wasting disorders of adrenal and renal origin." *J Clin Endocr Metab* 59(4): 689–700.
- Ruckpaul, K. (1993) "Cytochrom P450 abhängige Enzyme - Targetsysteme für die Arzneistoffentwicklung?" *Pharmazie unserer Zeit* 22: 296–304.
- Ruckpaul, K. & Rein, H., Hg. (1990) *Frontiers of biotransformation* Akademie Verlag, Berlin.
- Russell, P. & Nurse, P. (1986) "*Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*: a look at yeasts divided." *Cell* 45: 781–782.
- Sambrook, J. & Russel, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Spring Harbor Laboratory Press.
- Sankoff, D., Leduc, G., Antoine, N., Paquin, B., Lang, B.F. & Cedergren, R. (1992) "Gene order comparisons for phylogenetic inference: evolution of the mitochondrial genome." *P Natl Acad Sci Usa* 89(14): 6575–6579.
- Schiffler, B., Bureik, M., Reinle, W., MÃ¼ller, E.C., Hannemann, F. & Bernhardt, R. (2004) "The adrenodoxin-like ferredoxin of *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria." *J Inorg Biochem* 98(7): 1229–1237.
- Shi, P.Y., Maizels, N. & Weiner, A.M. (1997) "Recovery of soluble, active recombinant protein from inclusion bodies." *Biotechniques* 23(6): 1036–1038.
- Shizuta, Y., Kawamoto, T., Mitsuuchi, Y., Miyahara, K., Rösler, A., Ulick, S. & Imura, H. (1995) "Inborn errors of aldosterone biosynthesis in humans." *Steroids* 60(1): 15–21.

- Shizuta, Y., Kawamoto, T., Mitsuuchi, Y., Toda, K., Miyahara, K., Ichikawa, Y., Imura, H. & Ulick, S. (1992) "Molecular genetic studies on the biosynthesis of aldosterone in humans" *J Steroid Biochem M* 43: 981–987.
- Shuman, S. (1994) "Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase." *J Biol Chem* 269(51): 32678–32684.
- Siegenthaler, W. & Blum, H., Hg. (2006) *Klinische Pathophysiologie* Thieme, Stuttgart.
- Slater, E.C. (2003) "Keilin, cytochrome, and the respiratory chain." *J Biol Chem* 278(19): 16455–16461.
- Strushkevich, N., Mackenzie, F., Cherkesova, T., Grabovec, I., Usanov, S. & Park, H.W. (2011) "Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system." *P Natl Acad Sci Usa* 108: 10139–10143.
- Stuart, R.A., Cyr, D.M., Craig, E.A. & Neupert, W. (1994) "Mitochondrial molecular chaperones: their role in protein translocation." *Trends Biochem Sci* 19(2): 87–92.
- Suga, M. & Hatakeyama, T. (2005) "A rapid and simple procedure for high-efficiency lithium acetate transformation of cryopreserved *Schizosaccharomyces pombe* cells." *Yeast* 22(10): 799–804.
- Swamy, K.H. & Goldberg, A.L. (1982) "Subcellular distribution of various proteases in *Escherichia coli*." *J Bakteriol* 149(3): 1027–1033.
- Talmadge, K. & Gilbert, W. (1982) "Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*." *P Natl Acad Sci Usa* 79(6): 1830–1833.
- Ulick, S. (1976) "Diagnosis and nomenclature of the disorders of the terminal portion of the aldosterone biosynthetic pathway." *J Clin Endocr Metab* 43(1): 92–96.
- Ulick, S. (1996) "Correction of the nomenclature and mechanism of the aldosterone biosynthetic defects." *J Clin Endocr Metab* 81(3): 1299–1300.
- Ulmschneider, S., Müller-Vieira, U., Mitrenga, M., Hartmann, R.W., Oberwinkler-Marchais, S., Klein, C.D., Bureik, M., Bernhardt, R., Antes, I. & Lengauer, T. (2005) "Synthesis and



- evaluation of imidazolymethylenetetrahydronaphthalenes and imidazolymethyleneindanes: potent inhibitors of aldosterone synthase." *J Med Chem* 48(6): 1796–1805.
- Usa, T., Ganguly, A. & Weinberger, M.H. (1979) "M and L forms of 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone and 18-hydroxycorticosterone: factors influencing conversion, stability and immunological properties." *J Steroid Biochem* 10(5): 557–562.
- Virus, C. (2006) *Etablierung und Evaluierung eines Screeningsystems für die molekulare Evolution der Steroid-15 $\beta$ -Hydroxylase (CYP106A2) aus Bacillus megaterium ATCC 13368* Dissertation Universität des Saarlandes.
- Visser, H.K. & Cost, W.S. (1964) "A new hereditary defect in the biosynthesis of aldosterone: urinary C<sub>21</sub>-Corticosteroid pattern in three related patients with a salt-losing syndrome, suggesting an 18-oxidation defect." *Acta endocrinol* 47: 589–612.
- Voedisch, B., Menzel, C., Jordan, E., El-Ghezal, A., Schirrmann, T., Hust, M. & Jostock, T. (2005) "Heterologe Expression von rekombinanten Proteinpharmazeutika" *Laborwelt* 3: 31–35.
- Wada, A., Ohnishi, T., Nonaka, Y., Okamoto, M. & Yamano, T. (1985) "Synthesis of aldosterone by a reconstituted system of cytochrome P-45011 beta from bovine adrenocortical mitochondria." *J Biochem* 98(1): 245–256.
- White, P.C., Curnow, K.M. & Pascoe, L. (1994) "Disorders of steroid 11 $\beta$ -hydroxylase isozymes." *Endocrine reviews* 15(4): 421–38.
- White, P.C., Dupont, J., New, M.I., Leiberman, E., Hochberg, Z. & Rösler, A. (1991) "A mutation in CYP11B1 (Arg-448—His) associated with steroid 11 beta-hydroxylase deficiency in Jews of Moroccan origin." *J Clin Invest* 87(5): 1664–1667.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E.J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones,

L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R.G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schäfer, M., Müller-Auer, S., Gabriel, C., Fuchs, M., Düsterhöft, A., Fritzc, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T.M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dréano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S.J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S.M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V.A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R.R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sánchez, M., del Rey, F., Benito, J., Domínguez, A., Revuelta, J.L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S.L., Cerutti, L., Lowe, T., McCombie, W.R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G.V., Ussery, D., Barrell, B.G., Nurse, P. & Cerrutti, L. (2002) "The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*." *Nature* 415(6874): 871–880.

Yamazaki, S., Sato, K., Suhara, K., Sakaguchi, M., Mihara, K. & Omura, T. (1993) "Importance of the proline-rich region following signal-anchor sequence in the formation of correct conformation of microsomal cytochrome P-450s." *J Biochem* 114(5): 652–657.

Zhang, G., Rodriguez, H., Fardella, C.E., Harris, D.A. & Miller, W.L. (1995) "Mutation T318M in the CYP11B2 gene encoding P450c11AS (aldosterone synthase) causes corticosterone methyl oxidase II deficiency." *Am J Hum Genet* 57(5): 1037–1043.

Zuber, M.X., Mason, J.I., Simpson, E.R. & Waterman, M.R. (1988) "Simultaneous transfection of COS-1 cells with mitochondrial and microsomal steroid hydroxylases: incorporation of a steroidogenic pathway into nonsteroidogenic cells." *P Natl Acad Sci Usa* 85(3): 699–703.

# Anhang

## Veröffentlichung

**Tin Ming Kwai**, Hakki Tarek, Bernhardt Rita.

„Fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as a new system for the investigation of corticosterone methyloxidase deficiency–causing mutations.“

J Steroid Biochem Mol Biol. 2011 Mar; 124(1-2):31-37. Epub: 13. Jan 2011

## Posterbeiträge

**Tin Ming Kwai**, Hakki Tarek, Bernhardt Rita.

„Bioproduction of steroids by cytochrome P450 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.“

3. FEBS Advanced Course „Cytochrome P450 systems: from structure to application“, Kranjska, Slovenien, 2008

## Nukleotidsequenz der humanen CYP11B2 cDNA

Die Codons für L106P (CCG) und E258G (GGG) sind in Großbuchstaben und unterstrichen hervorgehoben.

atggcactca	gggcaaaggc	agaggtgtgc	gtggcagcgc	cctggctgtc	cctgcaaagg	60
gcacgggcac	tgggactag	agccgctcgg	gcccctagga	cggtgctgcc	gtttgaagcc	120
atgccccagc	atccaggcaa	caggtggctg	aggctgctgc	agatctggag	ggagcagggt	180
tatgagcacc	tgcacctgga	gatgcaccag	accttccagg	agctggggcc	cattttcagg	240
tacaacttgg	gaggaccacg	catggtgtgt	gtgatgctgc	cggaggatgt	ggagaagctg	300
caacaggtgg	acagc <u>CCG</u> ca	tccttcaggg	atgatcctgg	agccctgggt	ggcctacaga	360
caacatcgtg	ggcacaaatg	tggcgtgttc	ttgttgaatg	ggcctgaatg	gcgcttcaac	420
cgattgcggc	tgaaccagga	tgtgctgtcg	cccaaggccg	tgcagagggt	cctcccgatg	480
gtggatgcag	tggccaggga	cttctcccag	gccctgaaga	agaaggtgct	gcagaacgcc	540
cgggggagcc	tgaccctgga	cgtccagccc	agcatcttcc	actacaccat	agaagccagc	600
aacttagctc	tttttgagga	gcggctgggc	ctggttgcc	acagcccag	ttctgccagc	660
ctgaacttcc	tccatgccct	ggaggtcatg	ttcaaataca	ccgtccagct	catgttcatg	720
cccaggagcc	tgtctcgctg	gatcagcccc	aaggtgtgga	aggagcactt	<u>tGGG</u> gcctgg	780
gactgcatct	tccagtacgg	tgacaactgt	atccagaaaa	tctaccagga	actggccttc	840
aaccgcctc	aactacac	aggcatcgtg	gcagagctcc	tgttgaaggc	ggaactgtca	900
ctagaagcca	tcaaggccaa	ctctatggaa	ctcactgcag	ggagcgtgga	cacgacagcg	960
tttccttgc	tgatgacgct	ctttgagctg	gctcgggaacc	ccgacgtgca	gcagatcctg	1020
cgccaggaga	gcctggccgc	cgcagccagc	atcagtgaac	atcccagaa	ggcaaccacc	1080
gagctgccct	tgtcgcgggc	ggccctcaag	gagaccttgc	ggctctacc	tgtgggtctg	1140
tttttgagc	gagtggtag	ctcagacttg	gtgcttcaga	actaccacat	cccagctggg	1200
acattggtac	aggttttct	ctactcgctg	ggtcgcaatg	ccgcttggt	cccgaggcct	1260
gagcggata	atcccagcg	ctggctagac	atcaggggct	ccggcaggaa	cttccaccac	1320
gtgccctttg	gctttggcat	gcgccagtgc	ctcgggcggc	gcctggcaga	ggcagagatg	1380
ctgctgctgc	tgcaccacgt	gctgaagcac	ttcctggtgg	agacactaac	tcaagaggac	1440
ataaagatgg	tctacagctt	catattgagg	cctggcacgt	ccccctcct	cactttcaga	1500
gcgattaact	ag					

## Vektorkarten

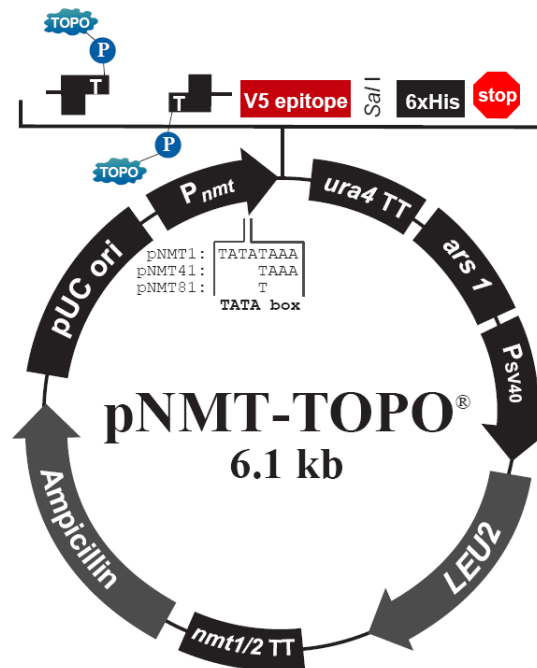


Abbildung 6.1: Vektorkarte des pNMT1-TOPO (Invitrogen; Karlsbad).

**Hefekomponenten** =  $P_{nmt}$ : *nmt1*-Promotor; V5 epitope: *Pk*-tag; 6xHis: Polyhistidin-tag; *ura4* TT: Transkriptionsterminator; *ars 1*: autonom replizierende Sequenz;  $P_{SV40}$ : Promotor des *LEU2* Gen; *LEU2*: Selektionsmarkergen; *nmt1/2* TT: Transkriptionsterminator  
***E. coli*-Komponenten** = Ampicillin: Resistenzgen; pUC ori: Replikationsursprung

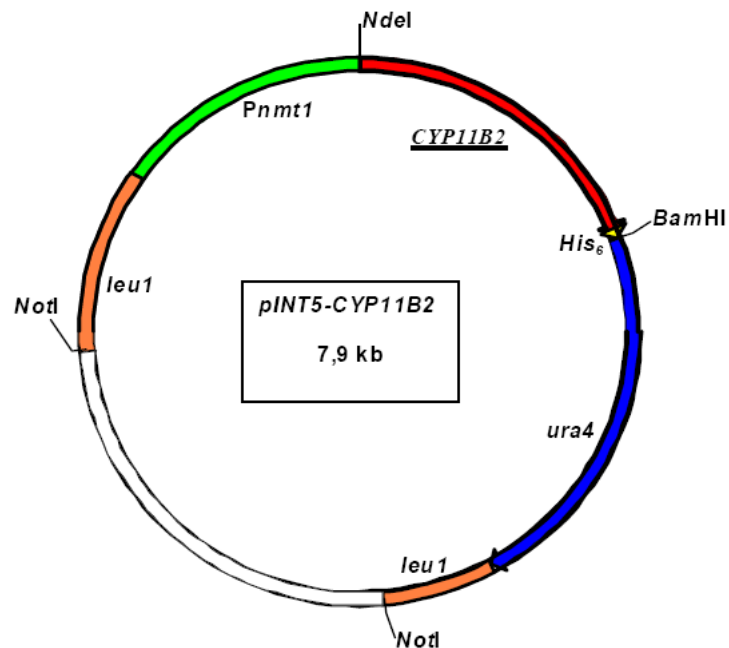


Abbildung 6.2: Vektorkarte des pINT5-CYP11B2 (Bureik, 2002)

**Hefekomponenten** =  $P_{nmt1}$ : *nmt1*-Promotor; 6xHis: Polyhistidin-tag; *ura4*: Selektionsmarkergen; *leu1*: Genfragmente des *leu1*-Gens

***E. coli*-Komponenten** = Ampicillin: Resistenzgen; pUC ori: Replikationsursprung

# 7 Danksagung

Diese Arbeit ist meinen lieben Eltern und Geschwistern gewidmet, ohne deren stete Unterstützung und Glauben an mich ich diesen Weg nicht hätte gehen können.

Ein sehr herzlicher Dank geht an Frau Prof. Dr. Rita Bernhardt für die Möglichkeit zur Promotion an ihrem Institut. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Unterstützung und den steten Ansporn. Sie unterstützte mich bei der Erforschung und Bearbeitung des Themas durch ihr Interesse und ihre Diskussionsbereitschaft. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen danke ich Ihr herzlichst.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. S. Wudy für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke Prof. Norio Kagawa für die Optimierung der HPLC-Bedingungen.

Herrn Dr. Tarek Hakki danke ich für die Einweisung in die Hefe-spezifischen Methoden und für die Unterstützung bei der Veröffentlichung der erzielten Ergebnisse.

Herrn Dr. Frank Hannemann danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und das abschließende Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein Dankeschön geht an Dr. Kerstin Maria Ewen. Herzlichen Dank auch für deine motivierenden Worte in den letzten Wochen und Dein Engagement beim Korrekturlesen der Arbeit. Ich danke ihr für die Einführung in die Welt des Musicals.

Ein besonderer Dank geht an Antje Eiden-Plach, Sibylle Jungbluth und Katrin Neumann. Vielen Dank für eure Freundschaft und eure motivierenden Worten. Ihr habt nicht nur meinen Laboralltag begleitet, sondern mich auch in schwierigen Momenten aufgebaut und unterstützt. Herzlichen Dank.

Meinen Laborkollegen Michael Ringle, Michael Kleser und Jens Neunzig danke ich für die tolle gemeinsame Zeit. Ich danke euch für die interessanten Unterhaltungen und die lustigen und für mich besonderen Momente.

Ich freue mich sehr, in meinem letzten praktischen Jahr Jens als Labornachbar kennengelernt zu

haben. Ich danke ihm für die wissenschaftliche Diskussionen und die heiteren Gespräche/Momente im Laboralltag. Auch seine Versuche, mich in einigen Punkten abzuhärten, weiß ich zu schätzen. Wir haben viel zusammen gelacht und dafür danke ich Dir.

Michael Ringle danke ich für seine Hilfe bei Problemen mit der HPLC, seine Geduld bei Fragen zur Chemie und der enormen Hilfe bei der Darstellung des 18OHB-Syntheseweges in meiner Arbeit. Ich schätze unsere freundschaftliche Beziehung und ich werde deine bildhaften Erzählungen, die ich immer sehr genossen habe, sehr vermissen.

Daniela Rauf und Sabrina Bleif danke ich für die wunderbare Freundschaft. Beiden Kolleginnen danke ich für die ehrlichen Gespräche, die motivierende Worte und schöne gemeinsame Zeit.

Frau Katharina Bompais, Frau Gabi Schon und Herrn Wolfgang Reinle danke ich für die vielen Ratschläge und für die unterhaltsamen Gespräche.

Britta Wilzewski danke ich für ihre Motivation und Diskussionsbereitschaft, insbesondere während dem Verfassen dieser Arbeit.

Dr. Thoa Kim Nguyen und Dr. Yogan Kathri danke ich für die schöne gemeinsame Zeit. Thoa danke ich insbesondere für die schönen persönlichen Unterhaltungen.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Berna Ehlig und Dr. Anja Berwanger. Beiden danke ich für ihren Rückhalt. Berna danke ich für die Freundschaft, der schönen gemeinsamen Zeit an der Uni und der Unterstützung während der Promotionszeit.

Allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für das angenehme Arbeitsklima. Elisa Brill danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit und ihre aufmunternden Worte während dem Schreiben.

Meinen Schwiegereltern sowie meiner Schwester und meinem Schwager Ming Lai & Frank Heykes danke ich für ihre motivierenden Worte und das Vertrauen in meine Person. Ich danke euch allen von Herzen!

Zu guter Letzt danke ich Michael für sein Vertrauen und Geduld. Ich danke meinem Mann für seine tatkräftige Unterstützung während der gesamten Promotionszeit. Er hat mich in schwierigen Phasen ohne Anstalten ertragen und immer wieder aufgemuntert–Danke!