

**Cortisolproduktion in *Schizosaccharomyces pombe*:
eine Analyse verschiedener Varianten
des CYP11B1 Enzyms**

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

von

Silvia Zearo

Saarbrücken
2006

meinem Mann und bestem Freund Markus

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

Zusammenfassung (deutsch)..... - 1 -

Summary (english)..... - 3 -

1 Einleitung.....- 5 -

1.1 Adrenale Steroidhormone.....- 5 -

1.1.1 Physiologische Aspekte.....- 5 -

1.1.2 Historische und pharmakologische Aspekte- 7 -

1.1.3 Steroidhormonbiosynthese- 8 -

1.1.4 Klinische Bedeutung der adrenalen Steroidhormone.....- 11 -

1.2 Die Proteinfamilie der Cytochrome P450.....- 12 -

1.2.1 Allgemeines.....- 12 -

1.2.2 Einteilung der Cytochrome P450- 14 -

1.2.3 Dreidimensionale Struktur der Cytochrome P450- 15 -

1.3 CYP11B1 und CYP11B2.....- 16 -

1.3.1 Allgemeines.....- 16 -

1.3.2 Adrenodoxin Reduktase (AdR), Adrenodoxin (Adx) und *etp1*- 20 -

1.3.3 Regulation der CYP11B1- und CYP11B2-Expression.....- 22 -

1.4 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*).....- 23 -

1.5 Zielsetzung der Arbeit.....- 26 -

2 Material und Methoden.....- 28 -

2.1 Material.....- 28 -

2.1.1	Nährmedien	- 28 -
2.1.2	Plasmide.....	- 30 -
2.1.3	Oligonukleotide.....	- 31 -
2.1.4	Mikroorganismen.....	- 34 -
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	- 35 -
2.2.1	Amplifikation der CYP11B cDNAs mittels PCR.....	- 35 -
2.2.2	pNMT1-TOPO Klonierung	- 36 -
2.2.3	Gerichtete Mutagenese des Plasmides pCAD1.....	- 37 -
2.2.4	DNA Sequenzierung.....	- 38 -
2.3	Mikrobiologische Methoden.....	- 38 -
2.3.1	Herstellung chemisch-kompetenter Zellen (<i>E. coli</i>).....	- 38 -
2.3.2	Transformation von <i>E. coli</i>	- 39 -
2.3.3	Transformation von <i>S. pombe</i>	- 39 -
2.4	Biochemische Methoden.....	- 40 -
2.4.1	Protein Extraktion aus ganzen Hefezellen.....	- 40 -
2.4.2	Protein Quantifizierung.....	- 40 -
2.4.3	Protein Fällung	- 41 -
2.4.4	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese	- 41 -
2.4.5	Nachweis der Proteine mittels Western Blotting und Antikörpern.....	- 42 -
2.4.6	Aktivitätstest	- 43 -
2.4.7	Steroidextraktion und Probenvorbereitung für die HPLC Analytik	- 44 -
2.4.8	Steroidextraktion und Probenvorbereitung für die DC Analytik	- 46 -
2.4.9	Auswertung und Quantifizierung der HPLC Analytik.....	- 47 -
2.4.10	Auswertung und Quantifizierung der DC Analytik.....	- 48 -
2.5	Bioinformatischen Methoden.....	- 49 -
2.5.1	Computergestützte Sequenzanalyse.....	- 49 -
2.5.2	Darstellung des Modells.....	- 50 -
3	Ergebnisse.....	- 51 -

3.1...Gerichtete Mutagenese und Klonierung von pCAD1 Mutanten.....	51 -
3.2.. Klonierung von CYP11B in pNMT1-TOPO.....	57 -
3.3...Generierung der pCAD1- und pNMT1-TOPO Stämme.....	62 -
3.4.. Optimierung des Aktivitätstests.....	64 -
3.4.1 Vergleich zwischen HPLC und DC	64 -
3.4.2 Optimierung der HPLC Bedingungen	69 -
3.5.. Proteinexpression in <i>S. pombe</i>	72 -
3.5.1 Expressionsnachweis von pCAD1 Mutanten.....	72 -
3.5.2 Expressionsnachweis von pNMT1-TOPO CYP11B.....	75 -
3.6...Aktivitätstest in <i>S. pombe</i>	79 -
3.6.1 Aktivitätstest der pCAD1 Mutanten	79 -
3.6.2 Aktivitätstest der pNMT1-TOPO CYP11B.....	85 -
3.6.3 Aktivitätstest der Stämme SZ1A und SZ1B.....	87 -
3.7... Alignment.....	89 -
4 Diskussion und Ausblick.....	95 -
4.1 <i>S. pombe</i> als System für die Expression und Analyse der CYP11B Proteine.....	97 -
4.2 Die CYP11B1 Varianten.....	102 -
4.2.1 CYP11B1 Varianten mit niedrigerer Aktivität.....	103 -
4.2.2 CYP11B1 Varianten mit vergleichbarer Aktivität.....	108 -
4.2.3 CYP11B1 Varianten mit erhöhter Aktivität	111 -
4.3 Wissen wir jetzt mehr über CYP11B1?.....	116 -
Literaturverzeichnis.....	121 -

Abbildungsverzeichnis	- 134 -
Tabellenverzeichnis	- 138 -
Anhang	- 140-
Nukleotidsequenzen der verschiedenen CYP11B	- 140-
Liste aller erzeugten Plasmiden	- 143-
Eigene Veröffentlichungen	-145-
Posterbeiträge	-145-
Danksagung	-146-

Abkürzungen

aa: Aminosäure

Ala (A): Alanin

Arg (R): Arginin

Asn (N): Asparagin

Asp (D): Aspartat

Cys (C): Cystein

Gln (Q): Glutamin

Glu (E): Glutamat

Gly (G): Glycin

His (H): Histidin

Ile (I): Isoleucin

Leu (L): Leucin

Lys (K): Lysin

Met (M): Methionin

Phe (F): Phenylalanin

Pro (P): Prolin

Ser (S): Serin

Thr (T): Threonin

Trp (Try, W): Tryptophan

Tyr (Y): Tyrosin

Val (V): Valin

CYP11B: Cytochrome P450, Familie XI B

hsCYP11B1 (hsB1): *Homo sapiens* CYP11B, Isoenzym 1

hsCYP11B2 (hsB2): *Homo sapiens* CYP11B, Isoenzym 2

hsCYP11B2^{P112IE147D} (hsB2m): *Homo sapiens* CYP11B, Isoenzym 2, P112 mutiert in I, E147 mutiert in D

phCYP11B1 (phB1): *Papio hamadryas* CYP11B, Isoenzym 1

btCYP11B1 (btB1): *Bos taurus* CYP11B, Isoenzym 1

rnCYP11B1 (rnB1): *Rattus norvegicus* CYP11B, Isoenzym 1

cpCYP11B1 (cpB1): *Cavia porcellus* CYP11B, Isoenzym 1

cpCYP11B2 (cpB2): *Cavia porcellus* CYP11B, Isoenzym 2

AA/Bis:	Acrylamid/Bisacrylamid
Abb.:	Abbildung
ACN:	Acetonitril, Ethannitril
ACTH:	Adrenocorticotropes Hormon
AGS:	adrenogenitales Syndrom (auch CAH)
ANGII:	Angiotensin II
APS:	Ammoniumpersulfat
BCA:	Bicinchoninsäure
bp:	base pair, Basenpare
bzgl.:	bezüglich
bzw.:	beziehungsweise
CAH:	congenital adrenal hyperplasia (auch AGS)
cAMP:	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDS:	CoDing Sequence, die codierende Sequenz
Ci:	Curie
CMO:	corticosterone methyl oxidase, eine ältere Bezeichnung für CYP11B2
CRH:	corticotropin releasing hormon
Da:	Dalton
DC:	Dünnschichtchromatographie
dest.H ₂ O:	destilliertes Wasser
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonucleinsäure
DOC:	11-Desoxycorticosterone, 21-Hydroxypregn-4-ene-3,20-dione
DTE:	1,4-Dithioerythritol
DTT:	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR:	electronic paramagnetic resonance (Elektronen Paramagnetische Resonanz)
ET:	Elektronentransfer
F:	Cortisol, 11 β , 17 α , 21-Trihydroxypregn-4-ene-3,20-dione
FAD:	Flavinadenindinucleotid
<i>g</i> :	Erdbeschleunigung (9,8m*s ⁻²)

GSH:	Glucocorticoid suppressierbarer Hyperaldosteronismus
h:	Stunden
HK:	Hauptkultur
HPLC:	high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LiAc:	Lithiumacetat
LT:	Puffer für das Trenngel
<i>m</i> :	Masse
MetOH:	Methanol
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
min:	Minuten
NADPH:	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NB:	Nährbouillon
NC:	Nitrozellulose
Nr.:	Nummer
PCR:	polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
pH:	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PKC:	Proteinkinase C
PMSF:	Benzylsulfonylfluorid, Phenylmethansulfonylfluorid
R ² :	Korrelationskoeffizient
RSS:	11-Desoxycortisol, 17 α ,21-Dihydroxypregn-4-ene-3,20-dione
RT:	Raumtemperatur
SDS:	Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE:	sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
sec.:	second, Sekunde
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Bäckerhefe
<i>S. pombe</i> :	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , Spaltheife
STH:	Somatotropes Hormon, Wachstumshormon
Tab.:	Tabelle
TCA:	Trichloressigsäure
TEMED:	Tetramethylethyldiamin, <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethane-1,2-diamine

Thia:	Thiamin
Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 2-amino-2(hydroxymethyl)propane-1,3-diol
TSH:	thyroid stimulating hormone, Thyreoidea-stimulierendes Hormon
U:	Unit, diejenige Enzymmenge, die unter Standardbedingungen (Herstellerbedingungen) je min ein μmol Substrat umsetzt
u.a.:	unter anderem
ü.N.:	über Nacht
U/min:	Umdrehungen pro Minute
UT:	Puffer für das Sammelgel
UV/Vis:	ultraviolet/visible, ultraviolettes/sichtbares Licht
V:	Volumen
VK:	Vorkultur
wt:	<i>wild type</i> , Wildtyp
z.B.:	zum Beispiel

Zusammenfassung

Cortisol und Aldosteron, gehören zu den Corticosteroiden und werden in der Nebennierenrinde über eine komplexe Kaskade, an der verschiedene Cytochrome P450 (CYP) beteiligt sind, synthetisiert. Cytochrome P450 sind externe Monooxygenasen und können molekularen Sauerstoff in ihre Substrate einbauen. Beim Menschen werden die finalen Schritte der Cortisol- und Aldosteronsynthese durch CYP11B1 und CYP11B2 katalysiert. CYP11B1 katalysiert die 11 β -Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol (RSS) zu Cortisol. CYP11B2 dagegen katalysiert erst die 11 β -Hydroxylierung von 11-Desoxycorticosteron (DOC) zu Corticosteron, dann die 18 β -Hydroxylierung zu 18-Hydroxycorticosteron und schlussendlich die 18-Oxidation zu Aldosteron. Aufgrund der mannigfaltigen physiologischen Aufgaben des Cortisols bei der Gluconeogenese, dem Fettabbau, dem Flüssigkeits- und Mineralstoffhaushalt sowie der Immunantwort, ist die Regulation seiner Synthese auf molekularer Ebene von großem wissenschaftlichem Interesse. Darüber hinaus besteht aufgrund des hohen Bedarfs in der Medizin die Notwendigkeit, Cortisol schnell und kostengünstig zu produzieren. Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die enzymatische Cortisolproduktion durch die Entwicklung einer oder mehrerer gentechnisch veränderter Varianten des CYP11B1 mit einer erhöhten enzymatischen Aktivität zu optimieren. Darüber hinaus sollten neue Erkenntnisse über die Regulation der Aktivität des CYP11B1 auf molekularer Ebene generiert werden.

Da CYP11B1 und CYP11B2 an die innere Mitochondrienmembran gebunden sind, gestaltet sich sowohl ihre Kristallisierung als auch eine weiterführende *in vitro* Analytik schwierig. Deshalb wurde mit dem Hefepilz *S. pombe* ein modernes, gut geeignetes *in vivo* System für die Umsetzung des geplanten Vorhabens eingesetzt. Außerdem besitzt *S. pombe* mit dem electron transport protein 1 (*etp1*) ein Protein, dessen C-Terminus dem natürlichen Redoxpartner des CYP11B1, Adrenodoxin (Adx), in Struktur und Funktionalität sehr ähnlich ist. Um die Auswirkungen mehrerer natürlicher und artifizieller Enzyme auf die Cortisolsynthese zu untersuchen, wurden eine Reihe von verschiedenen CYP11B enthaltenden Plasmiden generiert. Dabei wurden zum einen durch ortsgerichtete Mutagenese in funktionell relevanten Strukturdomänen diverse Mutanten des humanen CYP11B1 im pCAD1 Plasmid generiert. Die Auswahl potentiell interessanter Positionen in der Aminosäuresequenz erfolgte auf der Basis von Erkenntnissen über bereits bekannte Mutationen sowie von Computer-gestützten Modellen des Enzyms. Zum anderen wurden

CYP11B cDNAs aus Mensch, Affe, Rind, Ratte und Meerschweinchen amplifiziert und in den pNMT1-TOPO Vektor kloniert. Mit diesen Plasmiden wurden Hefe Zellen transformiert und neue *S. pombe* Stämme generiert. In den so erzeugten Hefestämmen wurde dann die Proteinexpression mittels Western Blot und die enzymatische Aktivität durch den Umsatz des Substrates RSS zu Cortisol gemessen. Der Nachweis der Cortisolsynthese erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).

Mittels Western Blot konnte die erfolgreiche Expression der entsprechenden CYP11B Varianten in allen generierten Stämmen nachgewiesen werden. Die Enzyme der ortsgerichteten Mutagenese wurden in verschiedene Gruppen eingeteilt, die wichtige strukturelle Regionen für den katalytischen Prozess widerspiegeln. Keine der Varianten mit einer Modifikation im aktiven Zentrum zeigte eine Aktivitätssteigerung. Mutationen im Bereich der Interaktionsstelle mit dem Redoxpartner führten zu inhomogenen Veränderungen der katalytischen Aktivität. Einige Mutanten verloren vollständig ihre enzymatische Aktivität, während bei anderen entweder eine Reduktion oder eine leichte Erhöhung der enzymatischen Aktivität nachweisbar war. Die höchste Aktivität von den durch gerichtete Mutagenese erzeugten Varianten konnte bei den Stämmen SZ1 und SZ78 beobachtet werden. Diese Stämme exprimieren die Enzyme CYP11B1^{M52LV78I} und CYP11B1^{V78I}, welche eine 3,5- bzw. 3fache Erhöhung der Aktivität im Vergleich zum Referenz Stamm zeigten. Diese Mutationen befinden sich in der für die Erkennung und Bindung des Substrates zuständigen Region des Proteins. Die Untersuchung der verschiedenen Tierarten ergab eine deutlich gesteigerte Aktivität des Affenenzyms (Stamm PHB1). Die Aktivität war im Vergleich zum humanen Referenzstamm (HSB1) um das 6,2fache erhöht. Bei den Stämmen SZ1A (CYP11B1^{M52LV78I} mit der mitochondrialen Importsequenz des humanen CYP11B2), SZ1B (CYP11B1^{M52LV78I} mit der Importsequenz des humanen CYP11B1) und HSB2M (hsCYP11B2^{P112I147D}) lies sich ebenfalls eine leicht erhöhte Aktivität nachweisen. Das Ausmaß der Aktivitätssteigerung bewegte sich zwischen dem 1,5-3fachen von HSB1. Auch in diesen Fällen können Unterschiede im Bereich der Region der Erkennung und Bindung des Substrates als Ursache für die Aktivitätszunahme vermutet werden.

In dieser Arbeit wurden umfangreiche neue Informationen über CYP11B1 generiert, die einen tieferen Einblick in die Beziehung zwischen Struktur und Funktion dieses Enzyms ermöglichen. Insbesondere Mutationen im Bereich der Substratbindungsstelle scheinen besonders viel versprechend für die Generierung von CYP11B1 Varianten mit erhöhter Aktivität zu sein. Zukünftige Untersuchungen müssen diese Erkenntnisse bestätigen und in weiterführenden Experimenten vertiefen.

Summary

The corticosteroids cortisol and aldosterone are synthesized in the adrenal cortex by a complex reaction cascade, catalyzed by several cytochromes P450 (CYP). CYPs belong to the external monooxygenases and are able to introduce molecular oxygen into their substrates. In humans the final steps of the cortisol and aldosterone synthesis are catalyzed by CYP11B1 and CYP11B2. CYP11B1 is responsible for the conversion of 11-desoxycortisol (RSS) into cortisol. CYP11B2 promotes the 11 β -hydroxylation of 11-desoxycorticosterone (DOC) into corticosterone followed by an 18 β -hydroxylation leading to the formation of 18-hydroxycorticosterone and finally after an oxidation at position 18 into aldosterone. Due to the involvement of cortisol in many physiological processes, e.g. gluconeogenesis, lipid metabolism, liquid and mineral homeostasis, and immunosuppression, the regulation of Cortisol synthesis on molecular level is of particular scientific interest. Moreover, modern medicine requires a growing amount of cortisol every day. Consequently, a cost efficient production of large amounts of cortisol is necessary. The aim of the present study was the development of CYP11B1 mutants with an increased enzymatic activity. In addition, this work should provide new insights in the regulation of CYP11B1 activity on a molecular level.

Since CYP11B1 and CYP11B2 are bound to the inner membrane of the mitochondria, the crystallization and *in vitro* analysis of these two enzymes is difficult. Consequently the bear *S. pombe* was chosen as a suitable *in vivo* system for this investigation. *S. pombe* contains the electron transport protein 1 (*etp1_{fd}*) with a C-Terminus, that shares many structural and functional similarities with the genuin redox partner of CYP11B1 adrenodoxin (Adx). To analyze the consequences of many natural and artificial mutations of CYP11B1 on cortisol synthesis several CYP11B containing plasmids were created. On the one side, a group of mutations were generated by modifying different functionally structure domains of human CYP11B1. Interesting residues for site directed mutagenesis were selected on the base of known mutations and computer models of the enzyme and introduced into the pCAD1-vector. On the other, side human, avian, bovine, rat and guinea pig CYP11B cDNA was amplified and cloned into the pNMT1-TOPO vector. With the generated plasmids were transformed bear cells and were created new *S. pombe* strains. In all transformed *S. pombe* strains CYP11B protein expression was analyzed by Western blotting. The enzymatic activity

was tested by following the conversion of RSS into cortisol. The amount of cortisol was quantified by high performance liquid chromatographie (HPLC).

Western blotting demonstrated CYP11B protein expression in all created strains. Enzymes from the site specific mutagenesis were classified according to the location of mutations in various functionally structure domains. None of the strains with a mutation in the active core exhibited an increased enzymatic activity. Modifications within the redox partner binding domain caused inhomogeneous effects on the catalytic process. Some mutants showed a complete loss of activity. Others had a reduced or slightly increased activity. Among the strains of site directed mutagenesis, the highest enzymatic activity was observed in the strains SZ1 and SZ78 expressing CYP11B1^{M52LV78I} and CYP11B1^{V78I}. CYP11B1^{M52LV78I} exhibited a 3.5-fold and CYP11B1^{V78I} a 3-fold increase of cortisol synthesis compared to the protein in the reference strain. Both mutations are located in the substrate binding domain of the protein. The analysis of CYP11B enzymes from various species revealed a strongly elevated activity of the avian enzyme (strain PHB1). Compared to the human reference strain (HSB1) PHB1 had a 6.2 fold higher activity. The strains SZ1A (CYP11B1^{M52LV78I} with the mitochondrial import sequence of human CYP11B2), SZ1B (CYP11B1^{M52LV78I} with the mitochondrial import sequence of human CYP11B1) and HSB2M (hsCYP11B2^{P112IE147D}) exhibited also an elevated activity. The magnitude of this elevation ranged from 1,5 to 3fold compared to HSB1. Compared to HSB1, these strains exhibit differences in the substrate binding domain, which could be a suitable explanation of the elevated activity.

The present study provides new information about the relation between structure and function of CYP11B1. Mutations in the substrate binding domain seem to be most promising to induce an increased enzymatic activity. Future studies have to confirm these findings.

1 Einleitung

1.1 Adrenale Steroidhormone

1.1.1 Physiologische Aspekte

Corticosteroide gehören zu den Steroidhormonen, die in der Nebennierenrinde, dem adrenalen Kortex, gebildet werden. Die wichtigsten Vertreter sind Aldosteron und Cortisol. Beim Menschen beträgt die tägliche Sekretionsrate von Cortisol 15-40mg und die von Aldosteron 50-250 μ g (Siegenthaler *et al.*, 2006). Darüber hinaus werden in der Nebennierenrinde auch Sexualhormone (Androgene) gebildet, die ebenfalls zu den Corticosteroiden gehören. Steroidhormone bilden eine von insgesamt vier Hormonklassen, zu denen neben den Steroidhormonen die Peptid- (z.B. adrenocorticotropes Hormon [ACTH], Wachstumshormon [STH]) und Glykoproteinhormone (z.B. Gonadotropine und thyroideastimulierendes Hormon [TSH]) sowie die vom Tyrosin abgeleitete Hormone (z.B. Katecholamine, Thyroxin) gehören.

Eine besondere Stellung in der Gruppe der Corticosteroide kommt dem Cortisol zu, da es vielfältige regulatorische Wirkungen besitzt. So stimuliert es die Gluconeogenese aus Aminosäuren und Intermediärprodukten (Lactat, Pyruvat, Glycin), und wirkt damit der blutzuckersenkenden Insulinreaktion entgegen (Siegenthaler *et al.*, 2006), (Petrides, 1990). Des Weiteren stimuliert es den Fettabbau in peripherem Gewebe, was zu einer Hyperlipidämie und einer Umverteilung des Fettes in den Körperstamm sowie die Leber führt. Eine der wichtigsten physiologischen Eigenschaften des Cortisols ist dessen antiinflammatorisches- und antiproliferatives Potential. Bei einer ständigen erhöhten Cortisolexposition kommt es z.B. zu einer Verringerung der Lymphozytenzahl, was zu einer gesteigerten Infektanfälligkeit führt, andererseits aber auch antiallergisch wirkt (Neumann und Schenck, 1990). Die Proliferationshemmung hat u.a. eine verzögerte Wundheilung und Geweberegeneration zur Folge. Neben den bisher genannten Charakteristika des Cortisols besitzt es auch regulatorische Funktionen in der Kalzium-, Natrium- und Kaliumhomöostase (mineralocorticoide Wirkung). Da Cortisol im Rahmen von Stressreaktionen vermehrt ausgeschüttet wird, um den Körper optimal auf die besonderen Anforderungen dieser Situation vorzubereiten, wird es auch als Stresshormon bezeichnet (Neumann und Schenck, 1990).

Während Cortisol aufgrund seiner regulatorischen Funktion im Glucose-Stoffwechsel auch als Glucocorticoid bezeichnet wird, ordnet man das Aldosteron den Mineralocorticoiden zu. Die Mineralocorticoide besitzen diesen Namen aufgrund ihrer zentralen Funktionen im Mineral-, Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt. Die Hauptaufgabe des Aldosterons ist die Reabsorption von Natrium und Wasser aus den distalen Nierentubuli (Siegenthaler *et al.*, 2006). Im Gegenzug wird Kalium sezerniert und über den Urin ausgeschieden. Aufgrund dessen ist Aldosteron eng mit der Regulation des Blutdruckes sowie der Natrium- und Kalium-Konzentrationen in der Zirkulation gekoppelt. Ein Flüssigkeits- oder Elektrolytmangel induziert in den juxtaglomerulären Zellen der Nierenglomeruli die Sekretion von Renin in die Zirkulation, wo es das inaktive Prohormon Angiotensinogen in das ebenfalls inaktive Angiotensin I spaltet. Bei der anschließenden Spaltung des Angiotensin I durch das angiotensin converting enzym (ACE) wird aktives Angiotensin II (ANGII) gebildet, das zu einer Vasokonstriktion und Erhöhung des Blutdruckes führt (Herold, 2002). Andererseits stimuliert es die adrenale Aldosteronsynthese und -sekretion. Corticosteroide sind lipophil und hydrophob. Deshalb gelangen sie durch erleichterte Diffusion ins Zytoplasma und binden dort an entsprechende Rezeptoren (Siegenthaler *et al.*, 2006). Der Komplex aus Steroidhormon und Rezeptor wird dann in den Zellkern transloziert, wo er mit hoher Affinität an regulatorische Gensequenzen bindet (Beato *et al.*, 1996), (Beato und Klug, 2000), die den vom jeweiligen Rezeptor kontrollierten Proteinen vorgeschaltet sind. Dadurch wird die Expression der für die Steroidhormonwirkung charakteristischen Proteine beeinflusst. Man spricht hier vom genomischen Effekt. Neben genomischen Steroidwirkungen konnte gezeigt werden, dass auch nichtgenomische Effekte existieren, (Losel *et al.*, 2004), (Funder, 2005), (Böhmer *et al.*, 2006). In diesem Fall entfalten die Steroide ihre Wirkung wahrscheinlich über Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Der Steroid-Rezeptor-Komplex vermittelt seine Wirkung direkt durch die Aktivierung konventioneller sekundärer Messenger-Kaskaden wie u.a. die Erhöhung des freien intrazellulären Kalziums (de Boland und Norman, 1990), (Wehling *et al.*, 1990) und der Proteinkinase C (PKC) (Sylvia *et al.*, 1993). Zusätzlich können auch klassische nukleäre Rezeptoren als Transkriptionsfaktoren nichtgenomische Steroideffekte fungieren (Funder, 2005).

Aufgrund der vielfältigen physiologischen Aufgaben ist Cortisol von besonderem pharmazeutischem Interesse und wird häufig zur Behandlung von Erkrankungen, wie z.B. akuten (z.B. Arzneimittelunverträglichkeiten) und chronisch entzündlichen (z.B. Morbus Crohn und rheumatoide Arthritis) sowie allergischen Erkrankungen (atopische Dermatitis) eingesetzt (Herold, 2002), (Kaiser, 2002). In chemisch modifizierter Form findet es sich in zahlreichen pharmakologischen Applikationsformen, wie z.B. Tabletten, Injektionslösungen,

Cremes und Dosieraerosolen. Deshalb ist die Verfügbarkeit von Glucocorticosteroiden in ausreichender Menge und zu günstigen Preisen von hoher sozioökonomischer Bedeutung. Bei einigen Erkrankungen, die mit einer reduzierten Mineralocorticoidsynthese einhergehen, kommt auch Aldosteron zum Einsatz (Herold, 2002), (Mühl und Pfeilschifter, 2003).

1.1.2 Historische und pharmakologische Aspekte

Obwohl fast alle endokrinen Organe den Medizinern der Antike bekannt waren, finden sich die Nebennieren in den anatomischen Atlanten von dem 1564 verstorbenen Andreas Vesalius noch nicht. Erstmals dargestellt wurden die Nebennieren von Bartholomaeus Eustachius im 16. Jahrhundert (Bartolomeo, 1563). Thomas Addison beschrieb 1855 die nach ihm später benannte Krankheit (Morbus Addison), die durch eine Unterfunktion der Nebennierenrinde gekennzeichnet ist (Addison, 1855). Seine Patienten verstarben an der Zerstörung der Nebenniere. Die anatomische Feinheit, dass das Organ aus zwei Teilen (Nebennierenrinde und -mark) besteht, entdeckte 1852 Rudolf Koelliker (Kölliker, 1852). Arthur Biedel beschrieb Anfang des 20. Jahrhunderts die vitale Bedeutung der Rinde (Mühl und Pfeilschifter, 2003). Obwohl Ende des 19. Jahrhundert erstmals Adrenalin aus dem Nebennierenmark isoliert werden konnte, wurde 17-Hydroxy-11-dehydro-Corticosteron, das Cortison, erst 1936 von Kendall entdeckt (Kendall, 1950). Er bemühte sich um die Gewinnung von pharmakologisch verwendbaren Mengen des Cortisons. Vor der synthetischen Herstellung im Labor waren zur Gewinnung von 1g Cortison die Nebennieren von 20.000 Rindern nötig. Damit wäre der heutige Bedarf nicht einmal annähernd zu decken. Ein Meilenstein in der Medizingeschichte war deshalb die Synthese des Desoxycorticosterons aus Cholesterol durch Reichstein 1938 (Reichstein, 1950). Die erste therapeutische Anwendung fand 1948 an der Mayo Klinik bei einer Patientin mit chronischer Polyarthrit, durch Philip Hench statt (Hench, 1950). Die drei letzt genannten Forscher erhielten 1950 für ihre Arbeiten den Nobelpreis (Mühl und Pfeilschifter, 2003) (http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2001/index.html).

In der modernen Medizin werden Corticosteroide häufig therapeutisch eingesetzt (Kaiser, 2002). Mineralocorticoide, wie z.B. Aldosteron, kommen bei der Behandlung der Nebenniereninsuffizienz (Morbus Addison) zum Einsatz (Herold, 2002). Glucocorticoide werden ebenfalls bei der Therapie des Morbus Addison eingesetzt. Weitaus häufiger macht man sich jedoch ihre antiinflammatorische, antiallergische und immunsuppressive Wirkung zu Nutze. Da viele akute und chronische Erkrankungen durch eine Dysregulation des Immunsystems verursacht sind, besitzen Glucocorticoide einen ausgesprochen breiten

Einsatzbereich und gehören zu den am häufigsten eingesetzten Medikamenten überhaupt (Kaiser, 2002). Androgene, wie sie im adrenalen Kortex synthetisiert werden, finden ebenfalls therapeutische Verwendung. Bei Männern dienen sie zur Behandlung der Hodeninsuffizienz, Impotenz und Oligospermie. Bei der Frau setzt man Androgene zur Steigerung der Libido und zur Therapie des metastasierenden Mammakarzinoms ein. Darüber hinaus kommen Androgene als Anabolika bei der Behandlung von konsumierenden Erkrankungen (z.B.: Tumoren) und zur verbotenen Leistungssteigerung im Sport zum Einsatz (Neumann und Schenck, 1990).

1.1.3 Steroidhormonbiosynthese

Da der Körper Steroidhormone nicht speichern kann, ist bei Bedarf jedes Mal eine Neusynthese erforderlich. Die Ausgangssubstanz ist dabei immer das Cholesterol. Dieses wird in den Zellen entweder *de novo* synthetisiert oder als Cholesterylester von Lipoproteinpartikeln aus dem Kreislauf entnommen. Die Synthese aller Steroidhormone (Glucocorticoide, Mineralocorticoide und Sexualhormone) läuft über eine komplexe Kaskade biochemischer Reaktionen, die durch verschiedene Enzyme, so genannte Cytochrome P450 (Abschnitt 1.2), katalysiert werden und in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert sind (Abb. 1.1).

Die Synthese der Steroidhormone beginnt mit der Abspaltung der Seitenkette des Cholesterols zu Pregnenolon durch CYP11A1 (P450_{ssc}) an der inneren Mitochondrienmembran. Die Umwandlung von Cholesterol in Pregnenolon erfordert insgesamt drei oxidative Schritte: die Hydroxylierungen in den Positionen 22R und 20R sowie die Spaltung der C₂₀-C₂₂ Bindung. Das Produkt Pregnenolon gelangt anschließend in das endoplasmatische Retikulum (ER). Zwei unterschiedliche Enzyme, die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3-HSD) und die 17 α -Hydroxylase (CYP17), katalysieren die Reaktionen, die Pregnenolon in Progesteron, in 17 α -Hydroxyprogesteron oder 17 α -Hydroxypregnenolon umwandeln. In den Gonaden wiederum ermöglichen diese beiden Enzyme die Produktion von Androstendion. Aus diesem werden Testosteron, der bekannteste Vertreter der männlichen Sexualhormone, und Estradiol, das primäre weibliche Sexualhormon, produziert. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich der Sexualhormone sind vornehmlich quantitativer und nicht qualitativer Natur. Im weiteren Verlauf der adrenalen Steroidhormonsynthese werden Progesteron und 17 α -Hydroxyprogesteron durch die 21-Hydroxylase (CYP21) in 11-Desoxycorticosteron (DOC) bzw. 11-Desoxycortisol (RSS) umgewandelt. Sowohl DOC als auch RSS werden nun erneut

in die Mitochondrien transferiert und dort über zwei unterschiedliche Wege, katalysiert von CYP11B2 bzw. CYP11B1, in Aldosteron, das wichtigste Mineralocorticoid, bzw. Cortisol, das wichtigste Glucocorticoid, umgewandelt.

Die Verteilung der einzelnen Syntheseschritte auf diverse Zellkompartimente sorgt als wichtiges Stoffwechselregulationsprinzip dafür, dass es nicht zu ungewollten Rückkopplungshemmungen oder Nebenreaktionen kommt. Vielmehr garantiert eine Synthese über mehrere Kompartimente differenzierte Regulationswege. Die Aufteilung der beiden terminalen Synthesewege für die Mineralo- bzw. Glucocorticoide auf zwei separate anatomische Areale in der Nebennierenrinde (*Zona glomerulosa* und *fasciculata*) spiegelt ebenso das Vorhandensein und die Bedeutung differenzierter Regulationswege in der Nebennierenrinde wider.

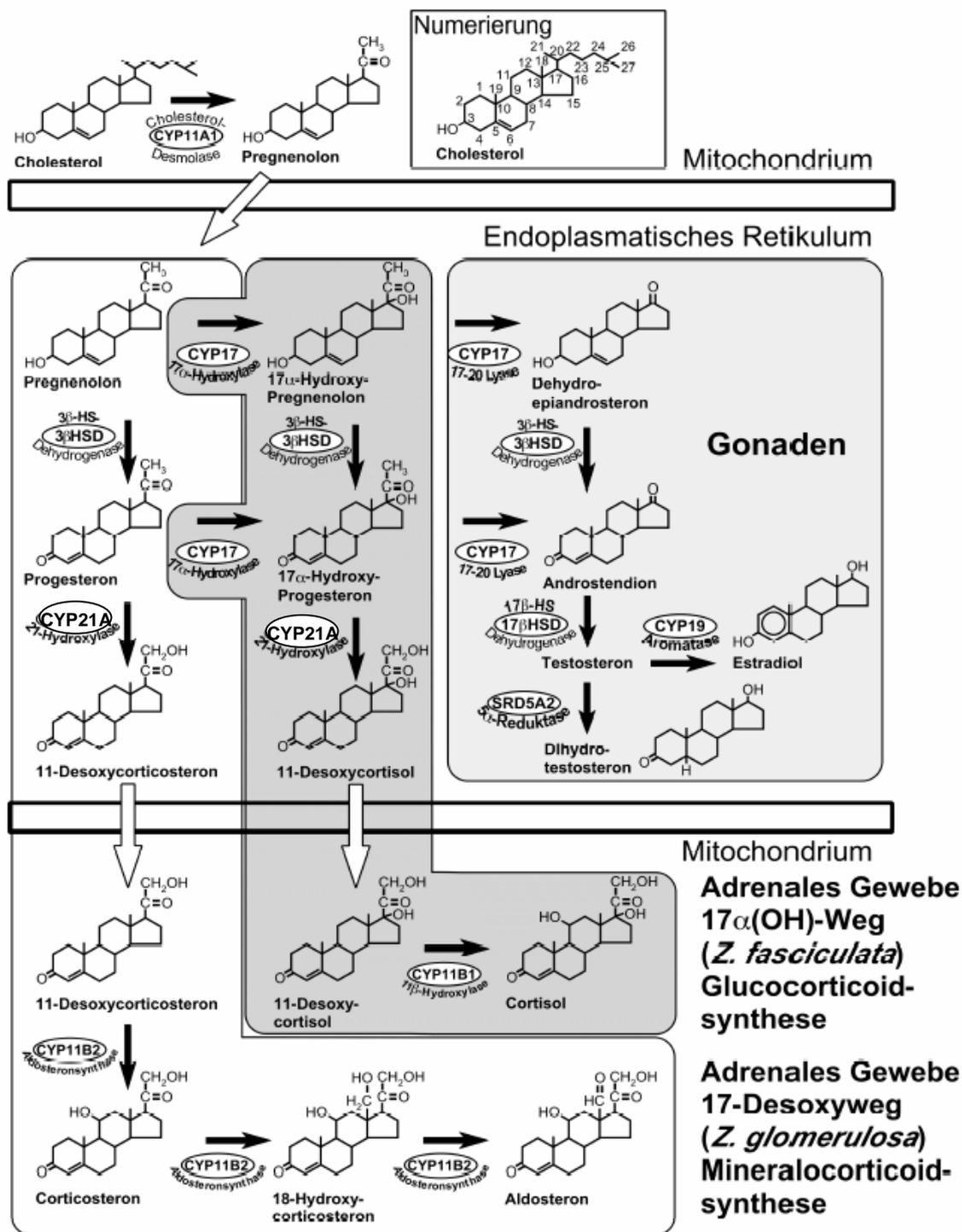


Abb. 1.1: Darstellung der Steroidhormonsynthese inklusive der Verteilung der einzelnen Schritte auf die diversen steroidogenen Zellkompartimente (Hampf, 2001)

1.1.4 Klinische Bedeutung der adrenalen Steroidhormone

Störungen in der adrenalen Steroidhormonbiosynthese sind nicht selten und verursachen verschiedene Erkrankungen. Die Symptome dieser Erkrankungen sind durch den Mangel bzw. den Überschuss der Hauptvertreter der adrenalen Steroidhormone, Aldosteron, Cortisol und Testosteron gekennzeichnet. Ein Mangel an Mineralocorticoiden führt zu Störungen im Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt. Dabei kommt es zum Verlust von Natrium und Flüssigkeit und nachfolgend zu einem Abfall des Blutdruckes. Das Fehlen von Glucocorticoiden führt hingegen mehr zu Störungen im Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsel (Siegenthaler *et al.*, 2006).

Man spricht von Nebennierenrindeninsuffizienz und -überfunktion, wenn entweder ein Mangel oder eine Überproduktion an Nebennierenrindenhormonen vorliegt. Bei der primären Nebennierenrindeninsuffizienz (Morbus Addison) handelt es sich um einen Funktionsausfall der Nebennierenrinde selbst. Dagegen ist die sekundäre Nebennierenrindeninsuffizienz Folge einer verminderten ACTH-Ausschüttung. Auch bei der Nebennierenrindenüberfunktion unterscheidet man eine primäre (meist sind Tumoren der Nebennierenrinde die Ursache) und eine sekundäre Form (Regulationsstörungen im Hypothalamus und/oder der Hypophyse). Darüber hinaus gibt es verschiedene Krankheitsbilder, die auf einen CYP21B, CYP11B1- oder CYP11B2-Mangel zurückzuführen sind (Lisurek und Bernhardt, 2004). Drei Beispiele dieser Erkrankungen sind: das adrenogenitale Syndrom (AGS), der kongenitale Hypoaldosteronismus und der Glucocorticoid-supprimierbare Hyperaldosteronismus (White, 2001).

Das AGS (auch CAH, aus dem englischen congenital adrenal hyperplasia) ist ein erblicher Defekt der Cortisolsynthese und stellt mit einer Frequenz von 1:7000 homozygoten und 1:42 heterozygoten Merkmalsträgern einen der häufigsten angeborenen Stoffwechseldefekte dar. In den meisten Fällen (90%) ist ein CYP21B-Mangel die Ursache. CYP11B1-Mängel sind mit einer Häufigkeit von 5% deutlich seltener (Herold, 2002). Biochemisch ist das AGS auf der einen Seite durch einen Mangel an Cortisol und auf der anderen Seite durch einen Exzess von Cortisolvorstufen gekennzeichnet. Darüber hinaus kommt es zu einer gesteigerten ACTH- und Reninproduktion sowie einer Nebennierenrindenhyperplasie. Durch den Substratüberschuss werden die Cortisolvorstufen zu Sexualhormonen metabolisiert, was bei Jungen u.a. einen Hyperandrogenismus sowie eine *Pubertas praecox* und bei Mädchen eine Virilisierung zur Folge hat. Je nach Art des Defektes kommt es auch zur Beeinträchtigung der Aldosteronsynthese, was einen Verlust von Mineralien und Flüssigkeit zur Folge hat (insbesondere CYP21B Defekte).

Beim Hyperaldosteronismus unterscheidet man eine primäre (Conn Syndrom) von einer sekundären Form. Der primäre Hyperaldosteronismus ist meist Folge eines Nebennierenrindenadenoms oder einer -hyperplasie. Die sekundäre Form ist durch eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem bedingt und kann verschiedene Ursachen haben.

Der Glucocorticoid-supprimierbare Hyperaldosteronismus (GSH), auch bezeichnet als Dexamethason supprimierbarer Hyperaldosteronismus (auf Englisch: glucocorticoid remediable aldosteronism [GRA]), ist eine seltene autosomal dominant vererbte Erkrankung, die durch ein Hybridgen aus CYP11B1 und CYP11B2 verursacht wird (Lifton *et al.*, 1992).

1.2 Die Proteinfamilie der Cytochrome P450

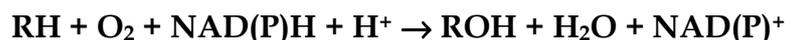
1.2.1 Allgemeines

Molekularer Sauerstoff ist ein universelles Oxidationsmittel und spielt eine komplexe Rolle in der Biologie. Seine Rolle begründet sich vornehmlich dadurch, dass die Natur eine Vielzahl von Wegen gefunden hat, mittels molekularen Sauerstoffs Moleküle in ihrer biochemischen Funktion zu verändern. Dabei werden Flavine, nicht-Häm Eisen, Kupfer und Metalloporphyrinkomplexe oft als Kofaktoren von verschiedenen Proteinen verwendet, um den molekularen Sauerstoff der Atmosphäre zu nutzen, indem sie eines oder beide Sauerstoffatome in ihre Substrate einbauen. Zu diesen Proteinen gehören u.a. die Cytochrome P450, eine durch das Vorhandensein einer Hämgruppe gekennzeichnete Multienzymfamilie, die zu den am weitesten verbreiteten Proteinfamilien überhaupt gehört. Der Name ist auf das einzigartige spektroskopische Absorptionsverhalten der Cytochrome P450 zurückzuführen. Im Jahre 1958 konnte Garfinkel in Lebermikrosomen ein Protein nachweisen, das in reduziertem, CO-gebundenem Zustand ein Absorptionsmaximum bei 450nm besitzt (Garfinkel, 1958), (Klingenberg, 1958). Normalerweise weisen Proteine mit einer eisenhaltigen Protoporphyrin IX-Gruppe ein Absorptionsspektrum bei 420nm auf (Omura und Sato, 1964). Ursächlich für dieses atypische Absorptionsverhalten ist die Substitution des 5-axialen Liganden His, wie er in anderen Protoporphyrin IX enthaltenden Proteinen vorkommt, zu Cys. Dieses einzigartige Absorptionsverhalten führte schließlich zum Namen Cytochrom P450, wobei P für Pigment steht und 450 für die Wellenlänge, bei der die Cytochrome ihr Absorptionsmaximum als CO-Komplex aufweisen.

Aufgrund der Vielfalt an Cytochromen P450 ist eine einheitliche Nomenklatur von besonderer Bedeutung. Der erste diesbezügliche Vorschlag kam 1987 von Nebert *et al.*

(Nebert *et al.*, 1987) und wurde seitdem kontinuierlich weiterentwickelt (Nebert *et al.*, 1989), (Nebert *et al.*, 1991), (Nelson *et al.*, 1993), (Nelson *et al.*, 1996). CYP steht für Cytochrom P450, die darauf folgende arabische Ziffer definiert die Genfamilie und der anschließende Buchstabe die jeweilige Unterfamilie. Die letzte Zahl bezeichnet das Enzym selbst. Definitionsgemäß weisen Mitglieder der Cytochrom P450 Proteinfamilie eine Sequenzhomologie von mindestens 40% auf. Eine Unterfamilie zeichnet sich durch eine Sequenzidentität von über 55% aus (Nebert *et al.*, 1991). Noch heute wird aber auch die alte Nomenklatur benutzt, nach der die Cytochrome P450 auch als P450xx bezeichnet werden (wobei die endständigen Buchstaben zumeist die katalysierte Reaktion näher bezeichnen). Zum Beispiel wird CYP11A1 auch als P450scc genannt, was aus dem Englischen kommt und für „side chain cleavage“ steht.

Die Cytochrome P450 sind Oxygenasen, die zur Gruppe der Oxidoreduktasen gehören. Oxygenasen katalysieren eine Reduktion von molekularem Sauerstoff. In der Untergruppe der Monooxygenasen wird nur eines der beiden Sauerstoffatome auf das Substrat übertragen während das andere Sauerstoffatom zu Wasser abreagiert. In der Untergruppe der Dioxygenasen werden beide Sauerstoffatome in das Substrat eingebaut. Ihre Reduktionsäquivalente beziehen die Cytochrome P450 in der Regel von externen Elektronendonatoren und nicht vom Substrat selbst. Deshalb werden sie auch als externe Monooxygenasen bezeichnet (Hayaishi und Nozaki, 1969). Die allgemeine von Cytochromen P450 katalysierte Reaktion lautet:



RH = organisches Substrat

ROH = hydroxyliertes Substrat (Produkt)

NAD(P)H + H⁺ = externer Elektronendonator

Cytochrome P450 wurden bisher in jeder Linie des Lebensstammbaumes („tree of life“) gefunden und stellen deshalb eine ubiquitäre Gruppe von Enzymen dar, die ein breites Spektrum von Substraten metabolisieren. Neben Hydroxylierungen katalysieren sie N-, O- und S-Desalkylierungen, Peroxidierungen, Epoxidierungen, Sulfoxidierungen, Desaminierungen, Desulfurierungen, Dehalogenierungen und die Reduktion von N-Oxiden (Ruckpaul, 1993), (Bernhardt, 1996). Neben Leber und Nebennierenrinde wurden Cytochrome P450 auch in Lungen- und Darmgewebe (Gamielien und Maritz, 2004), der Haut (Jugert *et al.*, 1994) sowie dem Gehirn (Ozaki *et al.*, 1991), (Erdmann *et al.*, 1996),

(MacKenzie *et al.*, 2000) nachgewiesen. Insgesamt konnten bisher 6051 verschiedene Cytochrom P450 Sequenzen identifiziert werden, die in 711 Familien eingeteilt sind (Stand: 18. Juli 2006, <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). Allein im Menschen werden 57 aktive Cytochrom P450 Gene postuliert (Nelson, 2006). Generell haben die Cytochrome P450 zwei wichtige Funktionen. Auf der einen Seite metabolisieren sie Xenobiotika, wie z.B. den Abbau von Schadstoffen (Wackett, 1994), oder Herbiziden und Insektiziden. Andererseits spielen sie aber auch eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von für den Körper kritischen Signalmolekülen (Omura, 1999), wie z.B. die Synthese der Steroidhormone und die Biosynthese von Vitamin D und Gallensäuren.

1.2.2 Einteilung der Cytochrome P450

Cytochrome P450 werden, je nach Elektronentransportweg in verschiedene Klassen unterteilt (Abb. 1.2). Die erste Hauptklasse wird von den mitochondrialen Cytochromen P450 gebildet, zu denen auch die meisten bakteriellen Formen gehören. Sie benötigen zusätzliche Elektrontransport Proteine. Die Elektronen werden vom NAD(P)H über eine FAD-haltige Ferredoxinreduktase zu einem löslichen Eisen-Schwefelprotein (Ferredoxin) übertragen. Durch diese Elektronentransfer (ET) Kette fließen die Elektronen am Ende auf das Cytochrom P450. Während in Bakterien alle Bestandteile des ET löslich sind, zeichnet sich die mitochondriale Form durch eine membranassoziierte Reduktase und ein membrangebundenes Cytochrom aus. Das Ferredoxin stellt die einzige lösliche Komponente der ET Kette bei der mitochondrialen Form dar (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000), (McLean *et al.*, 2005). Bei der zweiten Hauptklasse handelt es sich um membranständige Proteine, die auch als mikrosomale Cytochrome P450 bezeichnet werden. Sie erhalten ihre Elektronen von einer NADPH-abhängigen Cytochrom P450 Reduktase. Diese NADPH-abhängige Cytochrom P450 Reduktase enthält sowohl FAD als auch FMN und ist ebenfalls membrangebunden (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000), (McLean *et al.*, 2005).

In den vergangenen Jahren wurden noch andere Cytochrome P450 Systeme gefunden, die zur Einführung von weiteren selbständigen Klassen geführt haben (Hannemann *et al.*, 2006: in press). Die verschiedenen P450 Systeme unterscheiden sich insbesondere in den Komponenten, die die ET Kette formen. Es gibt Systeme, bei denen statt eines Ferredoxins ein Flavodoxin beteiligt ist (Hawkes *et al.*, 2002), (Mehareenna *et al.*, 2004). Daneben existieren auch Systeme, in denen das Cytochrom P450 und entweder das Ferredoxin (Jackson *et al.*, 2002) oder das Flavodoxin (Seth-Smith *et al.*, 2002) ein einziges Protein bilden. Das CYP5A1 (Yokoyama *et al.*, 1991) ist ein typischer Vertreter einer Klasse von Cytochrom P450

Systemen, deren Mitglieder ihre Elektronen aus dem Substrat selbst beziehen (Wang und Kulmacz, 2002). Andere Cytochrom P450 Systeme (z.B. P450nor (Park *et al.*, 1997)) zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Elektronen direkt von NADH aufnehmen können (Nakahara *et al.*, 1993), (Daiber *et al.*, 2005).

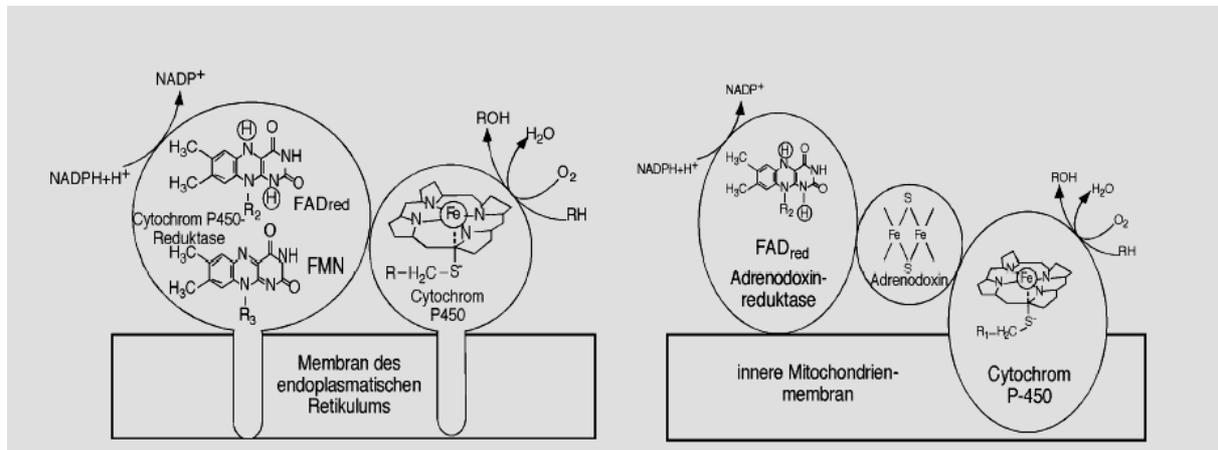


Abb. 1.2: Darstellung der zwei Hauptklassen der Cytochrom P450 Systeme. Rechts: Klasse I, links: Klasse II (Bernhardt, 1996)

1.2.3 Dreidimensionale Struktur der Cytochrome P450

Die Strukturanalyse der Cytochrome P450 ist ein kompliziertes Unterfangen, da diese aufgrund ihrer häufigen Membranbindung schwierig zu kristallisieren sind. Die erste veröffentlichte Struktur eines Cytochroms P450 war die des CYP101 (Cytochrom P450cam) im Jahr 1985 (Poulos *et al.*, 1985). Bis 2004 wurden insgesamt 21 Kristallstrukturen von Mitgliedern der Cytochrom P450 Familie aufgeklärt (Lisurek, 2005). Bei näherer Betrachtung der bisher bekannten Strukturen scheint es, dass die Cytochrome P450 eine ähnliche Faltung besitzen. Innerhalb der sekundären Struktur erkennt man einen hochgradigen konservierten Kern. Die räumliche Struktur dieses aktiven Zentrums weist hingegen starke Unterschiede auf. Darüber hinaus gibt es auch variable Regionen, die an der Substraterkennung und -bindung sowie der Bindung des Redoxpartners beteiligt sind. (Graham und Peterson, 1999), (Denisov *et al.*, 2005), (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000).

Die Kernstruktur der Cytochrome P450 ist ein Bündel aus vier Helices (Presnell und Cohen, 1989), der D-, E-, I- und L-Helix. Sie besitzen die Form eines dreieckigen Prismas mit dem Häm in der Mitte, einem β -Faltblatt- und einem α -helikalen Bereich. Die I- und L-Helices bilden die hoch konservierten Regionen. Dabei ist die I-Helix die Längste. Sie spannt sich

durch das gesamte Molekül und befindet sich direkt oberhalb des Häms. Die L-Helix ist Teil der Häm-bindenden Region. Zwischen der K-Helix und dem Anfang der L-Helix befindet sich eine hoch konservierte Schleife, die die absolut konservierte Aminosäure Cys als fünften Ligand des Häm-Eisens enthält. Die meisten konservierten Regionen sind in der Nähe des Häms und beinhalten sowohl die schon genannten D-, E-, I- und L-Helices als auch die K-Helix. Alle anderen strukturellen Elemente, wie z.B. die A-, B-, F- und G-Helices, die Abschnitte mit β -Faltblatt-Struktur und die Schleifen, sind sehr variabel. Neben dem absolut konservierten Cys findet man aber auch noch andere hoch konservierte Reste und/oder Sequenzen von Aminosäuren. Das Cys selber gehört zu einer absolut konservierten Sequenz (F-x-x-G-x-R-x-C-x-G). Ein anderes Beispiel dafür ist die Sequenz E-x-x-R in der K-Helix, die, so wie es scheint, in die Stabilisierung der Kernstruktur involviert ist. Besonders wichtig ist auch die für die Cytochrome P450 charakteristische Aminosäuresequenz (A/G)-G-x-(E/D)-T-(T/S), die sich im Zentrum der I-Helix befindet. Das hoch konservierte Thr, das sich vor einer sauren Aminosäure befindet, ist vermutlich am katalytischen Prozess beteiligt (Imai *et al.*, 1989), (Kimata *et al.*, 1995).

Im Jahr 1992 identifizierte Gotoh (Gotoh, 1992) mehrere Regionen, die in die Substraterkennung involviert sind und ordnete ihnen jeweils eine SRS (substrate recognition site) Nummer zu. Insgesamt gibt es 6 dieser SRS: die B-Helix (SRS1), Teile der F- und G-Helices (SRS2 und SRS3), ein Teil der I-Helix (SRS4), der Verbindungsabschnitt zwischen K-Helix und β 2-Faltblatt (SRS6) und im β 4-Faltblatt (SRS5). Alle SRS liegen in unmittelbarer Nachbarschaft des aktiven Zentrums und bestimmen im Wesentlichen die Substratspezifität der Cytochrome P450. Punktmutationen im Bereich der SRS können die Substratspezifität erheblich beeinflussen. Die SRS werden als flexible Proteinregionen betrachtet, die nach der Substratbindung ihre Position ändern. Dabei bringen sie, vergleichbar dem Schlüssel-Schloss-Prinzip, das Substrat in den aktiven Bereich des Enzyms, und ermöglichen so den katalytischen Prozess (Pylypenko und Schlichting, 2004).

1.3 CYP11B1 und CYP11B2

1.3.1 Allgemeines

Das Nebennierenrindenparenchym besteht aus großen, lipidreichen bis -armen, rundlichen, epitheloiden Zellen, die in der *Zona glomerulosa* überwiegend in Haufen, in der *Zona fasciculata* in parallelen Bündeln oder Strängen und in der *Zona reticularis* als Strangnetz angeordnet sind. Diese mikroskopischen Unterschiede im Bereich der Nebennierenrinde

sind nicht nur histologischer Natur, sondern haben auch eine physiologische Relevanz. In der *Zona reticularis* erfolgt überwiegend die Synthese der Androgene, wie z.B. Dehydroepiandrosteron. In der *Zona fasciculata* wird, katalysiert durch CYP11B1, Cortisol, eines der wichtigste Glucocorticoide, synthetisiert. In der *Zona glomerulosa* werden mittels CYP11B2 Mineralocorticoide (z.B.: Aldosteron) synthetisiert (Miller und Tyrell, 1995).

Im Menschen katalysiert CYP11B1 die Hydroxylierung von RSS in der 11 β -Position zu Cortisol. CYP11B2 dagegen katalysiert erst die 11 β -Hydroxylierung des DOC zu Corticosteron, dann die 18 β -Hydroxylierung zu 18-Hydroxycorticosteron und schlussendlich eine 18-Oxidation, die zur Bildung von Aldosteron führt (Abb. 1.3). *In vitro* können beide Enzyme die 11 β -Hydroxylierung von RSS und DOC katalysieren (Kawamoto *et al.*, 1990a), (Denner *et al.*, 1995a). Die 18 β -Hydroxylierung und -oxidierung werden jedoch nur von CYP11B2 katalysiert (Curnow *et al.*, 1991). CYP11B1 hingegen ist ein reines 11 β -hydroxylierendes Enzym.

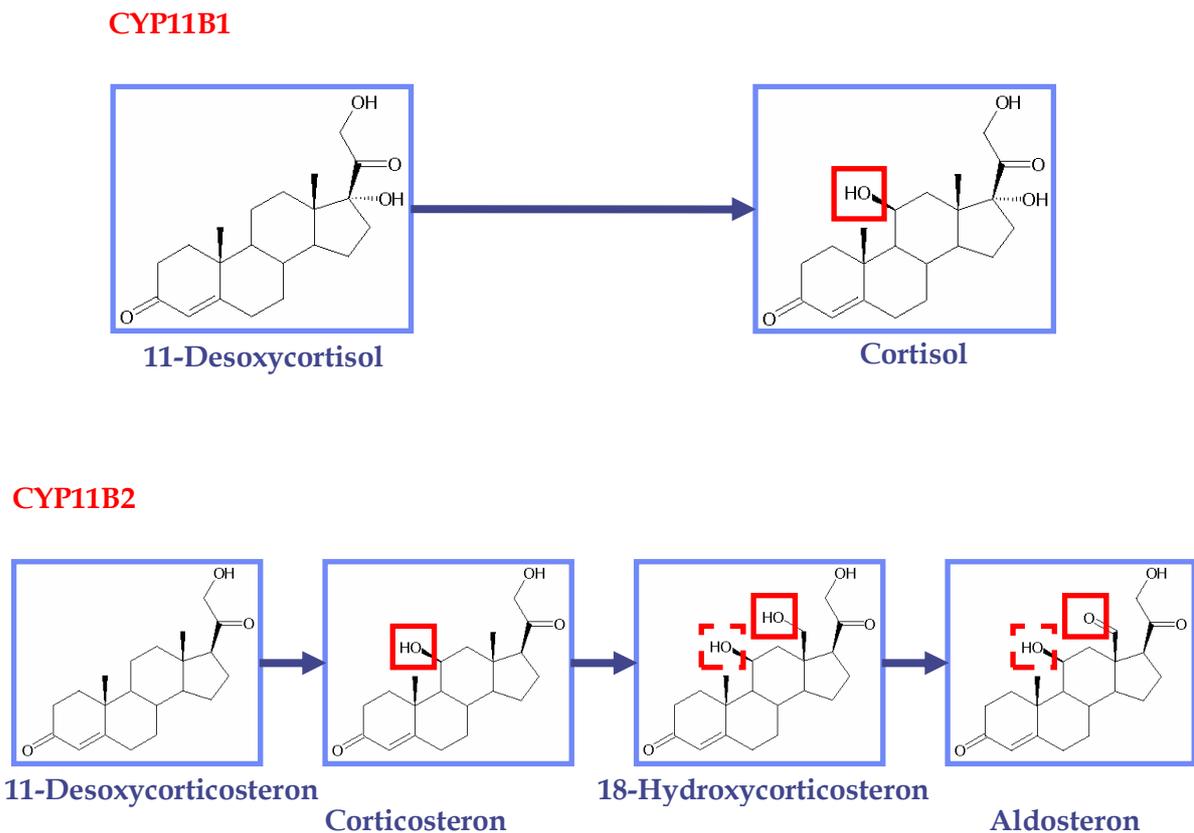


Abb. 1.3: Übersicht der Reaktionen, die von humanen CYP11B1 und CYP11B2 katalysiert werden.

Die Situation in Menschen unterscheidet sich von der in anderen Organismen. Zwei verschiedene Isoformen der CYP11B Enzyme wurden in Mensch (Kawamoto *et al.*, 1990b), (Mornet *et al.*, 1989), Ratte (Matsukawa *et al.*, 1990), Maus (Domalik *et al.*, 1991) und Meerschweinchen (Bulow und Bernhardt, 2002) gefunden. In Rind (Kirita *et al.*, 1988), Frosch (Nonaka *et al.*, 1995), Schaf (Boon *et al.*, 1995), (Boon *et al.*, 1997) und Schwein (Yanagibashi *et al.*, 1986) existiert jedoch nur eine Isoform, die sowohl die Glucocorticoid- als auch die Mineralocorticoidsynthese katalysiert. CYP11B1 und CYP11B2 werden im Mensch zunächst als Präproteine, bestehend aus 503 Aminosäuren, exprimiert. Die 24 Aminosäuren des N-Terminus bilden die mitochondriale Importsequenz, die nach der Translokation des Proteins in die Mitochondrien abgespalten wird. Nach der Abspaltung der Importsequenz verbleibt das fertige Enzym in den Mitochondrien.

Innerhalb der Mitochondrien werden CYP11B1 und CYP11B2 dann an die innere mitochondriale Membran gebunden, wo sie ihre physiologischen Funktionen wahrnehmen. Aufgrund der Membranbindung ist es sehr schwierig, die tertiäre Struktur mit den klassischen Methoden der Strukturanalyse, wie z.B. NMR oder Röntgenstrukturanalyse, zu analysieren. Aufgrund dessen wurde am Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes (Saarbrücken) ein dreidimensionales Modell sowohl von CYP11B1 als auch von CYP11B2 mittels „homology modeling“ entwickelt (Belkina *et al.*, 2001). Beide Modelle besitzen eine große Ähnlichkeit und beinhalten die typische Grundstruktur der Cytochrom P450 Superfamilie. Die aktiven Zentren beider Enzyme enthalten viele hydrophobe Aminosäuren in identischen Positionen (Ala313, Phe321, Pro322, Val378, Phe381, Leu382, Tyr485, Ile488). Einige der Aminosäuren, wie z. B. His107, nehmen allerdings unterschiedliche räumliche Positionen ein. Darüber hinaus sind im aktiven Zentrum auch die beiden in der Cytochrom P450 Superfamilie hoch konservierte Reste Thr318 und Thr319 enthalten. Außerdem findet man das charakteristische Motiv L-P-L-L am Anfang der K-Helix, das die so genannte Steroidbindungsregion bildet (Okamoto *et al.*, 1995). Trotz dieser Ähnlichkeiten unterscheiden sich die aktiven Zentren bezüglich der Position des Häms um einen Winkel von ungefähr 20°. Die unterschiedliche Ausrichtung des Häms wird bedingt durch den „Häm-Binding-Loop“, die Interposition von Aminosäureseitenketten in der Hämregion und Unterschieden im Netz der Wasserstoffbrückenbindungen. Das aktive Zentrum von CYP11B1 ist geräumiger als das von CYP11B2, was sich auch in der Struktur seines natürlichen Substrates widerspiegelt. RSS ist aufgrund der OH-Gruppe in Position 17 α etwas voluminöser als DOC.

Um die Relevanz einzelner Aminosäuren für die von CYP11B1 und CYP11B2 katalysierten Reaktionen zu untersuchen, wurden verschiedene Mutationen in CYP11B1 und CYP11B2

eingefügt. In der I-Helix wurden Kombinationen von Mutationen in den Positionen 296, 301, 302, 320 und 335 eingebracht. Dabei fanden sich sowohl eine gesteigerte CYP11B2- (Bottner *et al.*, 1996) als auch eine gesteigerte CYP11B1-Aktivität (Bottner *et al.*, 1998), (Curnow *et al.*, 1997). Eine höhere 11 β -Hydroxylierungsaktivität von CYP11B2 wurde bei Mutationen an den Positionen 112 und 147 gefunden (Bechtel *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu zeigten Mutationen der C-terminalen Aminosäuren 471, 472, 492, 493, 494 keinen relevanten Effekt hinsichtlich der Regio- und Stereospezifität der Enzyme (Bottner *et al.*, 1998).

Für die Aktivität der CYP11B Enzyme sind verschiedene Faktoren von Bedeutung. Dabei sind die Interaktionen mit ihren Redoxpartnern von besonderer Wichtigkeit. So wurden beispielsweise die Auswirkungen verschiedener Mutationen in bovinem und humanem Adrenodoxin, dem Ferredoxin der Nebennierenrinde, untersucht, welches als Elektronenträger fungiert, hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Reaktionsgeschwindigkeit zu beeinflussen (Beckert und Bernhardt, 1997), (Uhlmann und Bernhardt, 1995), (Coghlan und Vickery, 1991). Neben der Bedeutung der hydrophoben Kontakte für eine Komplexbildung wurden dazu elektrostatische Interaktionen zwischen der Carboxylgruppe einiger Aminosäuren des Adrenodoxins und positiven Resten an der Oberfläche des CYP11B1 analysiert (Coghlan und Vickery, 1992), (Beckert und Bernhardt, 1997).

Aufgrund diverser Hindernisse, humanes CYP11B1 und CYP11B2 in Mikroorganismen zu exprimieren, fehlen detaillierte Studien über den biochemischen Reaktionsmechanismus und die biophysikalische Eigenschaften beider Enzyme. Andererseits wurden bereits einige Systeme entwickelt, die trotz aller Schwierigkeiten die Möglichkeit bieten, CYP11B1 und CYP11B2 *in vivo* zu untersuchen. Es wurden zwei Zelllinien etabliert, die stabil und konstitutiv die Expression von CYP11B1 und CYP11B2 ermöglichen (Denner *et al.*, 1995a), (Denner *et al.*, 1995b). Die erwähnten Zelllinien wurden bisher für die Identifikation und Testung neuer Inhibitoren von CYP11B1 und CYP11B2 benutzt. Ein z.B. auf *S. pombe* basierendes Testsystem würde die Möglichkeiten zur Erforschung von beiden Enzymen erheblich erweitern. In *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) wurde bereits Cortisol synthetisiert (Dumas *et al.*, 1996). Dadurch ergeben sich völlig neue Perspektiven für ein Hochdurchsatz-Testsystem zur Entwicklung und Testung neuer Medikamente, das besonders unter dem Gesichtspunkt niedriger Kosten und einer hohen Effektivität interessant sein könnte.

1.3.2 Adrenodoxin Reduktase (AdR), Adrenodoxin (Adx) und *etp1*

In Mensch bekommen CYP11B1 und CYP11B2 die für die Katalyse notwendige Elektronen über eine ET Kette, die aus verschiedenen Redoxpartnern besteht. Die Elektronen werden dabei von der NADPH-abhängigen Adx Reduktase über Adx auf das Cytochrom P450 übertragen (Grinberg *et al.*, 2000). Aufgrund der Schwierigkeit, humane CYP11B Enzyme in reiner Form herzustellen, wird normalerweise das bovine System für die verschiedenen Untersuchungen eingesetzt.

Die AdR ist ein NADPH abhängiges Enzym, das als Kofaktor ein FAD enthält. Die bovine AdR hat 460 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 50,3kDa (Ziegler *et al.*, 1999). Zwei Domänen werden unterschieden: die FAD enthaltende Region und die NADPH Bindungsregion. Die Bindung zwischen AdR und Adx basiert hauptsächlich auf elektrostatischen Interaktionen. Die AdR besitzt eine hoch asymmetrische Ladungsverteilung. Dabei wird zwischen der NADPH-Domäne und der FAD-Domäne eine Furche gebildet, die aus basischen Aminosäuren besteht (Ziegler *et al.*, 1999). Dieser Bereich wird als Hauptbindungsdomäne von Adx angesehen (Muller *et al.*, 2001).

Adx gehört zur Gruppe der Eisen-Schwefel-Proteine, die je nach der Anzahl der Eisenatome pro Molekül, den Aminosäureresten, die den Eisen-Schwefel-Cluster koordinieren, dem Redoxpotential und dem Auftreten weiterer prosthetischer Gruppen in 5 Klassen eingeteilt werden: Rubredoxine, Ferredoxine, Rieske-Proteine, HiPIP's (**H**igh **P**otential **I**ron **P**roteins) und die Komplexen Eisen-Schwefel-Proteine (Kimura, 1968). Adx gehört zur Gruppe der adrenalen Ferredoxine (Omura, 1966). Adx wird im Kerngenom codiert und als Präprotein mit einer N-terminalen Signalsequenz im Zytosol synthetisiert. Die Präsequenz des bovinen Adx besteht aus 58 Aminosäuren, die beim Eintritt in die Mitochondrien abgespalten werden. Das reife Protein enthält 128 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 14,4kDa. Strukturell können Ferredoxine in zwei Domänen unterteilt werden: die den Eisen-Schwefel-Cluster beinhaltende hydrophobe Kernregion und eine stark negativ geladene Interaktionsdomäne, die an der Bindung und Erkennung der Redoxpartner beteiligt ist (Muller *et al.*, 1999). In welcher Art Adx mit seinen Redoxpartnern während des Elektronentransfers interagiert, ist noch sehr umstritten. Es wurden verschiedene Modelle beschrieben, die einen Pendelmechanismus für Adx, oder einen ternären Komplex mit AdR und dem Cytochrom, oder auch einen quaternären Komplex, an dem zwei Adx Moleküle beteiligt sind, vermuten (Grinberg *et al.*, 2000). Vor kurzem wurde ein modifizierter Pendelmechanismus vorgestellt (Beilke *et al.*, 2002), der aus Adx-Dimeren und -Monomeren als Elektronentransporter besteht. Der Kontakt des Adx zu den einzelnen Redoxpartnern

beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der Adx Interaktionsdomäne und positiv geladenen Bereichen (hauptsächlich Lysinresten) an der Oberfläche von AdR und den Cytochromen (Grinberg *et al.*, 2000). Die Bindung der Redoxpartner wird außerdem durch die asymmetrische Verteilung der negativen Ladungen des Adx begünstigt (Muller *et al.*, 2001). Ein weiterer Faktor, der die Wechselwirkung beeinflusst, ist das unterschiedliche Redoxpotential der einzelnen Reaktionspartner. Adx und AdR bilden einen sehr stabilen Komplex. Während des Elektronentransfers erfolgt eine Erniedrigung des Adx Potentials um ungefähr 100mV von ursprünglich -273mV auf ca. -360mV (Lambeth *et al.*, 1979). Das Redoxpotential der Reduktase bleibt jedoch unverändert bei -295mV. Diese Verschiebung ist somit die treibende Kraft für die Auflösung des Komplexes (Lambeth *et al.*, 1976). Das reduzierte Adrenodoxin kann nun mit dem Cytochrom in Kontakt treten. Nach dem Elektronentransfer auf das Fe³⁺ des Cytochroms löst sich das Adx wieder ab und kann erneut mit AdR interagieren (Lambeth *et al.*, 1980), (Grinberg *et al.*, 2000).

In *S. pombe* wurde ein Protein identifiziert (*etp1*: electron transport protein 1) (Bureik *et al.*, 2002b), dessen C-Terminus eine sehr große Homologie mit dem humanen und bovinen Adx zeigt. *Etp1* hat 631 Aminosäuren und enthält zwei Domänen: *etp1_{cd}* und *etp1_{fd}*. Die *etp1_{cd}* Domäne zeigt eine große Homologie mit den COX15 Proteinen aus Mensch und Bäckerhefe. Die *etp1_{fd}* Domäne weist eine hohe Homologie zu den Mitgliedern der Familie der Ferredoxine auf. Mit dem humanen Adx weist es eine Homologie der Primärstruktur (Bureik *et al.*, 2002b) von über 40% auf und besitzt große Ähnlichkeit bzgl. der physikalischen und chemischen Eigenschaften (Schiffler *et al.*, 2004). *Etp1_{fd}* enthält 4 Cys, die sich an der Bildung des Eisen-Schwefel-Cluster beteiligen. Außerdem enthält es auch zwei Asp, die für die Bindung mit AdR verantwortlich sein könnten, und ein Pro, das eine wichtige Rolle in der Struktur spielen sollte. Die UV/Vis (ultraviolet/visible) Spektren von aus *Escherichia coli* (*E. coli*) aufgereinigtem *etp1_{fd}* sind sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand dem des Adx sehr ähnlich. Die EPR (electron paramagnetic resonance) Spektren weisen auf eine korrekte Positionierung des Eisen Schwefel Clusters hin. Nur das Redoxpotential ist, im Vergleich zu Adx, niedriger (-353mV) (Schiffler *et al.*, 2004). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass *etp1_{fd}* Elektronen sowohl zu CYP11A1 als auch zu CYP11B1 transferieren kann. Alle diese Daten zusammen bestätigen, dass *etp1_{fd}* ein dem Adx nahe verwandtes Protein ist.

1.3.3 Regulation der CYP11B1- und CYP11B2-Expression

CYP11B1 und CYP11B2 sind verantwortlich für die Produktion von zwei unterschiedlichen Steroiden mit sehr verschiedenen physiologischen Wirkungen. Die Steuerung der Synthese dieser zwei Enzyme erfolgt deswegen über getrennte Wege (Bassett *et al.*, 2002).

Die Sekretion von Cortisol unterliegt einem Rückkopplungsmechanismus über den Hypothalamus, die Hypophyse und die Nebennierenrinde (Siegenthaler *et al.*, 2006). Dabei induziert das hypothalamische corticotropin releasing hormone (CRH) die Sekretion des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus der Hypophyse, welches wiederum die Cortisol synthese in den *Zonae fasciculata/reticularis* stimuliert. Cortisol hemmt dagegen die Freisetzung von CRH und ACTH. ACTH vermittelt seine Wirkungen über das Adenylatcyclase-cAMP-System. ACTH bindet auf den Zellen der Nebennierenrinde (*Zonae fasciculata/reticularis*) an spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Zellmembranen, die in der Folge die Adenylat-Cyclase stimulieren und somit den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen (Waterman *et al.*, 1986), (Waterman und Simpson, 1989). Der weitere Ablauf der Signaltransduktion bis zur Aktivierung von CYP11B1 konnte bisher jedoch noch nicht im Detail aufgeklärt werden.

Die Freisetzung von Aldosteron verläuft vor allem über das Renin-Angiotensin-System (Quinn und Williams, 1988). Dabei spielt der Quotient der Natrium- und Kaliumionkonzentration im Plasma eine wichtige Rolle. Änderungen im Blutdruck und Elektrolythaushalt sind die Hauptregulatoren der Reninfreisetzung. Das freigesetzte Renin spaltet von zirkulierendem Angiotensinogen das inaktive Angiotensin I ab, welches durch das ACE anschließend in das aktive ANGII konvertiert wird (Herold, 2002). ANGII löst in den Zellen der Nebennierenrinde eine Reihe von Reaktionen aus, an denen verschiedene Enzyme beteiligt sind. Am Ende dieser Reaktionskaskade kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und somit zu einer Steigerung der intrazellulären Ca⁺⁺ Konzentration (Arai und Escobedo, 1996). Diese ist letztendlich verantwortlich für die Bereitstellung von Aldosteron durch die Zellen der Nebennierenrinde. Es gibt aber auch andere Signalwege, die die Aldosteronproduktion beeinflussen. Man vermutet, dass neben ANGII und K⁺, auch cAMP (durch kurzzeitige ACTH Stimulation) die Promotorelementen für die Expression von CYP11B2 unter gegenseitiger Beeinflussung regulieren kann (Clyne *et al.*, 1997).

1.4 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*)

Die Lebewesen auf der Erde werden gemäß der Klassifikation von Woese in 3 große Domäne eingeteilt (Woese *et al.*, 1990): die *Bacteria* mit dem Reich der *Eubacteria*, die *Archea* mit dem Reich der *Archeabacteria* und die *Eucarya* mit 4 Reichen. Zu diesen Reichen gehören die Protisten (*Protista*: Einzeller mit Kern, Eukaryonten), die Pflanzen (*Plantae*: mehrzellige, autotrophe Eukaryonten), die Tiere (*Animalia*: mehrzellige, heterotrophe Eukaryonten) und die Pilze (*Fungi*: ein oder mehrzellige heterotrophe Eukaryoten). *S. pombe* ist ein Hefepilz, der zur Abteilung der *Ascomycetes* gehört. In der vorliegenden Arbeit wurde *S. pombe* als System zur Synthese von Cortisol eingesetzt und soll deshalb an dieser Stelle etwas näher vorgestellt werden.

S. pombe wurde erstmals 1893 von P. Lindner (Lindner, 1893) beschrieben. Er isolierte die Hefe aus ostafrikanischem Bier und wählte als Beiwort das Swahili-Wort für Bier, „pombe“. In der Zwischenzeit wurden *S. pombe* Zellen und eng verwandte Spezies auch aus Pampelmusensaft und Kambucha Tee isoliert. Hefen sind einzellige Pilze und werden den Sprosspilzen (*Ascosporidae*) zugeordnet, weil die sexuelle Fortpflanzung durch Ascusbildung mit Ascosporen stattfindet. Die asexuelle Vermehrung findet bei *S. pombe* durch Teilung statt. Die Zellen besitzen eine Wand, betreiben keine Photosynthese und sind fakultativ anaerob. Hefen wurden bereits in den frühen Hochkulturen des Mittleren Ostens zur Herstellung alkoholischer Getränke wie Wein und Bier verwendet. Allerdings entdeckte erst Louis Pasteur (1822 – 1895), dass es sich dabei um Mikroorganismen handelte (Im Jahr 1876 publizierte er seine „Études sur la bière“).

Im Laufe des vergangenen Jahrhunderts wurden die ascusbildende Pilze aufgrund verschiedener phänotypischer Charakteristika mehrfach reklassifiziert. DNA- und RNA-Sequenzanalysen aus der jüngeren Vergangenheit belegen eine große Divergenz der ascusbildenden Pilze (Nishida und Sugiyama, 1993) (Abb.1.4). Mittels dieser molekularbiologischen Methoden konnte gezeigt werden, dass die Spaltheefe *S. pombe* von den Sprosshefen phylogenetisch genau so weit entfernt ist wie vom Menschen. In einer vor kurzem publizierten Veröffentlichung, wurde festgestellt, dass die Trennung der *Archaeascomycetes* von den *Ascomycetes* von etwa 1144 Millionen Jahren stattfand (Heckman *et al.*, 2001).

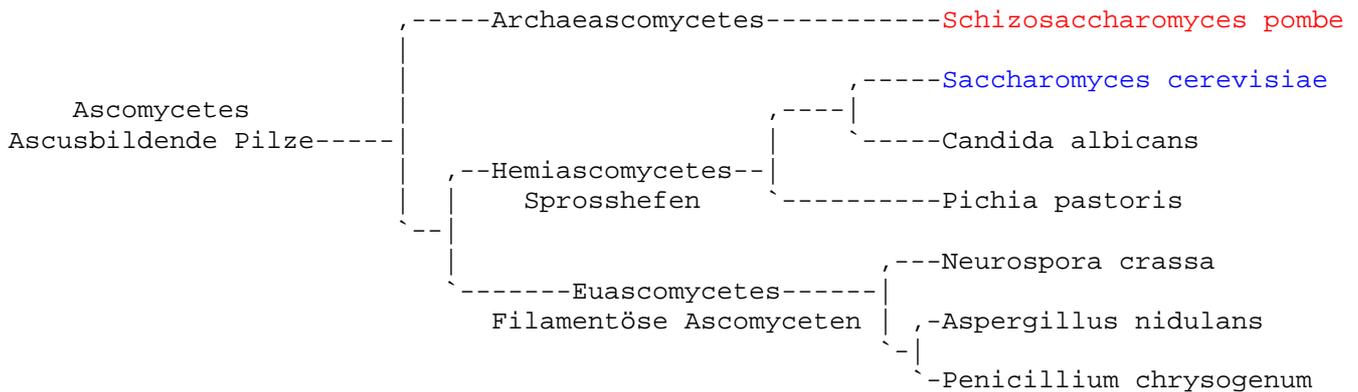


Abb.1.4: Phylogenetik der wichtigsten Hefespezies (<http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/history1.html>)

Hefen und insbesondere *S. pombe* sind ein besonders gutes Modell für die Untersuchung der Zellteilung. Eine normale Zellteilung ist nicht nur für das Wachstum und die Entwicklung von Hefezellen von zentraler Bedeutung, sondern auch für den menschlichen Organismus. Da der menschliche Organismus jedoch ein sehr komplexes System darstellt, ist es leichter, grundlegende Prinzipien der Zellteilung an einfacheren Modellorganismen zu untersuchen (Humphrey und Pearce, 2005). Die Untersuchung der Regulation der Zellteilung lieferte beispielsweise basale Erkenntnisse für das Verständnis vieler menschlicher Erkrankungen (z.B. Tumoren, Psoriasis). Im Jahr 2001 erhielten die Forscher Leland Hartwell, Paul Nurse und Tim Hunt (http://nobelprize.org/nobel_prize/medicine/laureates/2001/index.html) für ihre Zellteilungsstudien mit Bäckerhefe, Spalthefe und Seeigelleiern den Nobel-Preis in Physiologie/Medizin.

Die Sequenzierung des Genoms von *S. pombe* wurde 2002 abgeschlossen (Wood *et al.*, 2002), und war das zweite vollständig sequenzierte Genom eines einzelligen Eukaryonten (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/genome_stats.shtml). Dabei zeigten sich erhebliche Unterschiede zwischen *S. pombe* und *S. cerevisiae* sowohl in Bezug auf die Chromosomengröße und -dynamik als auch in der Gendichte und dem Proteingehalt. Mit einer haploiden Genomgröße von gerade einmal 13,8 Mb und 4979 Genen (*S. cerevisiae* besitzt über 5500) weist *S. pombe* das kleinste bisher sequenzierte eukaryotische Genom auf. Es besteht aus drei Chromosomen. 45,5% der Gene enthalten Introns (bei *S. cerevisiae* nur 5%). Bisher wurden 1538 Gene (30,9%) experimentell charakterisiert und 2415 Genen (48,5%) wird aufgrund der Homologie mit anderen Organismen (z.B. Mensch) eine funktionelle Bedeutung zugeschrieben.

Bislang existieren keine Beweise für eine Verdopplung des Genoms (Wolfe und Shields, 1997), (Wood *et al.*, 2002). Spaltheefe ist einfach genetisch zu manipulieren und sehr viele kommerzielle molekularbiologische Werkzeuge stehen für *S. pombe* zur Verfügung, wie z.B.: verschiedene Plasmide und Microarrays. Spaltheffen verfügen nicht über ein derart rigides Splicing, wie z.B. *S. cerevisiae*. 38% der Splicingfaktoren sind mit humanen Proteinen verwandt. 10% haben ein humanes Homolog, aber keines in *S. cerevisiae*. Die TATA-Box und andere Transkriptionssequenzen befinden sich weiter proximal zum Startkodon als bei Sprosshefen (Russell und Nurse, 1986), (Russell, 1983). Weitere Homologien mit höheren Eukaryonten wurden bei der Signaltransduktion und der posttranslationalen Modifikation gefunden.

Neben Studien über Zellzyklus und Genregulation öffnen sich durch *S. pombe* völlig neue Felder. So wurden kürzlich Untersuchungen über die Mineralocorticoid-Rezeptor-unabhängige Wirkungen des Aldosterons auf die Expression und Regulation von Proteinen in *S. pombe* untersucht (Böhmer *et al.*, 2006). Vor Beginn dieser Promotionsarbeit wurden humane CYP11B Proteine erstmals in *S. pombe* exprimiert (Bureik *et al.*, 2002b). Da diese Enzyme in den Mitochondrien lokalisiert waren, kann man davon ausgehen, dass die mitochondriale Lokalisationssequenz des humanen Enzyms auch in der Spaltheefe funktionsfähig ist. Außerdem erwies sich dieses System als geeignet, Steroide *in vivo* umsetzen zu können. Die Koexpression der Redoxpartner (AdR und Adx) war nicht notwendig. In diesen Zusammenhang wurde ein zu Adx homologes Protein identifiziert, das *in vitro* Elektronen auf das Cytochrom P450 übertragen kann (Schiffler *et al.*, 2004). Diese Eigenschaften machen das System *S. pombe* für die industrielle Herstellung von Steroiden, wie z.B. Cortisol, sehr interessant. Die bisherigen Systeme sind in der Handhabung eher komplizierter als Spaltheefe (Dumas *et al.*, 1996), (Yabusaki, 1995). Außerdem ermöglicht *S. pombe* ein schnelles und effektives Screening von Inhibitoren der CYP11B Enzyme (Ehmer *et al.*, 2002), (Bureik *et al.*, 2004), (Ulmschneider *et al.*, 2005). Eines der wichtigsten Argumente für den Einsatz von *S. pombe* ist allerdings die Möglichkeit einer tiefergehenden Erforschung von Enzymen, die in anderen Systemen nur schwierig zu exprimieren sind.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

RSS wird durch Hydroxylierung an Position 11 des Steroidgerüsts in Cortisol umgewandelt. *In vivo* läuft diese Reaktion in der *Zona Fasciculata* der Nebennierenrinde ab und wird von CYP11B1 katalysiert. *In vitro* kann diese Hydroxylierung auch von CYP11B2 katalysiert werden, einem Enzym, das *in vivo* für die Produktion des Aldosterons zuständig ist. Aufgrund des hohen Bedarfs an Cortisol in der Medizin ist eine effiziente Cortisolproduktion von allgemeinem Interesse. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Optimierung der enzymatischen Cortisolproduktion durch die Entwicklung einer oder mehrerer gentechnisch veränderter Varianten von CYP11B1 mit einer erhöhten enzymatischen Aktivität.

Da die Expression und Reinigung von CYP11B1 in *E. coli* nicht erfolgreich war, sollte *S. pombe* (Spalthefe) als alternatives System benutzt werden. Die zu analysierenden Zielparameter waren die Proteinexpression und die enzymatische Aktivität von CYP11B1 in *S. pombe*. Basis für die Herstellung gentechnisch veränderter Varianten war das von Belkina et al. publizierte Modell des CYP11B1 (Belkina et al., 2001). Mit Hilfe dieses Modells und den Kenntnissen über bereits bekannte Mutationen sollten durch gerichtete Mutagenese potentiell interessante Positionen in verschiedenen Domänen mutiert werden. Die für die Mutation ausgewählten Positionen sollten sich in der I-Helix, dem Substrateintrittskanal und der Bindungsdomäne befinden. Darüber hinaus sollten noch drei weitere genetische Varianten hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht werden.

In der Tierwelt existieren erhebliche Variationen in der Cortisol- und Aldosteronsynthese. Einige Organismen weisen eine dem Menschen ähnliche Konstellation auf, bei der die Cortisolsynthese von CYP11B1 und die Aldosteronproduktion von CYP11B2 katalysiert werden. Es gibt jedoch auch Spezies (z.B. Rind), bei denen CYP11B1 die Synthese beider Hormone reguliert (Watanuki et al., 1978). Es stellt sich deshalb die Frage, ob sich diese Speziesunterschiede für die Erzeugung eines auf *S. pombe* basierenden Expressionssystems mit erhöhter Cortisolsyntheseaktivität nutzen lassen. Die zweite Aufgabe dieser Promotion bestand deshalb in der Klonierung und Exprimierung von CYP11B Enzymen aus Mensch, Affe, Rind, Ratte und Meerschweinchen unter identischen Bedingungen in *S. pombe*. Deshalb sollten für alle Spezies eine identische mitochondriale Importsequenz und das gleiche Expressionsplasmid verwendet werden. Die so generierten CYP11B Varianten sollten dann auf Ihre Aktivität und Struktur hin geprüft werden. Durch die anschließende Kombination der Aktivitäts- und Strukturdaten sollten Bereiche im Protein identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Enzymaktivität besitzen.

Die in der vorliegenden Promotionsarbeit generierten Daten werden helfen, das Wissen über die Funktion von CYP11B1 Proteinen zu erweitern und mögliche Ansätze für eine effizientere Cortisolsynthese in Mikroorganismen wie *S. pombe* zu schaffen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien wurden, wenn an entsprechender Stelle nicht anders beschrieben, in höchster Qualität von Standard Firmen bezogen.

2.1.1 Nährmedien

Nährbouillon (NB) Medium (für *Escherichia coli* (*E. coli*))

25g Nährbouillon I (SIFIN) wurden in 1l dest.H₂O gelöst und dann direkt autoklaviert.

NB Agar Platten (für *E. coli*)

14g Nähragar I (SIFIN) wurden in 400ml dest.H₂O gelöst und autoklaviert. Danach wurde die entsprechende Menge des Antibiotikums dazu gegeben (Endkonzentration 50mg/l). Dazu wurden 100µl einer Ampicillin Stammlösung (50mg/ml) in 100ml Medium pipettiert. Das so vorbereitete Medium wurde noch warm auf Kulturplatten gegossen, wo es dann abkühlte und aushärtete.

EMM Medium (für *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*))

Edinburgh Minimal Medium (EMM) ist ein Minimalmedium für das Wachstum von *S. pombe*. Es wurden 12g Kaliumhydrogenphthallat, 8,8g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat, 20g Ammoniumchlorid und 80g D-Glucose eingewogen und anschließend mit 4l dest.H₂O gelöst. Der pH Wert lag zwischen 5,4 und 5,8. Danach wurden Salze, Vitamine und Mineralien jeweils aus Stammlösungen zugesetzt (jeweils 80ml, 4ml und 400µl). Die Zusammensetzungen der Lösungen finden sich unten. Abschließend wurde das Medium autoklaviert. Unmittelbar vor der Verwendung wurden für die einzelnen Stämme (je nach Genotyp des Stammes; siehe Abschnitt 2.1.4 und Tab. 2.1) benötigten Zusätze vor Versuchsbeginn mit einer Endkonzentration von 0,01% *m/V* zugesetzt. Im Falle von Repression des *nmt1* Promotors ist eine 5µM Thiamin Lösung im Medium notwendig.

Tab. 2.1: Spezielle Zusätze zum Medium für die verschiedenen verwendeten Stämme

Stamm	Medium Zusätze
MB175	Adenin Lösung Histidin Lösung Uracil Lösung Leucin Lösung
MB163	Uracil Lösung
MB175 transformiert mit pNMT1-TOPO Plasmid	Adenin Lösung Histidin Lösung Uracil Lösung
MB163 transformiert mit pCAD1 Plasmid	Leucin Lösung

Salzstammlösung:

MgCl ₂ x6H ₂ O (Magnesiumchloridhexahydrat)	21g
CaCl ₂ x2H ₂ O (Calciumchloriddihydrat)	0,3g
KCl (Kaliumchlorid)	20g
NaSO ₄ (Natriumsulfat)	0,8g
dest.H ₂ O	400ml

Vitaminstammlösung:

Nikotinat	81,2µM
Inositol	55,5µM
Biotin	40,8µM
Pantothenat	4,2µM

Mineralstammlösung:

H ₃ BO ₃ (Borsäure)	2g
MnSO ₄ (Mangansulfat)	1,6g
ZnSO ₄ x7H ₂ O (Zinksulfat Heptahydrat)	1,6g
FeCl ₃ x6H ₂ O (Ferrichlorid Hexahydrat)	0,8g
H ₂ MoO ₄ (Molybdänsäure)	0,64g
CuSO ₄ x5H ₂ O (Kupfersulfat Pentahydrat)	0,16g
C ₆ H ₈ O ₇ xH ₂ O Zitronensäure)	4g
dest.H ₂ O	400ml

EMM Agar Platten (für *S. pombe*)

Das gleiche EMM Medium diente auch als Basis für die Platten. Es wurden 8g Agar in 400ml EMM Medium gegeben. Anschließend wurde das Medium autoklaviert. Vor dem Gießen der Platten wurden wiederum die verschiedenen Lösungen aus Tab. 2.1 zugesetzt. Die Stämme wurden auf den Platten nicht induziert.

2.1.2 Plasmide

pNMT1-TOPO Expressionsvektor, Invitrogen: ermöglicht die Expression von Proteinen unter Kontrolle des *nmt1* Promotor. Die Proteine werden mit zwei Tags (ein Pk- und ein Hexahistidin Tag) für die Detektion und Reinigung exprimiert. Es ist ein autosomal replizierendes Plasmid. Außerdem enthält das *S. cerevisiae* *LEU2* Gen (Abb. 2.1), das die auxotrophe Selektion des Plasmides in *leu1*- Stämme ermöglicht (Andreadis *et al.*, 1984).

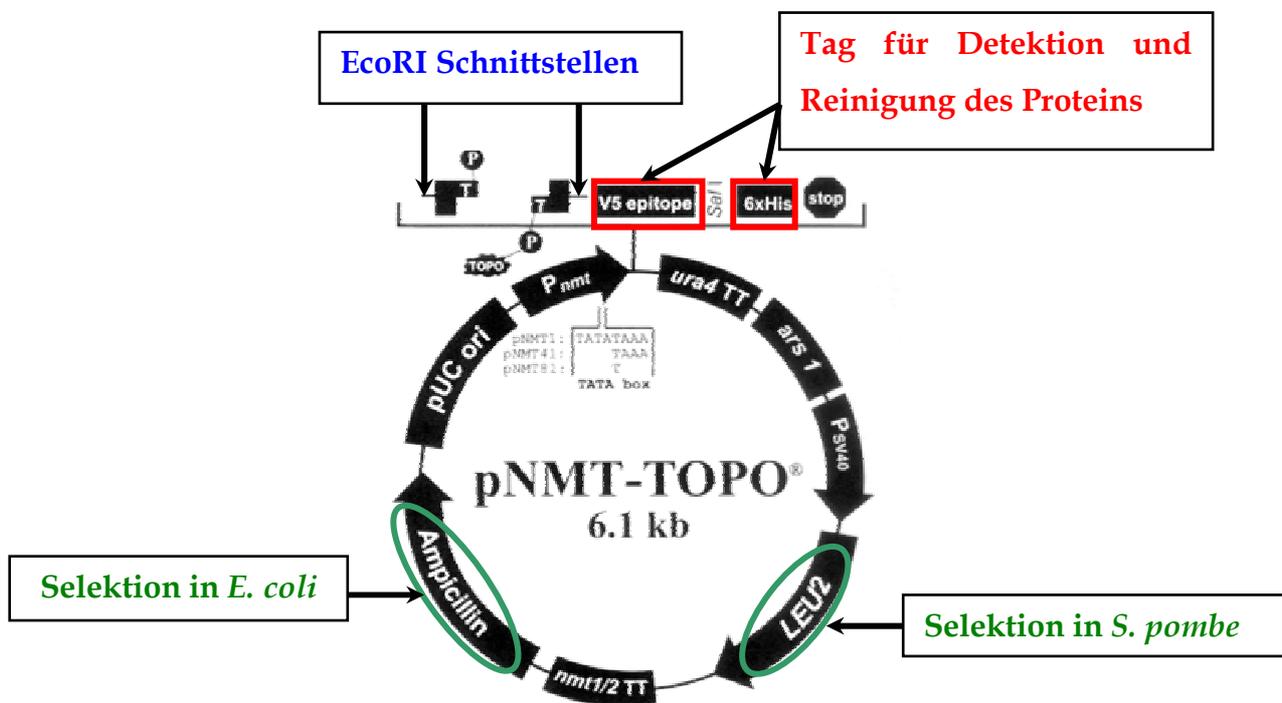


Abb. 2.1: Karte des Plasmides pNMT1-TOPO mit den verschiedenen Eigenschaften

pCAD1 Integrationsvektor für *S. pombe*, der die Expression des humanem CYP11B1 (hsCYP11B1) mit zwei angehängten Epitopen (ein Hexahistidin- und ein Pk-Tag) ermöglicht (zur Verfügung gestellt von Calin A. Dragan, Institut für Biochemie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken). Der Bereich des Plasmides zwischen den zwei *Not*I Schnittstellen wird für die Integration verwendet (Abb. 2.2). Die Integration findet im *leu1* Gen statt und das Gen wird zerstört. Das Plasmid enthält das *ura4* Gen, das die auxotrophe Selektion des Plasmides in *ura4*- Stämmen ermöglicht.

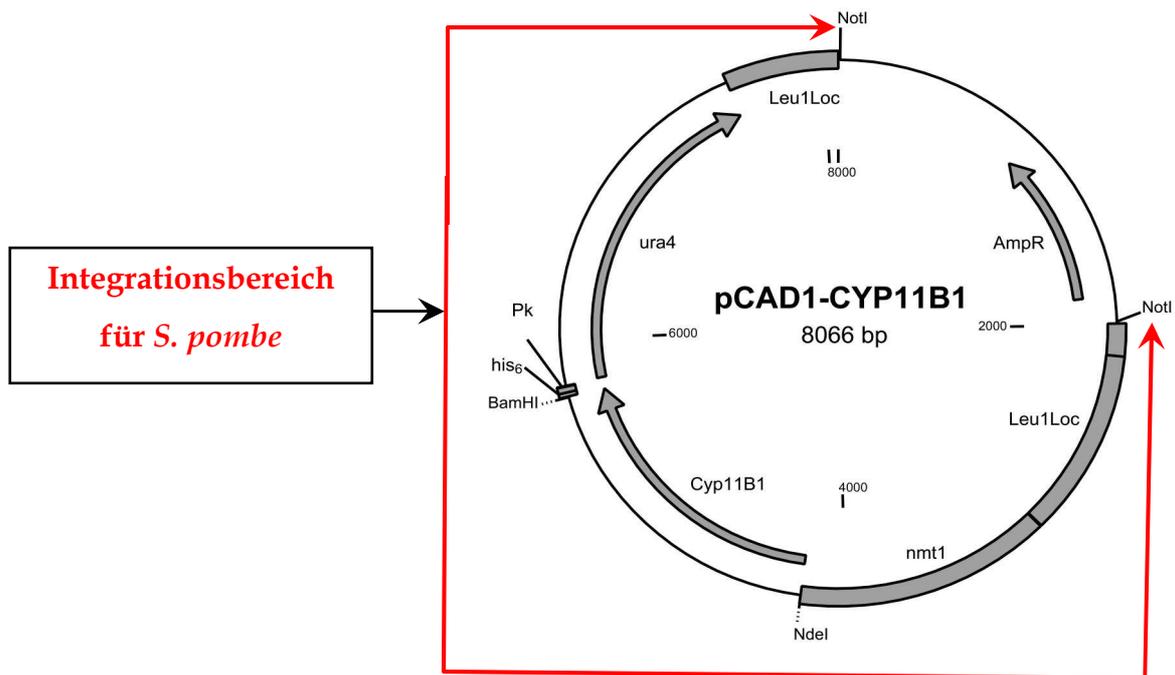


Abb. 2.2: Karte des Plasmides pCAD1

2.1.3 Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Primer wurden von der Firma BioTeZ (Berlin-Buch, Deutschland) bezogen. Die Abb. 2.3 zeigt die Sequenzen und Strukturen der Primer, die für die Amplifizierung und anschließend Klonierung in pNMT1-TOPO verwendet wurden. Die Tab. 2.2 zeigt Sequenz und Struktur der Primer, die für die ortsgerichtete Mutagenese (QuikChange™) in pCAD1 eingesetzt wurden.

CypUnifor (Vorwärtsprimer):

Start

HindIII Kozak Seq. Signal Peptid von hsCYP11B2

5'**GAAGCTT****GCCATGG**CACTCAGGGCAAAGGCAGAGGTGTGCGTGGCAGCGCCCTGG
CCCTGCAAAGGGCACGGGCACTGGGCAC3'

CypUnifor2 (Vorwärtsprimer):

5'**GAAGCTT****GCCATGG**CACTCAGGGCAAAGGC3'

CypUnirev (Rückwärtsprimer):

BamHI **Sequenz von hsCYP11B2**

5'**GGATCCGTTAATCGCTCTGAAAGTGAGGAGGGG**3'

Rarev2 (Rückwärtsprimer):

BamHI **Sequenz von hsCYP11B2** **Sequenz von rnCYP11B1**

5'**GGATCCGTTAATCGCTCTGAAAGTGAGGAGGGGACTAGAGCTGGG**3'

Abb. 2.3: Schema der Vorwärts- und Rückwärtsprimer, die für die Klonierung in pNMT1-TOPO Vektor benutzt worden sind

Tab. 2.2: Liste und Eigenschaften der Primer für die ortsgerichtete Mutagenese (QuikChange™). Rot hervorgehoben sind die Nukleotide, die für die Mutationen in der Aminosäuresequenz verantwortlich sind. Die blauen Nukleotide stellen Änderungen innerhalb von Restriktionssequenzen dar. Unterstrichen sind sowohl die Codons als auch die Erkennungssequenz der Endonukleasen

Name	Mutation	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
ML	M52L	5'GGTGGCTGAGG <u>TIGCTGCA</u> <u>AAAT</u> <u>CTGGAGG</u> 3'	Vorwärtsprimer Keine Schnittstelle mehr für Bgl II
MLrev	M52L	5'CCTCC <u>CAGATT</u> IGCAGCA <u>ACCTC</u> AGCCACC3'	Rückwärtsprimer Keine Schnittstelle mehr für Bgl II
VI	V78I	5'GGA <u>ACTAGGGCCCA</u> <u>ATTT</u> CAGG TACGACTTGG3'	Vorwärtsprimer
V178Irev	V78I	5'CCAAGTCGTACCTGAA <u>AAAT</u> IGGG CCCTAGTTCC3'	Rückwärtsprimer
SP	S112P	5'CCCCACAGGATG <u>CCCCTGGAGC</u> <u>CATGGG</u> 3'	Vorwärtsprimer Schnittstelle für Nco I
SPrev	S112P	5' <u>CCCATGGCTCCAGG</u> <u>GG</u> CATCCT GTGGGG3'	Rückwärtsprimer Schnittstelle für Nco I
PA	P135A	5'GCTGAATGGG <u>GCT</u> GAATGGCGC TTCAACCG3'	Vorwärtsprimer
PArev	P135A	5'CGGTGAAGCGCCATTC <u>AGCC</u> CATTACAG3'	Rückwärtsprimer
LK	L144K	5'GCTTCAACCGATTGCGG <u>AAGAA</u> TCCAGAAGTGCTGTC3'	Vorwärtsprimer

Name	Mutation	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
LKrev	L144K	5'GACAGCACTTCTGGATTCTTCC GCAATCGGTTGAAGC3'	Rückwärtsprimer
NK	N152K	5'GCTGTGCGCCCAAGGCTGTGCAG AGG3'	Vorwärtsprimer
NKrev	N152K	5'CCTCTGCACAGCCTTGGGCGAC AGC3'	Rückwärtsprimer
TI	T185I	5'GCCCCCGGGAGCCTGATCCTGG ACGTCCAGCC3'	Vorwärtsprimer Keine Schnittstelle mehr für Sma I
TIrev	T185I	5'GGCTGGACGTCCAGGATCAGGC TCCC G CGGGC3'	Rückwärtsprimer Keine Schnittstelle mehr für Sma I
AK	A279K	5'CCAGAAAGATCTATCAGGAACTG AAA TTCAGCCGCC3'	Vorwärtsprimer Schnittstelle für Bgl II
AKrev	A279K	5'GGCGGCTGAA TTT CAGTTCCT GATAGATCTTCTGG3'	Rückwärtsprimer Schnittstelle für Bgl II
SG	S315G	5'TCACTGCAGGGGGCGT CG ACAC GAC3'	Vorwärtsprimer Schnittstelle für Sal I
SGrev	S315G	5'GTCGTGTCGACGCC CC CTGCAG TGA3'	Rückwärtsprimer Schnittstelle für Sal I
PS	P322S	5'GGGAGCGT CG ACACGACGGTG TTT TC CTTGCTGATGACG3'	Vorwärtsprimer Schnittstelle für Sal I
PSrev	P322S	5'CGTCATCAGCAAGG A AAACAC CGTCGTGTCGACGCTCCC3'	Rückwärtsprimer Schnittstelle für Sal I
AF	A386F	5'GTCTGTTTCT CG AGCGAGTG TTT AGCTCAGACTTGGTGC3'	Vorwärtsprimer Schnittstelle für Xho I
AFrev	A386F	5'GCACCAAGTCTGAGCT AAA CAC TCGCTCGAGAAACAGAC3'	Rückwärtsprimer Schnittstelle für Xho I
DR	D430R	5'CCCAGCGCTGGCTA AGG ATCC GGGGCTCCGG3'	Vorwärtsprimer Schnittstelle für BamH I
DRrev	D430R	5'CCGGAGCCCC GG AT CCT TAGCC AGCGCTGGG3'	Rückwärtsprimer Schnittstelle für BamH I
IK-1	I431K	5'GCGCTGGCTAGACA AAA AGGGG A TCCGGC3'	Vorwärtsprimer Schnittstelle für BamH I
IKrev	I431K	5'GCCGGATCCCCT TTT TGCTAGC CAGCGC3'	Rückwärtsprimer Schnittstelle für BamH I
FW	F445W	5'CGTGCCCTTGGCT GGG GTATG C GCCAGT3'	Vorwärtsprimer Keine Schnittstelle mehr für Sph I
FWrev	F445W	5'ACTGGCGCAT ACC CCAGCCAA AGGGCACG3'	Rückwärtsprimer Keine Schnittstelle mehr für Sph I

2.1.4 Mikroorganismen

Name und Organismus	Genotyp
Top10 (<i>E. coli</i>)	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)Φ80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ (<i>ara</i> <i>leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>
JM109 (<i>E. coli</i>)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>relA1 supE44</i> λ ⁻ Δ (<i>lac-proAB</i>) F' [<i>traD36 proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacIqZ</i> Δ M15]
MB175 (<i>S. pombe</i>)	<i>h⁻ ade6.M210 ura4.dl18 leu1.32 his3.Δ 1</i>
MB163 (<i>S. pombe</i>)	<i>h⁻ ura4.dl18</i>

Die Stämme MB175 und MB163 sind auxotroph für einige Substanzen. Ihr Genotyp ermöglicht das Wachstum in EMM mit der Ergänzung von im Falle von MB175 Adenin, Histidin, Uracil und Leucin und im Falle von MB163 nur Uracil (Tab. 2.1). Durch die Transformation von MB175 mit dem pNMT1-TOPO Vektor entfällt der Bedarf an Leucin. Durch die Transformation von MB163 mit pCAD1 entfällt der Bedarf an Uracil und MB163 wird auxotroph für Leucin durch die Integration des Plasmides ins *leu1* Gen.

Die von mir erstellten Stämme sind in den Tab. 3.4 (mit Plasmid pCAD1) und Tab. 3.5 (mit Plasmid pNMT1-TOPO) aufgelistet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle gentechnischen Arbeiten nach den von Sambrook et al. beschriebenen Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

2.2.1 Amplifikation der CYP11B cDNAs mittels PCR (polymerase chain reaction)

Die Amplifikation der CYP11B cDNAs erfolgte mittels PCR unter Verwendung der Pfu-Polymerase. Jeder Ansatz wurde nach folgendem Schema vorbereitet:

Pfu-Polymerase Puffer (10x)	5µl
dNTP (5mM)	2µl
Vorwärtsprimer (10µM)	1µl
Rückwärtsprimer (10µM)	1µl
Template (100ng/µl)	1µl
Pfu-Polymerase (3u/µl)	0,5µl
dest.H ₂ O	39,5µl

Als Programm für die Amplifikation wurde das „RamPfu“ Programm benutzt. Es unterscheidet sich von anderen gewöhnlichen Programmen in der Annealing-Temperatur. Die Temperatur wird im Gegensatz zum konventionellen PCR Schema schrittweise bis auf 37°C abgesenkt, um auch nicht perfekt passende Primer binden zu lassen. Jede PCR umfasste 29 Zyklen, wobei jeder Zyklus die folgenden Schritte enthielt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anderes
1) Schmelzen	96°C	45sec	
2) Annealing	60°C	30sec	
3) Annealing	bis 37°C	-0,2°C/sec	Schrittweises Abkühlen
4) DNA Synthese	72°C	4min	
5) Zyklen			Schritt 1) bis 4) 29 mal wiederholen

Die CYP11B Sequenzen wurden immer in zwei aufeinander folgenden PCR amplifiziert. Um die Ausbeute des amplifizierten DNA Produktes zu erhöhen, wurde das erste Mal der Vorwärtsprimer („CypUnifor“) und das zweite Mal der verkürzten Vorwärtsprimer („CypUnifor2“) benutzt. Nur für die DNA aus der Ratte wurde als Rückwärtsprimer „Rarev2“ benutzt. Als Template dienten die in der Tab. 3.2 gelisteten Vektoren.

2.2.2 pNMT1-TOPO Klonierung

Die TOPO Klonierung erfolgte durch die Topoisomerase aus dem *Vaccinia* Virus, die kovalent an den Vektor gebunden ist (Abb. 2.4). Die phospho-tyrosyl Bindung zwischen Plasmid-DNA und dem Tyr274 des Enzyms (Shuman, 1991) wird durch die 5'-Hydroxylgruppe des PCR Produktes zerstört. Die Topoisomerase wird freigesetzt (Shuman, 1994) und das PCR Produkt wird hineinkloniert.

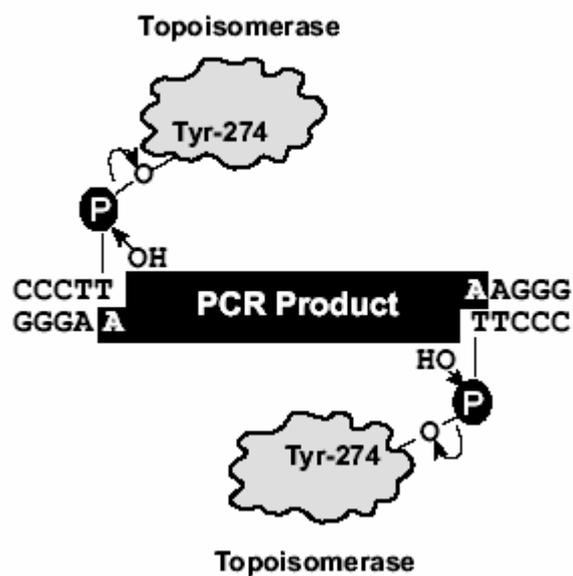


Abb. 2.4: Die Reaktion der Topoisomerase in der TOPO Klonierung

Nach der Amplifizierung der cDNA durch die Pfu-Polymerase wurde ein 3'-A-Überhang an die so generierten Fragmente angehängt. Dies geschah durch den Zusatz von 0,5µl Taq-Polymerase und eine Inkubation bei 72°C für 10min direkt im Anschluss an die PCR. Die Kontrolle dieser Reaktion erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Anschließend wurden die Fragmente der Größe nach aus dem Gel geschnitten und gereinigt. Für die Klonierung wurden dann 4µl PCR Produkt, 1µl Salz Lösung und 1µl pNMT1-TOPO Vektor in ein

Reaktionsgefäß pipettiert, vorsichtig gemischt und 30min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2µl des Reaktionsansatzes für die Transformation von *E. coli* Zellen benutzt.

2.2.3 Gerichtete Mutagenese des Plasmides pCAD1

Die gerichtete Mutagenese erfolgte durch die Technik der QuikChange™ Mutagenese, die auf einer PCR Reaktion basiert, die über das gesamte Plasmid durchgeführt wird. Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer werden so ausgesucht, dass sie sich überlappen und damit die gewünschte Mutation in der Mitte der Primersequenz liegt. In den benutzten Primern wurden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen entweder neu eingeführt oder zerstört. Die Namen, Sequenzen und ihre Eigenschaften sind in Tab. 2.2 aufgelistet. Nach der PCR Amplifikation wurde das methylierte, nicht mutierte und parentale Plasmid direkt im Reaktionsansatz mit Hilfe des Enzyms DpnI (1µl von einer 10U/µl Lösung) verdaut. Schließlich wurden kompetente *E. coli* Zellen mit dem mutierten Plasmid transformiert (10µl Ansatz). Der Ansatz war mit Ausnahme der Primer für jede Mutation gleich. Die Zusammensetzung des Ansatzes und des PCR Programmes sind in Tab. 2.3 und Tab. 2.4 schematisch dargestellt. Jede PCR umfasste 20 Zyklen.

Tab. 2.3: Die Zusammensetzung des PCR Ansatzes für die gerichtete Mutagenese

Pfu-Polymerase Puffer (10x)	5µl
dNTP (5mM)	2µl
Vorwärtsprimer (10µM)	1µl
Rückwärtsprimer (10µM)	1µl
Template (15ng/µl)	1µl
Pfu-Polymerase (3u/µl)	1µl
dest.H ₂ O	39µl

Tab. 2.4: Das PCR Programm für die gerichtete Mutagenese

Schritt	Temperatur	Zeit
1) Schmelzen	95°C	1min
2) Annealing	60°C	1min
3) DNA Synthese	72°C	18min

2.2.4 DNA Sequenzierung

Die DNA Sequenzierung erfolgte mit einer enzymatischen Methode, die eine Weiterentwicklung der Methode nach Sanger et al. (Sanger *et al.*, 1977) darstellt. Dieses Verfahren wird auch als „Didesoxymethode nach Sanger“ bezeichnet. Dabei kommen mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Didesoxynukleosidtriphosphate zum Einsatz. Die Sequenzierung wurde von Frau K. Bompais und Frau N. Lenz auf einem automatischen Analysegerät (Li-COR, Bad Homburg, Deutschland) durchgeführt. Bei nicht erfolgreicher Sequenzierung wurden die Proben von der Firma MWG (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) sequenziert.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen (*E. coli*)

Der gewünschte Stamm wurde aus einer Glycerinkultur in NB Medium angezüchtet und auf einer NB Agar Platte kultiviert. Von einer der gebildeten Kolonien wurden Zellen entnommen und in 3ml NB Medium mit 15µl einer sterilen 2M MgSO₄ Lösung versetzt. Diese Präparation wurde über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (150U/min) inkubiert. Am Folgetag wurden 500µl dieser Kultur in 50ml NB Medium überführt und 500µl einer sterilen 2M MgSO₄ Lösung zugesetzt. Die Zellen wurden dann bei 37°C im Schüttelinkubator (150U/min) inkubiert, bis die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm einen Wert zwischen 0,3 und 0,5 erreicht hatte. Die Bakterienkultur wurde nun bei 4000g 5min zentrifugiert und das Pellet in 14ml TFP I (Zusammensetzung siehe unten) vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde 60min auf Eis stehen gelassen und erneut bei 4000g 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 2ml TFP II (siehe unten) aufgenommen. Von dieser Suspension wurden je 100µl in beschriftete Gefäße gefüllt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C. Die Kompetenz der Zellen wurde mittels einer Testtransformation festgestellt. Dazu wurden die Zellen aufgetaut und 100µl der Suspension mit einem Kontrollplasmid (pUC18 0,25ng) transformiert. Die Kompetenz wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Kolonien}/\mu\text{g DNA} = \text{Anzahl Kolonien} \times 10 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 4000 (1000\text{ng}/0,25\text{ng})$$

Eine gute Kompetenz liegt vor, wenn der Wert zwischen 10⁶ und 10⁷ liegt.

Transferpuffer I (TFP I)

1M KCH₃COO

1M KCl

1M CaCl₂

12ml steriles Glycerin

pH=6,1

1M MnCl₂

Transferpuffer II (TFP II)

0,2M MOPS

1M KCl

1M CaCl₂

4ml steriles Glycerin

2.3.2 Transformation von *E. coli*

Die kompetenten Zellen wurden für die eigentliche Transformation zuerst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50µl der Zellsuspension mit 2µl des pNMT1-TOPO Expressionsvektors bzw. 10µl des Ansatzes von mutierten pCAD1 Plasmiden versetzt und für 1h auf Eis stehen gelassen. Anschließend erfolgte eine Hitzeschockbehandlung für 30sec in einem 42°C warmen Wasserbad. Direkt im Anschluss wurden die Zellen erneut für 5min auf Eis gestellt. Dann wurden jeweils 500µl NB Medium hinzugegeben und die Ansätze für eine Stunde bei 37°C in einem Thermoschüttler inkubiert. Am Ende wurden jeweils 100µl Agarplatten ausplattiert und über Nacht in einem 37°C Inkubator kultiviert. Die gebildeten Kolonien wurden am Ende mittels Kolonie PCR auf die Anwesenheit des Plasmides geprüft.

2.3.3 Transformation von *S. pombe*

Die Hefetransformation wurde nach einer modifizierten Lithiumacetat Methode (Okazaki *et al.*, 1990) durchgeführt. Aus einer Platte mit Kolonien von *S. pombe* wurden Zellen entnommen und in 10ml EMM Medium suspendiert. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C in einem Schüttelinkubator mit 120U/min wurde mit dieser Vorkultur (VK) eine Hauptkultur (HK) beimpft. Die HK bestand aus 100ml EMM Medium sowie den Zellen der VK und wurde unter denselben Bedingungen wie die VK kultiviert. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen gezählt und abzentrifugiert (3000g, 5min). Das Pellet wurde 2x mit sterilem dest.H₂O gewaschen. Nach einem weiteren Waschvorgang mit 1ml Transformationslösung wurde das Pellet in selbigem Puffer resuspendiert. Dabei wurde auf Basis der ermittelten Zellzahl das Volumen so berechnet, das die entstehende Suspension eine Zelldichte von 2*10⁹Zellen/ml aufwies. 100ml dieser Zellsuspension wurden nun auf mehrere Gefäße verteilt und mit je 2µl Lachssperma (als DNA Opfer für DNAsen) versetzt. Für jede Transformation wurden zwischen 2 und 10µg

DNA angesetzt. Nach 30 und 60min Inkubation wurden je 260µl 50% PEG4000 zur osmotischen Stabilisierung zugegeben und vorsichtig gemischt. Die so behandelten Zellen wurden für 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 43µl DMSO zur Erhöhung der Membranpermeabilität und die Durchführung des Hitzeschocks (5min, 42°C). Anschließend wurden die Zellen direkt auf Eis gestellt und mit 500µl dest.H₂O gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in 500µl dest.H₂O resuspendiert und 100µl davon auf selektiven Platten ausplattiert. Diese Platten wurden dann für 3-5 Tage bei 30°C im Inkubator kultiviert.

Transformationslösung

0,1M LiAc

pH=4,9

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Protein Extraktion aus ganzen Hefezellen

Nachdem sich die Zellen in der HK (100ml) vermehrt hatten, wurden sie zentrifugiert (3000g für 5min) und das Pellet mit 10ml eiskaltem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 2ml Proteinextraktionspuffer resuspendiert und PMSF sowie DTE hinzugegeben (Endkonzentration 1mM). Außerdem wurden 4ml Glasperlen (500µm, Sigma) zugegeben und die Zellen durch heftiges Schütteln (6x30sec) aufgeschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt (4000g, 10min) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels der in 2.4.2 beschriebenen Methode quantifiziert.

Proteinextraktionspuffer

1M Tris/Cl, pH=7,5

1M MgCl₂

0,5M EDTA

100% (m/V) IGEPAL CA-630

2.4.2 Protein Quantifizierung

Die Proteinquantifizierung wurde mit dem „BC Assay: protein quantitation kit“ der Firma Interchim durchgeführt. Dieser Assay basiert auf dem kolorimetrischen Nachweis eines

lilafarbenen Cu^+ -Bicinchoninsäure(BCA)-Komplexes (Smith *et al.*, 1985). Die Peptidbindung der Proteine reduzieren Cu^{2+} Ionen zu Cu^+ Ionen. Die Bicinchoninsäure bildet dann mit den Cu^+ Ionen einen wasserlöslichen lilafarbenen Komplex (Abb. 2.5).

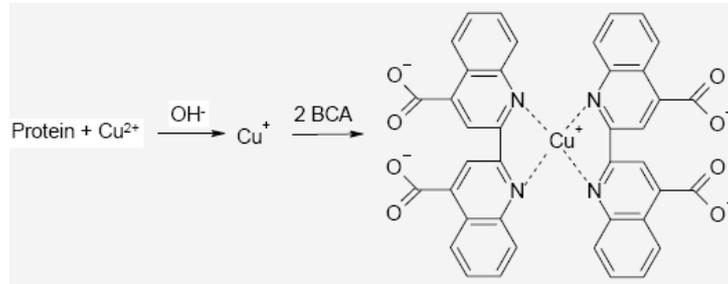


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der BCA Reaktion

Die Proteinkonzentration kann in einem Photometer bei 562nm bestimmt werden. Mit Hilfe einer Eichgeraden wurde die Proteinkonzentration in der zu untersuchenden Probe berechnet.

2.4.3 Protein Fällung

Nach der Protein Extraktion wurden die Proben kurz zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Pro 100 μl Probe wurden jeweils 10 μl einer 0,2 %igen Na-Desoxycholat Lösung und 20 μl einer 50%igen Trichloressigsäure (TCA) zugesetzt. Es folgt eine 30minütige Inkubation auf Eis. Dieser Schritt ist für die Protein Fällung verantwortlich. Danach wurde die Lösung 5min bei $\sim 16600g$ zentrifugiert. Das Sediment wurde 2x mit 100 μl eiskaltem Aceton gewaschen (kräftiges Mixen bis das Pellet vollständig suspendiert war) und erneut zentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet entweder direkt in 10 μl Lämmli Puffer aufgenommen und für 5min bei 100°C gekocht oder in 50mM Kaliumphosphat Puffer (pH=7,4) resuspendiert.

2.4.4 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Jedes Gel bestand aus einem Sammelgel (Ort des Probenauftrags) und einem Trenngel (Ort der elektrophoretischen Auftrennung). Beide Gelsorten wurden getrennt nach dem folgenden Schema angefertigt. Bis auf TEMED und Acrylamid/Bisacrylamid (AA/Bis) wurden alle Komponenten gemischt. TEMED und Acrylamid/ Bisacrylamid (AA/Bis) wurden erst am Ende hinzugeben. Es wurden 10%ige und 15%ige Gele verwendet.

Trenngel	10%	15%
4X LT	3,75ml	5ml
10% APS	75µl	100µl
dest.H₂O	ad 15ml	ad 20ml (4,89ml)
30% AA/Bis	5,00ml	10ml
TEMED	7,5µl	10µl

Sammelgel	5,0%
4X UT	2,5ml
10% APS	50µl
dest.H₂O	ad 10ml (5,85ml)
30% AA/Bis	1,6ml
TEMED	5µl

Die Proteinextrakte wurden mit SDS Gelladepuffer 1:2 verdünnt und 5min gekocht. Anschließend erfolgte der Auftrag der Proben auf die Gele und die elektrophoretische Trennung.

4x Puffer für das Trenngel (LT)

1,5M Tris/Cl, pH=8,8

0,4% SDS

2x SDS Gelladepuffer (Lämmli Puffer)

125mM Tris/Cl, pH=6,8

20% Glycerol

4% SDS

4x Puffer für das Sammelgel (UT)

0,5M Tris/Cl, pH=6,8

0,4% SDS

10% β-Mercaptoethanol

0,004% Bromphenolblau

2.4.5 Nachweis der Proteine mittels Western Blotting und Antikörpern in Hefeextrakten

Die Proteine wurden, nach erfolgter Gelelektrophorese, mittels einer so genannten „SemiDry Blot“-Apparatur auf einer Nitrozellulose(NC)-Membran immobilisiert. Bei diesem Blotting Verfahren werden nur die direkten Bestandteile des Blots (Blotting Papier, NC Membran

und Gel) mit Transferpuffer getränkt. Die gesamte restliche Apparatur bleibt trocken. Der Blot lief über Nacht mit einer Stromstärke von 10mA. Die Membran wurde anschließend 1h in Blotto1 (Zusammensetzung siehe unten) zum Blocken geschwenkt und danach 3x5min in TBST gewaschen. Im Anschluss wurde der Primärantikörper für 2h in einer 1:1000 Verdünnung (in TBST) auf die Membran gegeben. Der Primärantikörper, ein monoklonaler Maus anti-Pk-Tag-IgG-Antikörper (auch V5-IgG-Antikörper genannt; Serotec, Düsseldorf, Deutschland; MCA1360) wurde sowohl für die Proteine aus dem pNMT1-TOPO Vektor als auch für die Proteine aus dem pCAD1 Vektor eingesetzt. Zwischen den Inkubationen mit dem ersten - und zweiten Antikörper wurden die Membranen 3x5min in TBST gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen anti-Maus-IgG-Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert war (Dako, Hamburg, Deutschland; Nr.: P0260), in einer Verdünnung von 1:500 (in TBST), eingesetzt. Die Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper dauerte 1h. Vor der anschließenden Farbreaktion wurde die Membran 3x5min in TBST und 1x5min in PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran in eine Schale mit 25ml frischem PBS gelegt und etwas geschwenkt. Dann wurden 10mg Chlornaphtol, gelöst in 2ml EtOH, auf die Membran gegeben. Die Reaktion wurde nach 10-30min sichtbar. Abschließend wurde die Membran mit dest.H₂O gespült und gescannt (CANON Scanner LIDE 50, Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland).

Transferpuffer

39mM Glycin

48mM Tris/Cl

0,038% SDS

20% MetOH

TBST

10mM Tris/Cl, pH=8,0

150mM NaCl

0,05% Tween 20

Blotto1

1% Milchpulver in TBST

PBS

137mM NaCl

2,7mM KCl

8mM Na₂HPO₄×2H₂O

1,5mM KH₂PO₄

mit HCl auf pH=7,3 einstellen

2.4.6 Aktivitätstest

Aus einer Glycerolkultur wurde eine Platte mit dem zu untersuchendem Stamm vorbereitet und im Brutschrank bei 30°C kultiviert. Mit dem Material dieser Platte wurde die 10ml VK (Medium ohne Thiamin für die Induktion des Promotors) angeimpft und über Nacht im

Schüttler (120U/min, 30°C) inkubiert. Das Material der VK wurde dann in die HK eingesetzt und unter identischen Bedingungen wie die VK kultiviert. Nach Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert (3000g, 5min) und mit 10ml dest.H₂O gewaschen. Am Ende wurden sie immer in Medium ohne Thiamin resuspendiert (Endkonzentration 1*10⁸Zellen/ml) und 10ml dieser Suspension in einem Weithalskolben mit Stopfen kultiviert. Der Aktivitätstest wurde mit Zugabe von 250µl 11-Desoxycortisol (RSS) aus einer 40mM ethanolischen Stammlösung (Endkonzentration 1mM) gestartet. Während der 24stündigen Inkubation wurden die Zellen mit 300U/min bei 30°C geschüttelt. Die Aktivität der Enzyme wurde durch die Quantifizierung der Umsetzung des Substrates RSS zum Produkt Cortisol durch den jeweiligen Stamm ermittelt. Zu den Zeitpunkten 0- und 24h wurden je 500µl Probe entnommen und direkt eingefroren (-20°C). Vor der Analyse wurden die Proben dann aufgetaut und die Steroide extrahiert. Die Analyse des Substratumsatzes erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).

Die radioaktiven Aktivitätstests erfolgten mit einigen Änderungen nach dem oben beschriebenen Schema. Nach dem Starten des Aktivitätstest durch Zugabe von RSS in einer 1mM Endkonzentration wurde auch jeweils 1µl radioaktiven RSS (³H-RSS, Perkin Elmer Life Sciences, Inc. Boston, MA, USA) hinzugefügt. Die Kultivierungsbedingungen wurden, wie oben beschrieben, beibehalten. In diesem Fall erfolgte die Analyse des Substratumsatzes durch Dünnschichtchromatographie (DC).

2.4.7 Steroidextraktion und Probenvorbereitung für die HPLC Analytik

Die Proben aus den Aktivitätstests wurden aufgetaut, zentrifugiert (in einer Tischzentrifuge) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Zu jeder Probe wurden 10µl einer 10mM 11-Desoxycorticosterone (DOC) Stammlösung pipettiert, die als interner Standard fungierte. Die Extraktion begann mit dem Zusatz von 500µl Chloroform. Es wurde 2x20sec kräftig geschüttelt und dann für 2min (in einer Tischzentrifuge) zentrifugiert. Nach Überführung der Chloroformphase in ein neues Gefäß wurden die Extraktionsschritte noch einmal wiederholt. Unter dem Abzug konnte das organische Lösungsmittel dann über Nacht abdampfen. Anschließend wurde das Pellet in 200µl Acetonitril (ACN) resuspendiert und bei 10000g für 15min zentrifugiert. Für die HPLC wurden die Proben dann noch 1:4 mit ACN verdünnt (50µl Probe mit 150µl ACN).

Zur Bestimmung der Retentionszeiten der verschiedenen zu analysierenden Substanzen (DOC, RSS und Cortisol) und des Extraktionsverlustes wurden Proben mit nichtextrahierten Steroiden angesetzt. Dazu wurden 10µl einer 10mM Stammlösung in 190µl ACN verdünnt (1:20). In einem zweiten Verdünnungsschritt wurden diese Proben wie auch alle anderen Proben 1:4 (50µl in 150µl ACN) verdünnt. Die so erzeugten Proben wurden mittels HPLC analysiert.

Zur Bestimmung der Cortisolmenge in den Proben wurde eine Eichgerade verwendet. Die Fläche des Cortisolgipfels im Chromatogramm entspricht der Menge, die an der Eichgerade abgelesen werden kann ($Mol = n_F$). Für die Erstellung der Eichgerade wurden Proben mit verschiedenen Steroidmengen vorbereitet. Aus einer 10mM ethanolischen Stammlösung von Cortisol wurden jeweils 10µl, 5µl, 2,5µl, und aus einer 100µM Stammlösung jeweils 100µl, 50µl, 25µl, 10µl in HPLC Gefäße vorgelegt. Diese Standardproben wurden über Nacht unter einen Abzug abgedampft und dann in 200µl ACN resuspendiert. Die so erzeugte Cortisol Standardgerade enthielt die folgenden Kalibrationspunkte: 5nmol, 2,5nmol, 1,25nmol, 0,5nmol, 0,25nmol, 0,125nmol, 0,05nmol.

Die Bedingungen für die HPLC waren wie folgt:

Säule: Nova-Pak® (Waters), C18 60Å, 4µm, 3,9x150mm, Dimethyloctadecylsilyl bonded amorphous silica

Fließmittel: MetOH:H₂O=60:40

Flussrate: 0,3ml/min

Injektionsvolumen: 10µl

Temperatur: 45°C

Dauer: 15min für die Standardproben, 30min für die anderen Proben

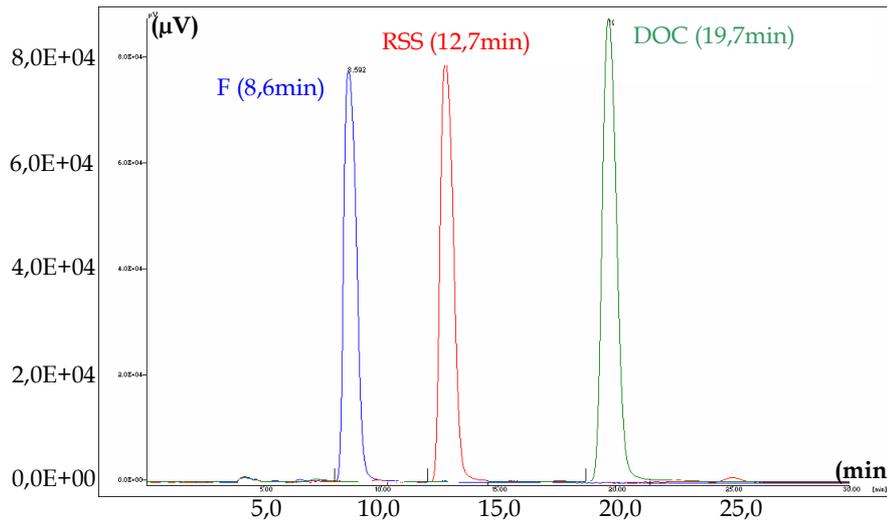


Abb. 2.6: Chromatogramme von Cortisol RSS und DOC mit ihren Retentionszeiten

2.4.8 Steroidextraktion und Probenvorbereitung für die DC Analytik

Den Extraktionsschritten glichen denen des nichtradioaktiven Aktivitätstests. Nach der Gewinnung des Überstandes begann die Extraktion mit dem Zusatz von 500µl Chloroform. Es wurde 2x20sec kräftig geschüttelt und dann für 2min (in einer Tischzentrifuge) zentrifugiert. Nach Überführung der Chloroformphase in ein neues Gefäß wurden die Extraktionsschritte noch einmal wiederholt. Unter dem Abzug konnte das organische Lösungsmittel dann über Nacht abdampfen. Das Pellet wurde in diesem Fall mit 10µl Chloroform versetzt und 10sec kräftig gemischt. Anschließend wurden die ganzen Proben am unteren Rand einer DC Platte (HPLTC Platten, Merck, Darmstadt, Deutschland) direkt aufgetragen. Zur Bestimmung der Laufstrecken der verschiedenen Steroide wurden auch 3µl nichtradioaktives RSS und 3µl nichtradioaktives Cortisol aus einer 10mM ethanolischen Lösung auf die DC Platte pipettiert.

Als Fließmittel für die Trennung der verschiedenen Steroide (Substrat, Produkt, andere Produkte) wurde Chloroform/Methanol/H₂O im Verhältnis 100:6,1:0,3 vorbereitet. Nach der Trennung wurden zuerst die Laufstrecken von RSS und Cortisol bestimmt und danach wurde ein ³H-sensitiven Film (Fuji Imaging Plate Type BAS TR2040, Japan) auf die Platte gelegt. Damit das Signal der radioaktiven Substanzen von Film erfasst werden konnte, betrug die Belichtungszeit drei Tage. Mittels eines Phospho-Imager-System (Imager BAS2500, Fujifilm, Japan) wurde anschließend der Film gescannt und die resultierende Autoradiographie für die Auswertung gespeichert.

2.4.9 Auswertung und Quantifizierung der HPLC Analytik

Nach der Trennung der verschiedenen Proben über eine Umkehrphasen Säule, wurde ein spektrophotometrisches Chromatogramm erzeugt. Diese Chromatogramme wurden mittels des Programms „ChromPass“ (Jasco ChromPass Chromatography Data System, Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Umstadt, Deutschland) ausgewertet. Für jedes Chromatogramm wurde eine Basislinie definiert. Entsprechend den zuvor bestimmten Retentionszeiten für RSS, DOC und Cortisol wurde jeder Gipfel der entsprechenden Substanz zugewiesen und anschließend die Fläche berechnet. Die Auswertung erfolgte in diesen drei Schritten:

1. Berechnung der Cortisolmenge auf der Säule mittels Standardgerade

$$n_{mF} = A_F / \sigma_F \quad (\text{nmol})$$

n_{mF} = Cortisolmenge auf der Säule

A_F = Fläche des Cortisolgipfels in einem Chromatogramm von einer Probe

σ_F = Gefälle der Cortisol Standardgerade

2. Berechnung der Cortisolmenge mit Berücksichtigung des Extraktionsverlustes

$$n_{eF} = [A_{\text{DOC(nicht extrahiert)}} / A_{\text{DOC(extrahiert)}}] \times n_{mF} \quad (\text{nmol})$$

n_{eF} = Cortisolmenge mit Berücksichtigung des Extraktionsverlustes

$A_{\text{DOC(nicht extrahiert)}}$ = Fläche des DOC Gipfels von der nichtextrahierten Probe

$A_{\text{DOC(extrahiert)}}$ = Fläche des DOC Gipfels als interner Standard in der Probe

3. Berechnung der Endkonzentration

$$[F] = n_{eF} \times 160 \quad (\mu\text{M}/\text{Tag})$$

$[F]$ = Cortisolkonzentration in einer Testkultur nach 24h

160 = Summe aller Verdünnungsfaktoren

2.4.10 Auswertung und Quantifizierung der DC Analytik

Die Auswertung der radioaktiven Filme wurde mittels des „TINA 2.10“ Programms (raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland) durchgeführt. Das Programm „TINA2.10“ ermöglicht die Bearbeitung und Auswertung der mit dem Phospho-Imager-System erzeugten Bilder. Zur quantitativen Auswertung existieren mehrere Verfahren. Grundsätzlich wurden bei der Quantifizierung Flächen auf die erkennbaren Banden gelegt und anschließend die Intensität in PSL (photostimulated luminescence; Scanner-spezifische Maßeinheit) in der eingegrenzten Fläche ermittelt (Abb. 2.7).

Prinzipiell gab es zwei verschiedene Möglichkeiten der Quantifizierung. Die erste Möglichkeit bestand darin, dass auf alle Banden einer Spur standardisierte Flächen konstanter Größe gelegt wurden und die Lumineszenzen in diesen Flächen ermittelt wurden. Das Alternativverfahren bestand darin, die Flächen an die Banden exakt anzupassen. Dieses Vorgehen erforderte aber eine Normalisierung bei der eine große Fläche über die gesamte Spur gelegt wurde. Die gesamte Lumineszenz dieser Spur entsprach 100% der Radioaktivität. Für jede Bande wurde dann der relative Anteil an der Gesamtlumineszenz ermittelt.

Für die Berücksichtigung des Hintergrundrauschens bei der Berechnung der Intensitäten besitzt das Programm „TINA2.10“ mehrere Möglichkeiten. Die erste Möglichkeit bestand darin, dass eine Fläche als Hintergrund ausgewählt und automatisch quantifiziert wurde und dann automatisch als Korrektur für alle Banden eingesetzt wurde. Eine zweite Möglichkeit war die manuelle Auswahl der Referenzflächen für die Berechnung des Hintergrunds. Entweder wurden gleiche Flächen in ein Areal gelegt, in dem sich keine Bande befand oder es wurde eine Fläche in der Nähe jeder Spur ausgesucht und diese für die Hintergrundberechnung verwendet.

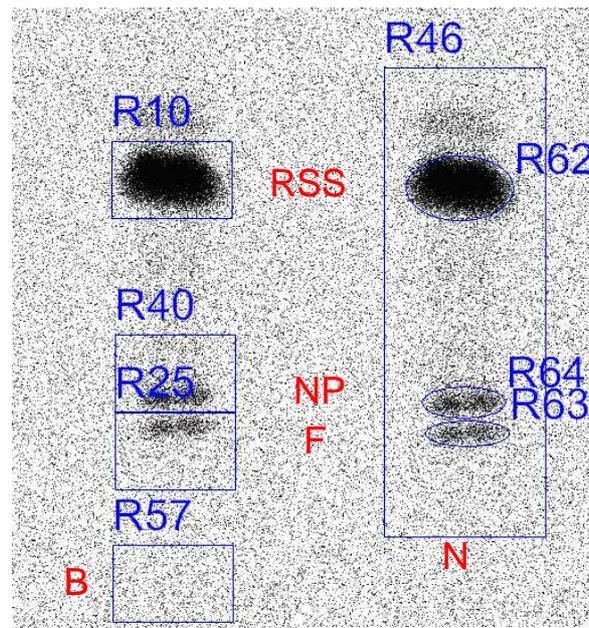


Abb. 2.7: Ausschnitt einer Autoradiographie. Die Abbildung stellt die beiden verschiedenen Quantifizierungsmethoden bei ein und derselben Spur dar. Links wird eine standardisierte Fläche konstanter Größe verwendet. Rechts sind die Flächen an die Banden angepasst und es wird über die gesamte Spur normalisiert. RSS: 11-Desoxycortisol, F: Cortisol, NP: Nebenprodukt, B: Hintergrund, N: Normalisierung

Um eine standardisierte und vergleichbare Quantifizierung zu gewährleisten, wurde außerdem ein Quotient eingeführt, der das Verhältnis der Lumineszenz der Substrat- und Produktbande (also die relative Cortisolproduktion) wiedergab. Basierend auf der bekannten Substratkonzentration, die zu Beginn eingesetzt wurde, wurde dann die gebildete Cortisolkonzentration errechnet. Durch dieses Verfahren konnte das Mitführen einer sehr kostenintensiven Standardkurve vermieden werden.

2.5 Bioinformatischen Methoden

2.5.1 Computergestützte Sequenzanalyse

DNA Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm „BLAST“ (Basic Local Alignment Search Tool, (Tatusova und Madden, 1999), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) durchgeführt. Die multiplen Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe des „ClustalW“ Programms ((Thompson *et al.*, 1994), <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) an dem europäischen Institut für Bioinformatik (European Bioinformatics Institute) erstellt.

2.5.2 Darstellung des Modells

Ein Modell von hsCYP11B1 wurde 2001 von Belkina et al. (Belkina *et al.*, 2001) erzeugt. Dieses Modell ist auf einer Seite die Basis für die Überlegungen über die gerichtete Mutagenese und auf der anderen Seite stellt es mögliche Erklärungen visuell dar.

Die Darstellungen der verschiedenen Bilder wurden mit dem Programm „Swiss-PdB Viewer“ (Guex und Peitsch, 1997) erzeugt. Dieses Programm ist frei zugänglich auf der Internetseite <http://www.expasy.org/spdbv/> .

3 Ergebnisse

3.1 Gerichtete Mutagenese und Klonierung von pCAD1 Mutanten

Das humane CYP11B1 ist ein membrangebundenes Enzym. Es ist oft sehr schwierig, die tertiäre Struktur solcher Enzyme mit einer Methode wie NMR oder Röntgenstrukturanalyse aufzuklären. Deshalb wurde von Belkina et al. ein dreidimensionales Modell, sowohl von hsCYP11B1 als auch von hsCYP11B2, mittels „homology modeling“ entwickelt (Belkina *et al.*, 2001). In der Vergangenheit wurden außerdem verschiedene Mutationen sowohl in hsCYP11B1 als auch in hsCYP11B2 untersucht. Dazu kamen auch andere Untersuchungen an verschiedenen Domänen, wie z.B. Interaktionsdomänen mit ihren Redoxpartnern, die eine Rolle in der Aktivität der CYP11B Enzyme spielen. Das Modell, die Kenntnisse über bekannte Mutationen und der Sequenzvergleich mit Cytochromen P450, bei denen die dreidimensionale Struktur schon aufgeklärt wurde, haben die Grundlagen geschaffen, um die wahrscheinlich relevanten Aminosäuren für eine Steigerung der Aktivität zu identifizieren.

Verschiedene Positionen in der Aminosäuresequenz von hsCYP11B1 wurden anhand ihrer vermutete Bedeutung für die Proteinstruktur für die gerichtete Mutagenese ausgewählt. Anschließend wurden die ausgewählten Mutationen in vier Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe, die so genannte „**I-Helix Gruppe**“, wurde von den beiden Mutationen Ser315Gly und Pro322Ser gebildet (Abb. 3.1). Funktionell spielt die I-Helix eine Rolle bei der Positionierung des Häms sowie der Liganden und beeinflusst damit das katalytische Zentrum des Enzyms (Belkina *et al.*, 2001). CYP11B1 besitzt in der I-Helix mehrere potentielle Biegestellen, die man durch Modifikationen in der Aminosäuresequenz mehr oder weniger stark beeinflussen kann.

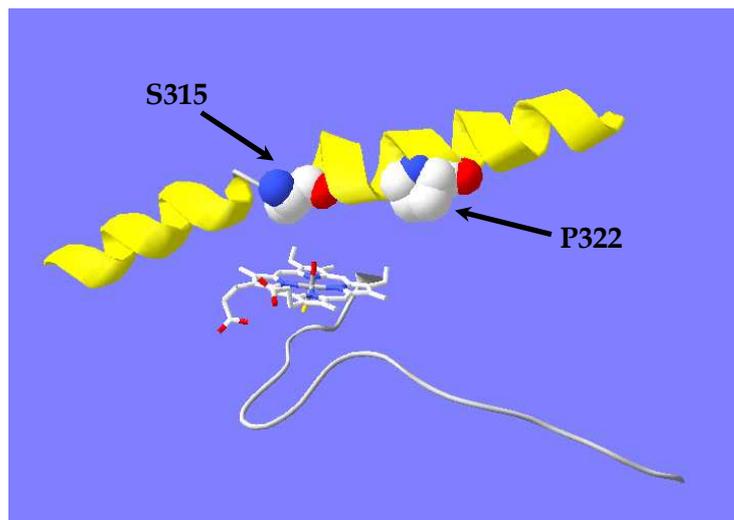


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der I-Helix, des Häms und des Hämbinding Loops mit den potentiellen Positionen für Mutationen (hsCYP11B1 Modell von Belkina et al.)

Eine maximale Freiheit im Rotationswinkel in der I-Helix wird aufgrund der fehlenden Seitenkette und der geringen Größe durch das Glycin in der Position 315 erreicht. Dagegen kann der Knick an Position P322 in der I-Helix durch ein Serin an dieser Stelle beseitigt werden. Dieses Serin hat durch die Möglichkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen einen stabilisierenden Effekt und führt zu einer besseren Kontinuität der I-Helix.

Die zweite Gruppe betrifft Mutationen im Bereich des „**Substrateintrittskanals**“. Der einzige Vertreter dieser Gruppe ist die Mutation Ser112Pro. In CYP11B2 führt die Pro Variante zu einer Erhöhung der 11 β -Hydroxylierungsaktivität. Wahrscheinlich wird durch die Mutation die Konformation des Eintrittskanals so modifiziert, dass der Eintritt des Substrates schneller und leichter erfolgt (Bechtel *et al.*, 2002). Mit dem Ziel, ein vergleichbares Ergebnis auch bei CYP11B1 zu erreichen, wurde dieselbe Mutation auch bei CYP11B1 eingeführt.

Die dritte Gruppe beinhaltet Mutationen der „**Bindungsdomäne**“. Als Teil einer Elektronentransferkette interagiert das Cytochrom mit seinen Redoxpartnern hauptsächlich über eine Bindungsdomäne. Verantwortlich für diese Interaktionen sind verschiedene Eigenschaften der beteiligten Enzyme, wie z.B. strukturelle Anordnungen oder elektrostatische Kräfte. Mutationen an diesen Stellen könnten eine Rolle bei der Elektronenübertragungsgeschwindigkeit spielen und damit den Substratumsatz beeinflussen. Um die Ladung des CYP11B1 zu beeinflussen, wurden verschiedene

Aminosäuren (Leu144, Asn152, Ala279, Asp430 und Ile431) in der Bindungsdomäne ausgewählt und durch ein Lys oder im Falle des Asp430, ein Arg, ersetzt (Abb. 3.2).

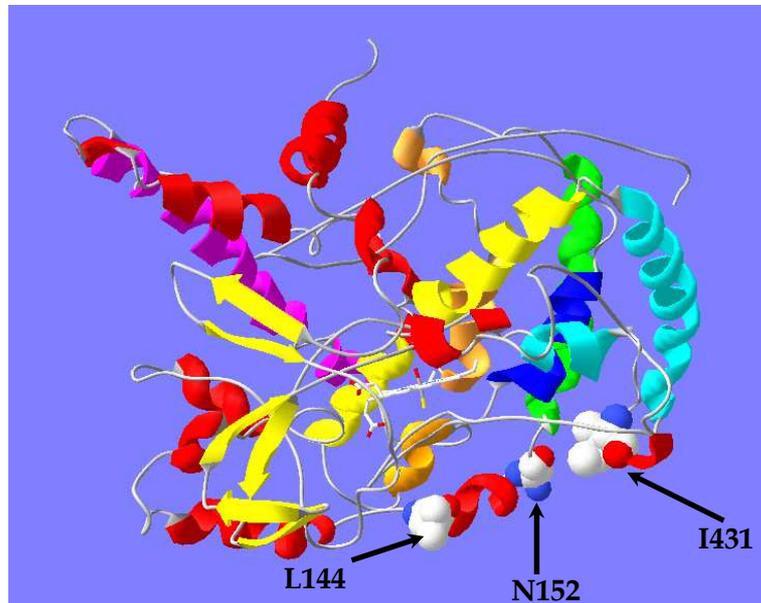


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des hsCYP11B1 Modells von Belkina et al. mit einigen potentiell interessanten Positionen im Bereich der „Bindungsdomäne“ Gruppe

Weiterhin wurde versucht, auch andere strukturelle Eigenschaften zu modifizieren. Die Kontinuität der C-Helix wurde durch die Mutation Pro135Ala wiederhergestellt. Auf einer Seite wurde die Hydrophobizität des β 1-Faltblatt durch die Mutation Ala386Phe erforscht und auf der anderen Seite wurde die Rolle aromatischer Aminosäuren im Elektronentransport durch die Mutation Phe445Trp geprüft (Abb. 3.3).

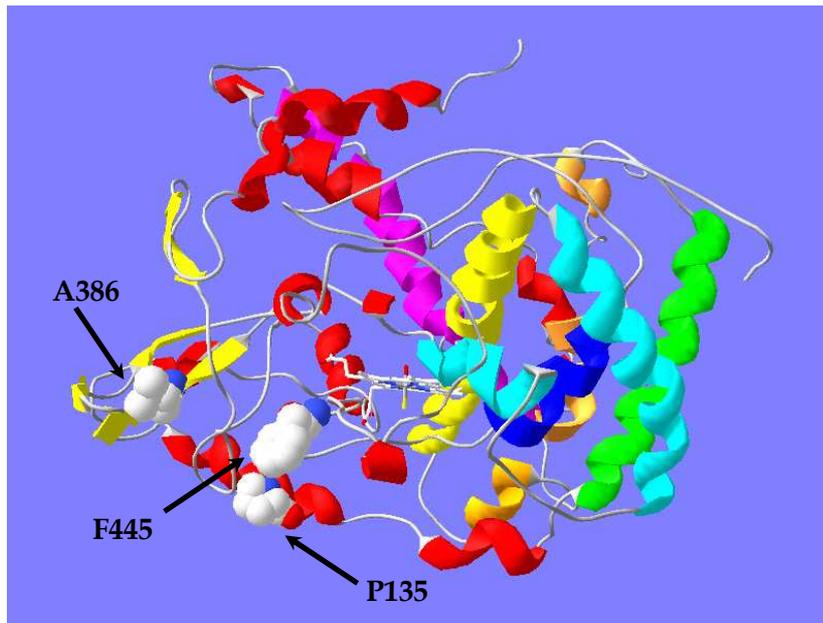


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des hsCYP11B1 Modells von Belkina et al. mit einigen potentiell interessanten Positionen aus der „Bindungsdomäne“ Gruppe

Die vierte Gruppe umfasst „**genetische Varianten**“, die einige der zahlreichen bereits beschriebenen Polymorphismen in der Sequenz des humanen CYP11B1 beinhaltet. Dabei wurde mit einer CYP11B1 Variante gearbeitet (Hampf, 2001), die sich an zwei Positionen von der publizierten Sequenz von Mornet et al. (Mornet *et al.*, 1989) unterscheidet (Abb. 3.4). Für die Analyse wurden entweder Met52 in Leu oder Val78 in Ile rückmutiert. Darüber hinaus wurde auch eine Sequenz, die beide Mutationen gleichzeitig enthielt, analysiert. Außerdem wurde die Bedeutung der bereits in CYP11B2 untersuchten Position 185 (Thr185 → Ile) analysiert (Abb. 3.4).

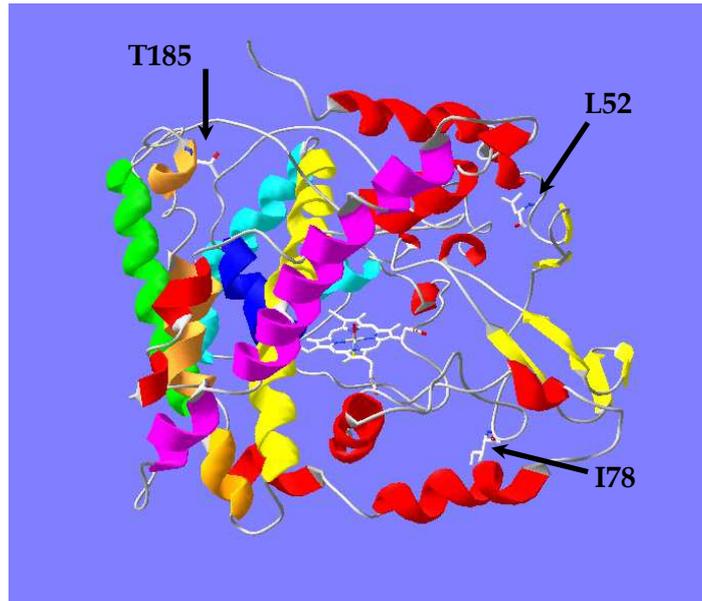


Abb. 3.4: Schematische Darstellung des hsCYP11B1 Modells von Belkina et al. mit den entsprechenden Mutationen aus der Gruppe der „genetische Varianten“

Die verschiedenen Mutationen wurden durch PCR-vermittelte Mutagenese (QuikChange™) des Plasmides pCAD1-CYP11B1 hergestellt. Für die Sequenz mit den zwei Mutationen (M52LV78I, auch als Doppelmutante bezeichnet) wurde die gerichtete Mutagenese zweimal hintereinander mit den jeweiligen Primern durchgeführt.

Einige der Primer für bestimmte Mutationen enthalten Sequenzen, um Schnittstellen für Restriktionsenzyme einzufügen oder zu entfernen (Tab. 3.1). Das Ergebnis der Mutagenese wurde mittels Restriktionsanalysen direkt nach der Amplifikation sowie nach der Präparation des Plasmides überprüft (Abb. 3.5).

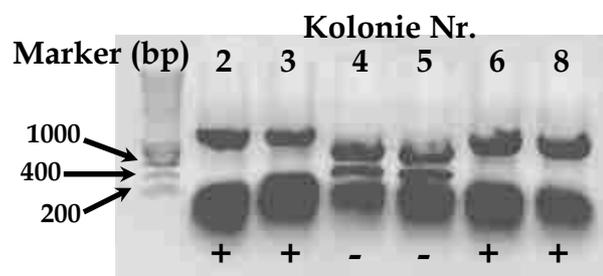


Abb. 3.5: Beispiel eines Verdau direkt im Anschluss an die gerichtete Mutagenese (T185I). Jede Spur entspricht eine Kolonie. +: positiver Klon (erwartete Anzahl an Banden); -: negativer Klon.

Tab. 3.1: Liste der Mutanten (rot: I-Helix, violett: Substrateintrittskanal, grün: genetische Varianten, blau: Bindungsdomäne) mit den jeweiligen Restriktionsenzymen

Mutation	Gruppe	Restriktionsenzym
Met52Leu	Genetische Varianten	BglII (weg)
Val78Ile	Genetische Varianten	Keine
Met52Leu, Val78Ile	Genetische Varianten	BglII (weg)
Ser112Pro	Substrateintrittskanal	NcoI (neu)
Pro135Ala	Bindungsdomäne	Keine
Leu144Lys	Bindungsdomäne	Keine
Asn152Lys	Bindungsdomäne	Keine
Thr185Ile	Genetische Varianten	SmaI (weg)
Ala279Lys	Bindungsdomäne	BglII (neu)
Ser315Gly	I-Helix	SalI (neu)
Pro322Ser	I-Helix	SalI (neu)
Ala386Phe	Bindungsdomäne	Xho (neu)
Asp430Arg	Bindungsdomäne	BamHI (neu)
Ile431Lys	Bindungsdomäne	BamHI (neu)
Phe445Trp	Bindungsdomäne	SphI (weg)

Die so generierten Plasmide wurden anschließend zur Bestätigung der eingeführten Mutationen sequenziert. Die Sequenzierung von pCAD1-CYP11B1 zeigt die gleichen Unterschiede zur Sequenz von Kawamoto et al. (Kawamoto *et al.*, 1990b), die auch in pNMT1-TOPO gefunden wurden (Tab. 3.3). Die Position 702 blieb aber unverändert und war wie bei Kawamoto et al. durch ein C besetzt. Diese Sequenz dient als Referenz für die Untersuchungen mit dem pCAD1 Plasmid.

3.2 Klonierung von CYP11B in pNMT1-TOPO

Die Unterfamilie der CYP11B Enzyme existiert auch in andere Organismen. Dabei gibt es die Situation, in der wie beim Menschen zwei verschiedene Isoformen existieren oder nur eine Isoform. Die zu katalysierenden Reaktionen sind immer gleich: zum einen die Umwandlung von 11-Desoxycorticosterone (DOC) zu Aldosteron und auf der anderen Seite von 11-Desoxycortisol (RSS) zu Cortisol. Es wurde für die verschiedenen Organismen noch nicht ausführlich geklärt, was für eine Rolle diese Enzyme in ihrer Physiologie spielen. Wenn man aber die Möglichkeit hätte, das Verständnis ihre Eigenschaften zu kennen, hätte man auch die Möglichkeit, mehr Informationen zu erhalten, wie sie arbeiten (Substratspezifität, Einfluss von Aminosäuren auf die Aktivität und die Bindung mit dem Redoxpartner).

Aus der am Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes in Saarbrücken zur Verfügung stehenden Sammlung von Plasmiden, die cDNA der Enzyme CYP11B1 und CYP11B2 von verschiedenen Organismen enthalten, wurden 8 Plasmide ausgewählt (Tab. 3.2), die als Template für die Amplifizierung und die anschließende Klonierung in den pNMT1-TOPO Expressionsvektor verwendet wurden. Die Primer für die Amplifizierung wurden so gewählt, dass alle CYP11Bs das Signalpeptid und das Ende des humanen CYP11B2-Gens enthielten (Abschnitt 2.1.3).



Abb. 3.6: Schema der amplifizierten CYP11B Sequenzen aus verschiedenen Organismen

Die Funktionalität der mitochondrialen Importsequenz von hsCYP11B2 wurde bereits von Bureik et al. gezeigt (Bureik *et al.*, 2002b). Die Einführung einiger hsCYP11B2 Aminosäuren am C-Terminus sollte keinen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme haben. Tatsächlich wurde schon gezeigt, dass Reste am C-Terminus keine große Rolle in der Stereo- und Regioselektivität der Hydroxylierungsreaktionen spielen (Bottner *et al.*, 1998). Diese Maßnahmen ermöglichen einen besseren Vergleich zwischen den Enzymen. Alle Proteine werden unter denselben Bedingungen exprimiert und getestet.

Tab. 3.2: Liste der verwendeten cDNAs und ihren Ursprungsplasmide

cDNA von:	Organismus	Autor	Plasmid
hsCYP11B1 (hsB1)	Mensch	Denner K.	pcDNA3.1-NT-GFP-TOPO
hsCYP11B2 (hsB2)	Mensch	Denner K.	pcDNA3.1-NT-GFP-TOPO
hsCYP11B2 ^{P112IE147D} (hsB2m)	Mensch	Bechtel S.	pcDNA3.1-NT-GFP-TOPO
phCYP11B1 (phB1)	Affe	Hampf M.	pCR-BluntII-TOPO
btCYP11B1 (btB1)	Rind	Fujii-Kuriyama Y.	pCR-BluntII-TOPO
rnCYP11B1 (rnB1)	Ratte	Okamoto M.	pcDNA3.1-NT-GFP-TOPO
cpCYP11B1 (cpB1)	Meerschweinchen	Bülow H.E.	pHBL5
cpCYP11B2 (cpB2)	Meerschweinchen	Bülow H.E.	pCR2.1/HG17

Nach erfolgreicher Amplifikation (Abb. 3.7) wurden alle inserierten cDNAs über die TOPO Klonierungsstelle in den pNMT1-TOPO Vektor kloniert und sequenziert.

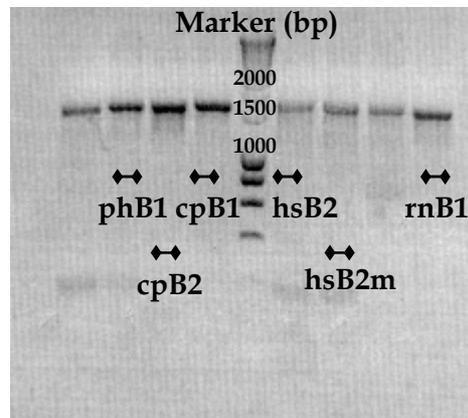


Abb. 3.7: Beispiel einer Amplifikation von cDNA aus Affe, Mensch und Meerschweinchen

Anschließend wurden in einem Vergleich mit den jeweiligen publizierten Sequenzen konfrontiert und näher charakterisiert. Die gefundenen Unterschiede für alle CYP11B1 DNAs, die nach der Klonierung in dem pNMT1-TOPO Vektor vorhanden waren, sind in Tab. 3.3 aufgelistet.

Tab. 3.3: Vergleich der verschiedenen CYP11B1 DNA-Sequenzen, die in den pNMT1-TOPO Vektor kloniert wurden, mit den entsprechenden Referenzsequenzen (CDS) aus der Literatur. Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind rot markiert und die entsprechenden Literaturstellen in der letzten Spalte aufgeführt.

cDNA von:	Referenz	Nukleotide	Aminosäure	Literatur
hsCYP11B1 (Mensch)	(Kawamoto <i>et al.</i> , 1990b) CDS von X55764	a128g c154a g225a a232g t702c t888c c1086g t1157c	Gln43 Arg Leu52 Met Leu75Leu Ile78 Val Thr234Thr Asn296Asn Leu362Leu Val386 Ala	(Mornet <i>et al.</i> , 1989) (Hampf, 2001) (Hampf, 2001) (Hampf, 2001) (Hampf, 2001) (Hampf, 2001) (Mornet <i>et al.</i> , 1989)
hsCYP11B2 (Mensch)	(Kawamoto <i>et al.</i> , 1990a) CDS von D13752	g873a a1120c	Ala291Ala Ala374Ala	
hsCYP11B2 ^{P112IE147D} (Mensch)	(Kawamoto <i>et al.</i> , 1990a) CDS von D13752 mutiert	g873a c918a a1120c	Ala291Ala Ala306Ala Ala374Ala	
phCYP11B1 (Affe)	(Hampf <i>et al.</i> , 1996) CDS von U52085	t399c a450g a492g g529g a543g g546c c798t	Asn133Asn Ser150Ser Val164Val Val177 Leu Arg181Arg Glu182 Asp Tyr266Tyr	(Hampf, 2001) (Hampf, 2001) (Hampf, 2001) (Hampf, 2001) (Hampf, 2001) (Hampf, 2001) (Hampf, 2001)
btCYP11B1 (Rind)	(Morohashi <i>et al.</i> , 1987) CDS von D00361	t89c g178a g317a t324c t399c c1368t	Val30 Ala Gly60 Ser Arg106 His Pro108Pro Asn133Asn Ala456Ala	(Morohashi <i>et al.</i> , 1987) (Chua <i>et al.</i> , 1987) (Morohashi <i>et al.</i> , 1987) (Morohashi <i>et al.</i> , 1987) (Chua <i>et al.</i> , 1987) (Morohashi <i>et al.</i> , 1987) (Chua <i>et al.</i> , 1987) (Morohashi <i>et al.</i> , 1987) (Chua <i>et al.</i> , 1987)
rnCYP11B1 (Ratte)	(Matsukawa <i>et al.</i> , 1993) CDS von D11354	-	-	-

cDNA von:	Referenz	Nukleotide	Aminosäure	Literatur
cpCYP11B1 (Meerschweinchen)	(Bulow <i>et al.</i> , 1996) CDS von Z69785	-	-	-
cpCYP11B2 (Meerschweinchen)	Bülow, HE CDS von AF018569	-	-	-

Darüber hinaus wurden alle CYP11B DNAs auch in ihren Ursprungsplasmiden sequenziert. Hierbei ergaben sich bei phCYP11B1 im Ursprungsplasmid 4 Unterschiede zu der von Hampf (1996) publizierten Nukleotidsequenz (c38t, a39g, t49g, g1501t), die zu folgenden Änderungen in der Aminosäuresequenz führten: Ala13Val (c38t, a39g), Ser17Ala (t49g), Ala501Ser (g510t). Diese Unterschiede besitzen jedoch keine praktische Relevanz, da sie sich im Bereich der Primer-Bindungsstellen befinden, und im pNMT1-TOPO Vektor diese Abschnitte durch die hsCYP11B2 Sequenz ersetzt wurde. Weitere Abweichungen fanden sich in hsCYP11B2m: g548a,Ser189Asn; a893t,Glu298Val. Diese ließen sich aber in der Sequenzierung von pNMT1-TOPO nicht bestätigen. Alle anderen Sequenzen zeigten keinen Unterschied zur Sequenz in pNMT1-TOPO.

In der Vergangenheit wurden bereits zahlreiche Polymorphismen im CYP11B1 Gen beschrieben, die als Ursache für die zahlreichen Verschiedenheiten in der Aminosäuresequenz anzusehen sind. In dieser Arbeit dient die sequenzierte humane CYP11B1 Sequenz als Referenz für alle Experimente, sowohl die mit dem pCAD1 Vektor als auch die mit dem pNMT1-TOPO Vektor. Die hier eingesetzte humane CYP11B1 Sequenz unterscheidet sich von der Sequenz von Kawamoto *et al.* (Kawamoto *et al.*, 1990b) an verschiedenen Stellen. Zwei dieser Mutationen finden sich bereits in der von Mornet *et al.* (Mornet *et al.*, 1989) publizierten Sequenz wieder. Fünf weitere wurden von Hampf in seiner Doktorarbeit beschrieben (Hampf, 2001). Die t702c-Mutation wurde bisher nicht beschrieben, so dass vermutet werden muss, dass diese Mutation durch die PCR Amplifizierung in das Produkt integriert wurde. Gleiches gilt auch für die bisher nicht veröffentlichten Mutationen in hsCYP11B2, phCYP11B1 und btCYP11B1.

Von besonderem Interesse waren die Mutationen M52L und V78I im Vektor pCAD1. Sie wurden deshalb auch in den hsCYP11B1 enthaltenden pNMT1-TOPO Vektor kloniert. Es wurden zwei Vektoren konstruiert, die die Sequenz mit diesen zwei Mutationen enthalten. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Vektoren ist, dass jeweils zwei verschiedene Importsequenzen für die Mitochondrien ausgewählt wurden. Einmal wurde die hsCYP11B1 eigene Importsequenz kloniert und das zweite Mal wurde die Importsequenz von

hsCYP11B2 kloniert. Diese Experimente sind aufgrund der Tatsache, das pCAD1 ein Integrationsvektor ist und pNMT1-TOPO einen autosomal replizierenden Vektor darstellt, von besonderem Interesse. Aufgrund dieser prinzipiellen Unterschiede könnte man auch Unterschiede in der Proteinexpression und letztendlich in der Enzymaktivität erwarten. Außerdem können Erkenntnisse über die Regulation des Imports von Proteinen in *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) Mitochondrien gewonnen werden.

3.3 Generierung der pCAD1- und pNMT1-TOPO Stämme

Zur Analyse der Hydroxylierungsaktivitäten wurden Hefezellen (*S. pombe*) transformiert. Das pCAD1 Plasmid wurde für die Varianten aus der gerichteten Mutagenese benutzt. Es ist ein Expressionsplasmid, das zur Integration der gewünschten DNA in ein Chromosom dient. Diese verschiedenen generierten Plasmide wurden zur Transformation des Stammes MB163 eingesetzt. Insgesamt wurden 15 Stämme generiert (Tab. 3.4), die alle den Genotyp *leu1⁻, ura4⁺* zeigten. Wurden sie auf Platten ohne Leu kultiviert, zeigte sich kein Wachstum.

Tab. 3.4: Liste der in pCAD1 erzeugten Mutationen und der dazugehörigen MB163 Stämme

Mutation	Stamm	Gruppe
Met52Leu	SZ52	Genetische Varianten
Val78Ile	SZ78	Genetische Varianten
Met52Leu, Val78Ile	SZ1	Genetische Varianten
Ser112Pro	SZ112	Substrateintrittskanal
Pro135Ala	SZ135	Bindungsdomäne
Leu144Lys	SZ144	Bindungsdomäne
Asn152Lys	SZ152	Bindungsdomäne
Thr185Ile	SZ185	Genetische Varianten
Ala279Lys	SZ279	Bindungsdomäne
Ser315Gly	SZ315	I-Helix
Pro322Ser	SZ322	I-Helix
Ala386Phe	SZ386	Bindungsdomäne
Asp430Arg	SZ430	Bindungsdomäne
Ile431Lys	SZ431	Bindungsdomäne
Phe445Trp	SZ445	Bindungsdomäne

Das pNMT1-TOPO Plasmid wurde für die CYP11B Varianten aus den verschiedenen Organismen benutzt. In diesem Fall wurden durch die Transformation des Hefestammes MB175 insgesamt neun neue Stämme generiert, die in Tab. 3.5 aufgelistet sind. Die inserierten Sequenzen kodierten für verschiedene CYP11B Proteine, die durch Regulation spezifischer Promotoren (in diesem Fall des *nmt1* Promotors für Thiamin-induzierte

Expression (Maundrell, 1990), (Basi *et al.*, 1993)) in *S. pombe* exprimiert wurden. Trotz wiederholter Versuche gelang es nicht, einen Stamm zu erzeugen, der die Expression des bovinen CYP11B1 ermöglichte.

Tab. 3.5: Liste der durch Transformation des Hefestammes MB175 mit diversen CYP11B-Sequenzen erzeugten neuen Stämme inklusive der darin enthaltenen cDNA

cDNA von:	Organismus	Stamm
hsCYP11B1 (hsB1)	Mensch	HSB1
hsCYP11B2 (hsB2)	Mensch	HSB2
hsCYP11B2 ^{P112IE147} (hsB2m)	Mensch	HSB2M
phCYP11B1 (phB1)	Affe	PHB1
rnCYP11B1 (rnB1)	Ratte	RNB1
cpCYP11B1 (cpB1)	Meerschweinchen	CPB1
cpCYP11B2 (cpB2)	Meerschweinchen	CPB2
hsCYP11B1 ^{M52LV78I} (Präsequenz von hsCYP11B2)	Mensch	SZ1A
hsCYP11B1 ^{M52LV78I} (Präsequenz von hsCYP11B1)	Mensch	SZ1B

Das Plasmid pNMT1-TOPO enthält das *S. cerevisiae* *LEU2* Gen, das die auxotrophe Selektion des Plasmides in *leu1*- Stämme ermöglicht (Andreadis *et al.*, 1984). Alle generierten Stämme können in minimalem Medium ohne Leu wachsen (Leu Prototrophie).

3.4 Optimierung des Aktivitätstests

Für den Nachweis der Aktivität der Enzyme der CYP11B Familie (Umsetzung von RSS zu Cortisol) in *S. pombe* ist der Einsatz eines geeigneten Aktivitätstests von besonderer Wichtigkeit. Ein optimaler Aktivitätstest sollte sich durch eine hohe Trennqualität, eine gute Reproduzierbarkeit und eine zuverlässige Quantifizierungsmethode auszeichnen. Deshalb wurden vor Beginn der eigentlichen Testungen Versuche durchgeführt, die der Methodenoptimierung dienten. Zunächst wurden diverse Messbedingungen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) Analytik, wie z.B. Zusammensetzung des Fließmittels, Fließgeschwindigkeit und Detektionswellenlänge, modifiziert und getestet. Anschließend erfolgte ein Vergleich zwischen radioaktiver Dünnschichtchromatographie (DC) und HPLC. Abschließend wurde ein standardisierter Algorithmus zur Quantifizierung der Chromatogramme erarbeitet.

3.4.1 Vergleich zwischen HPLC und DC

Da in der vorliegenden Arbeit viele verschiedene Hefestämme getestet werden sollten, wurde bei diesem Vergleich ein besonderes Augenmerk auf eine gute **Trennqualität**, eine hohe **Reproduzierbarkeit** und eine zuverlässige **Quantifizierung** gelegt.

Jeder Aktivitätstest wurde mehrmals nach dem im Abschnitt 2.4.6 beschriebenen Standardschema sowohl für die HPLC als auch für die DC wiederholt. Zum Vergleich wurde ein etablierter Referenzstamm, in diesem Falle der CAD1 Stamm, verwendet. Neben CAD1 wurden auch weitere Stämme, wie z.B. MB175 und die Stämme mit dem pNMT1-TOPO Vektor, mittels DC getestet. Die Methoden für die HPLC-Analytik sind im Abschnitt 2.4.7 und die für die DC-Analytik im Abschnitt 2.4.8 ausführlich beschrieben. Auswertungs- und Quantifizierungsmethoden werden in den Abschnitten 2.4.9 (HPLC) und 2.4.10 (DC) dargestellt.

Trennqualität: Bei der Extraktion der Steroide aus dem Kulturüberstand wurde zusätzlich eine ganze Reihe weiterer Produkte extrahiert, die dem Stoffwechsel der Hefen entstammen. Als Konsequenz sind auf den Chromatogrammen viele Gipfel zu erkennen, die man nicht ohne weiteres einem spezifischen Produkt zuordnen kann (Abb. 3.8.A). Eine weitere Fraktion dieser Nebenprodukte entsteht aus RSS (Abb. 3.8.B). Auf den Autoradiographien des Stammes MB175 sind z.B. mehrere Flecken zu sehen, die eindeutig aus dem radioaktiven RSS entstammen, da nur dieses Radioaktivität enthält und somit die aus ihm hervorgehenden Produkte markiert.

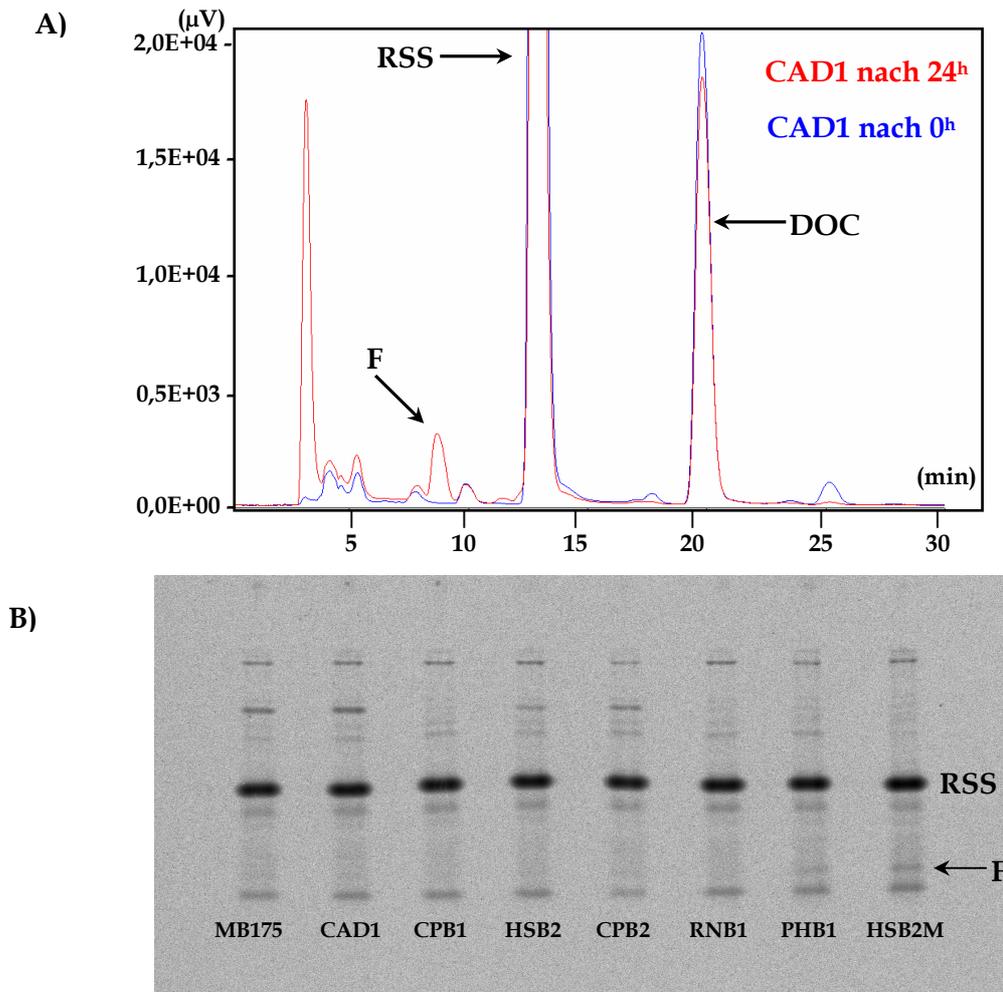


Abb. 3.8: Beispiel eines HPLC Chromatogramms (A) und eines Autoradiogramms (B) aus verschiedenen Stämmen. Nur die erkennbare Substanzen (RSS, DOC und F) werden gezeigt. Alle andere Gipfel (in A) und Banden (in B) beziehen sich auf unbekannte Substanzen

Sehr oft sind die Banden, die man auf dem Film einer Autoradiographie sieht, sehr eng zusammen. Diese eng beieinander liegenden Banden machen eine korrekte Positionierung der Regionen für die Quantifizierung schwierig. Es können Anteile verloren gehen (falsch niedrige Konzentrationen), oder Anteile einer Nachbarbande in die Berechnung einbezogen werden (falsch hohe Konzentrationen). Im Gegensatz dazu waren nach Abschluss der Optimierung der Trennbedingungen für die HPLC (siehe Abschnitt 3.4.2) die einzelnen Gipfel der diversen Steroide klar erkennbar. Insbesondere der für die Analyse der 11 β -Hydroxylierungsaktivität wichtige Cortisolgipfel stellte sich nach der Optimierung gut dar. Mit dem eingesetzten Auswerteverfahren wird eine objektive, personenunabhängige Quantifizierung gewährleistet.

Auswertung: Um das bestmögliche Verfahren zu ermitteln, wurden im Rahmen der Vorarbeiten Vergleichsmessungen durchgeführt. Es wurden zunächst die beiden

Auswerteverfahren der DC (Abschnitt 2.4.10) gegenübergestellt und dann mit der Auswertung der HPLC (Abschnitt 2.4.9) verglichen.

Das erste DC Verfahren birgt jedoch das Risiko, dass entweder alle oder einzelne Flächen zu klein gewählt werden und somit Intensität verloren geht, oder die Flächen zu groß sind und es zu einer Kontamination aus der Nachbarbande kommt. Das Problem beim zweiten Verfahren besteht darin, dass bei großen Unregelmäßigkeiten auf dem Film die Korrektur mittels Normalisierung für eine korrekte Auswertung nicht ausreicht. Das gleiche Problem findet sich bei der Korrektur des Hintergrundes. Bei guter Filmqualität (keine Unregelmäßigkeiten oder Flecken) beeinflusst das gewählte Verfahren das Ergebnis nicht. Bei inhomogenen Filmen aber treten erhebliche Schwankungen auf.

Obwohl es theoretisch zwischen Dünnschichtchromatographie und HPLC keine großen Unterschiede bei der Ermittlung der Cortisolproduktion geben sollte, traten in der Praxis ganz erhebliche Differenzen auf. Da bei der Analyse der Autoradiographien die aus dem radioaktiven Substrat entstandenen Nebenprodukte nicht in die Berechnung der Verhältnisse einfließen, liegt die Vermutung nahe, dass sich die beobachteten Unterschiede durch die Nichtberücksichtigung dieser Nebenprodukte erklären. In einem Pilotversuch mit Zelllysaten konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Großteil des Substrates in den Zellen zurückgehalten wird. Dadurch ergibt sich bei der Kalkulation des Quotienten aus Substrat und Produkt ein falsch niedriger Zähler, der zu einer massiven Überschätzung der Cortisolproduktion führt. Die Ergebnisse aus beiden Messverfahren werden vergleichbar, wenn bei der HPLC-Analytik die Berechnung der Cortisolproduktion ebenfalls über einen Quotienten aus Substrat und Produkt erfolgt.

Eine hohe **Reproduzierbarkeit** wird durch eine adäquate Qualitätskontrolle sichergestellt. Das bedeutet, dass in jedem Lauf eine Kontrollprobe mit bekannter Konzentration mitgeführt wird. Aus den täglich analysierten Kontrollwerten kann dann die Präzision und Richtigkeit der jeweiligen Methode ermittelt werden. Aus Kostengründen konnte eine solche Qualitätskontrollprobe bei den radioaktiven Versuchen nicht mitgeführt werden. Da nach dem Methodenvergleich zwischen HPLC und DC die HPLC den Vorzug erhielt, war diese Kontrolle im weiteren Verlauf aber nicht notwendig. Die Reproduzierbarkeit der HPLC wurde dadurch sichergestellt, dass von den Proben der Standardgerade eines jeden Laufes die Fläche unter der Kurve ermittelt wurde und daraus der Mittelwert und die Abweichung vom Mittelwert berechnet wurden. Durch dieses Vorgehen konnte trotz fehlender Kontrollprobe eine gute Präzision und Richtigkeit garantiert werden (Abb. 3.9).

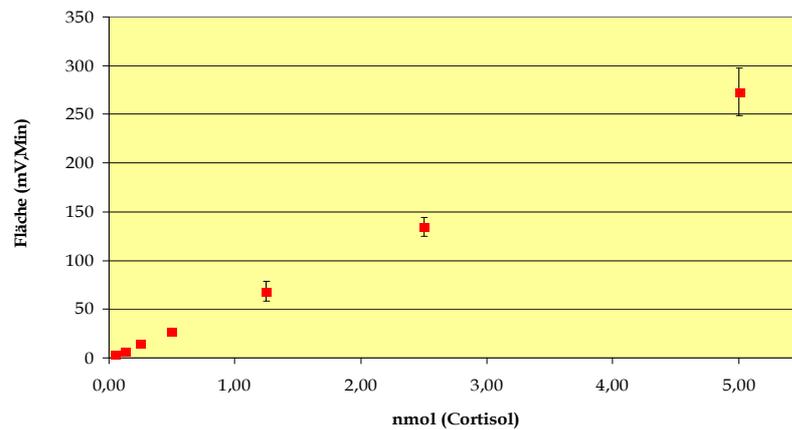


Abb. 3.9: Mittelwerte der verschiedenen Cortisolmengen in der Standardgerade und ihre Standardabweichungen

In dieser Grafik sind Mittelwerte aus neun unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Werte liegen für die verschiedenen Konzentrationen nah beieinander. Für jedes Experiment wurde eine Standardgerade erzeugt, aus deren Steigung und Schnittpunkt mit der Y-Achse die Cortisolkonzentration berechnet wurde. Eine gute Reproduzierbarkeit drückt sich auch dadurch aus, dass die Steigung der Eichgerade von Experiment zu Experiment in etwa vergleichbar ist. In Tab. 3.6 sind die Steigungswerte mit ihrem Korrelationskoeffizienten (R^2) dargestellt.

Tab. 3.6: Steigungswerte und R^2 der Eichgeraden von neun verschiedenen Experimenten. Die letzte Zeile gibt die resultierenden Mittelwerte und ihre Abweichung an

Steigung	R^2
49,709	0,9988
52,522	0,9985
55,936	0,9887
49,178	0,9961
57,881	0,9964
59,461	0,9970
53,812	0,9996
59,534	0,9985
57,864	0,9994
MW±SD	55±1

Alle generierten Kurven hatten ähnliche Steigungen. Außerdem ist der R^2 -Wert für jede einzelne Kurve sehr hoch; alle R^2 -Werte waren annähernd 1. Der R^2 -Wert ist Ausdruck dafür, wie gut die Punkte der einzelnen Kalibratoren auf einer Gerade liegen. Werte, die sich 1 nähern, bedeuten eine sehr gute Korrelation und Werte, die in der Nähe von 0 liegen, weisen auf eine große Streuung hin. Aus dem Vergleich der Eichgeraden lässt sich ableiten, dass die HPLC-Analytik eine sehr hohe Reproduzierbarkeit und somit eine korrekte Berechnung der Cortisolkonzentration in jedem Test ermöglicht. Die verschiedenen Teste sind deshalb gut miteinander verglichen werden.

Die Hefe-Zellen wiesen bezüglich der Cortisolproduktion eine besonders große Variabilität auf, wie an den Daten des Referenzstammes CAD1 zu sehen ist (Abb. 3.10). Die Hefe Stämme sind jedoch biologische Organismen und keine geschlossenen Systeme. Obwohl standardisierte Bedingungen für alle Stämme benutzt wurden, hatten die einzelnen Aktivitätsteste eine große Varianz. Um diese Effekte zu minimieren, und die Unterschiede zwischen den Stämmen besser herausarbeiten zu können, wurde der Referenzstamm (Stamm HSB1 für die pNMT1-TOPO transformierten Stämme und Stamm CAD1 für die pCAD1 transformierten Stämme) als 100% eingesetzt und die mutierten Stämme darauf bezogen.

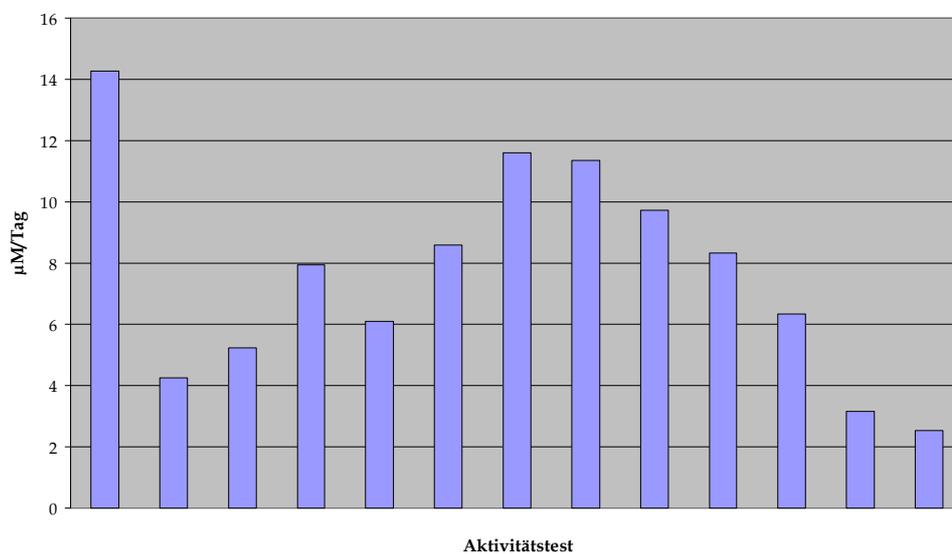


Abb. 3.10: Cortisol Produktion des CAD1 Stammes in verschiedenen Aktivitätstests unter Standardbedingungen. Testkultur: 1×10^8 Zellen/ml, 10 ml Kultur; Schüttelbedingungen: 300U/min bei 30°C; Substratkonzentration: 1mM RSS; Zeit; 24h; Analyse des Substratumsatzes: HPLC Analytik

3.4.2 Optimierung der HPLC Bedingungen

Steroide sind stark hydrophobe Substanzen. Unter den verschiedenen Steroiden sind die Unterschiede bzgl. der Hydrophobie jedoch relativ klein. Die in dieser Arbeit verwendeten Steroide (F, RSS und DOC) unterscheiden sich lediglich durch die Anwesenheit einer oder zweier OH-Gruppen in verschiedenen Positionen. Die restliche Struktur ist für alle drei Steroide identisch. Aufgrund der kleinen Unterschiede ist für eine saubere Trennung die Wahl des geeignetsten Fließmittels von besonderer Wichtigkeit. Verschiedene Kombinationen organischer und anorganischer Fließmittel wurden ausprobiert. Im Beispiel von Abb. 3.11 sind zwei Kombinationen beschrieben: ACN:H₂O im Verhältnis 40 zu 60 und MetOH:H₂O in Verhältnis 60 zu 40.

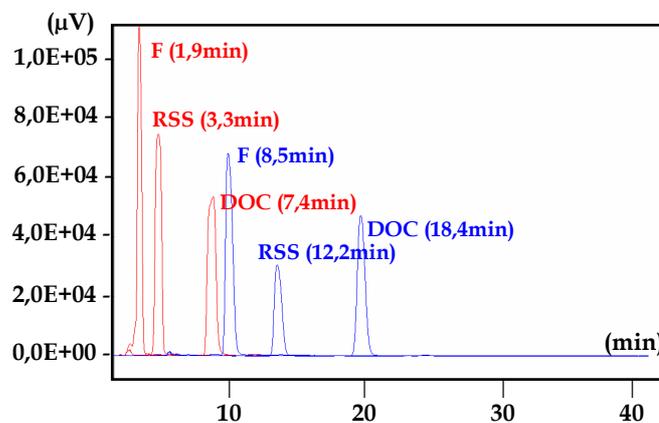


Abb. 3.11: Überlagerung zweier Chromatogramme in denen jeweils ein Mix aus F, RSS und DOC mit verschiedenen Fließmitteln aufgetrennt wurde. **Rot:** Fließmittel ACN:H₂O=40:60, **blau** Fließmittel MetOH:H₂O=60:40

Betrachtet man die Gipfel der zu analysierenden Substanzen, so ist die Trennung bei beiden Fließmitteln gut (Abb. 3.11). Bei MetOH:H₂O=60:40 trennen sich die Steroide jedoch etwas besser als in ACN:H₂O=40:60. Jedoch verlängert die Verwendung von MetOH die Laufzeit auf das Vierfache. Cortisol wird nach etwa 8,5 min von der Säule eluiert. Im Vergleich dazu liegt die Retentionszeit bei der Verwendung von ACN:H₂O=40:60 als Fließmittel bei 1,9 min. Die Verlängerung der Retentionszeit hat jedoch für die Proben aus den Aktivitätstests einen positiven Effekt. Da bei diesen Proben auch erhebliche Mengen an anderen Substanzen extrahiert wurden ist der Gewinn an Trennqualität für die Analytik dieser Proben essentiell (Abb. 3.12).

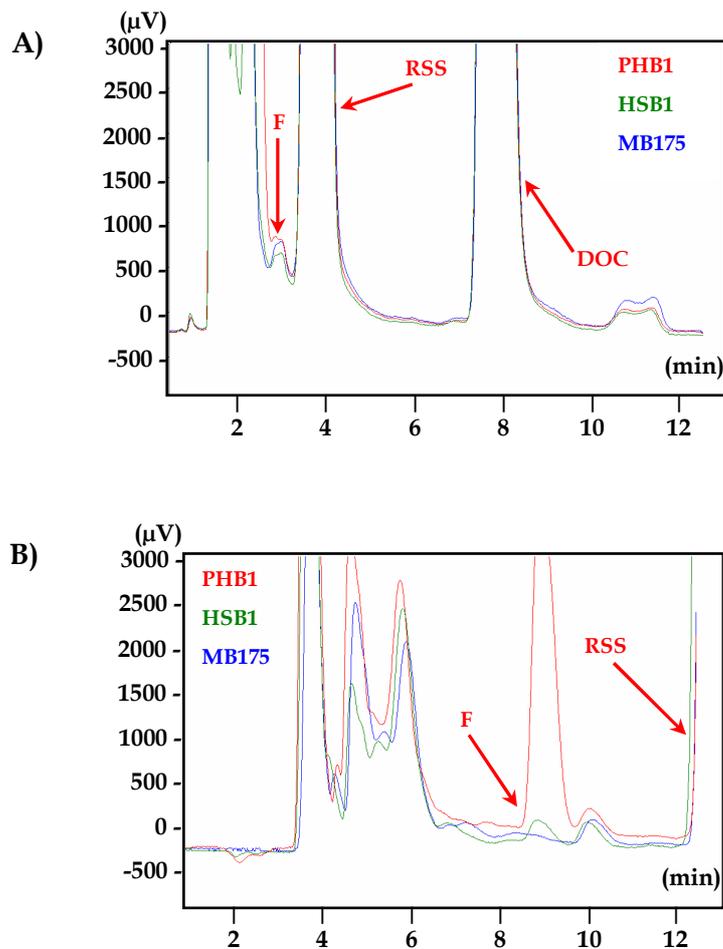


Abb. 3.12: Chromatogramme von drei Proben (Stamm PHB1, Stamm HSB1 und Stamm MB175) aus einem Aktivitätstest. A) Fließmittel; ACN:H₂O=40:60, B) Fließmittel; MetOH:H₂O=60:40

Für den Vergleich der Fließmittel wurden Proben von zwei verschiedenen cortisolproduzierenden Stämmen (Stamm HSB1 und Stamm PHB1) sowie dem nicht cortisolproduzierenden, untransformierten Stamm MB175 eingesetzt. In der Abb. 3.12.A ist der Cortisolgipfel zwar zu sehen, aber seine Quantifizierung ist durch die Anwesenheit anderer Substanzen, die eng benachbart liegen, schwierig. Die gleichen Proben wurden anschließend mit MetOH:H₂O=60:40 als Fließmittel getrennt. Das Ergebnis ist in der Abb. 3.12.B zu sehen. Die Trennung ist eindeutig und der Cortisolgipfel kann einfach definiert und quantifiziert werden. Außerdem wird aus den beiden Abbildungen klar, dass zwischen den Stämmen ein großer Unterschied hinsichtlich der Cortisolproduktion besteht.

Um die Laufzeit zu verkürzen, ohne die Trennung relevant zu beeinflussen, wurde die Temperatur während des Laufes variiert. Die gleiche Probe wurde bei 25°C und bei 45°C getrennt (Abb. 3.13).

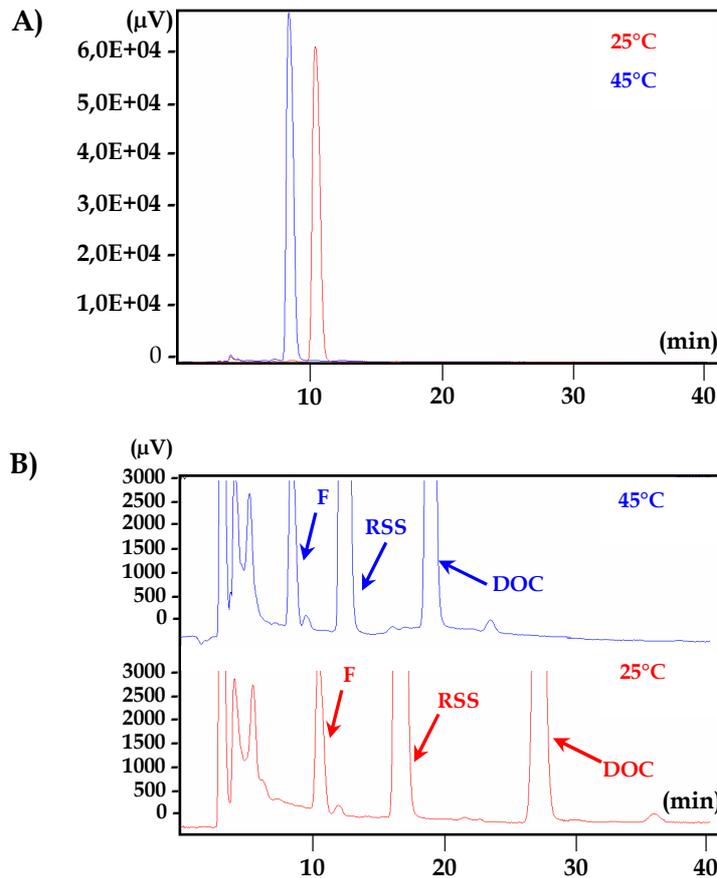


Abb. 3.13: A) Überlagerte Chromatogramme von reinem F bei 45°C und 25°C. B) Gegenüberstellung zweier Chromatogramme, die aus der gleichen Probe (PHB1) bei unterschiedlichen Temperaturen (45°C und 25°C) erzeugt wurden. Fließmittel; MetOH:H₂O=60:40

Die Retentionszeit des Cortisols verkürzt sich bei 45°C um ungefähr zwei Minuten. Die Trennung der zu analysierenden Substanzen war trotzdem gut, die Gesamtzeit für die Analyse einer Probe (inklusive Standards) verkürzt sich dadurch auf 30min.

Durch den Vergleich und die Optimierung der Methoden konnten die geeignetsten Bedingungen für eine standardisierte Auswertung der Aktivitätstests gefunden werden (Abschnitt 2.4.7 und 2.4.9). Die HPLC Analytik zeichnet sich durch eine hohe Trennqualität und eine gute Reproduzierbarkeit aus. Außerdem stellt diese Methode das korrektere Verfahren für die Bestimmung der Cortisolproduktion in *S. pombe* dar.

3.5 Proteinexpression in *S. pombe*

Nach erfolgreicher Transformation von *S. pombe* sowohl mit den verschiedenen pCAD1 Plasmiden als auch mit den pNMT1-TOPO Plasmiden wurde der *nmt1* Promotor induziert. Die erfolgreiche Expression der Proteine wurde im Anschluss durch den Nachweis der mitexprimierten Epitope in Hefeextrakten nachgewiesen (in Material und Methoden, Abschnitte 2.1.2, 2.4.1, 2.4.4 und 2.4.5).

3.5.1 Expressionsnachweis von pCAD1 Mutanten

Alle pCAD1 Mutanten wurden am C-Terminus mit zwei angehängten Epitopen (erst ein Hexahistidin- und dann ein Pk-Tag) exprimiert. Normalerweise werden Polyhistidin-Tags, welche auch einen stabilisierenden Effekt (Nonaka *et al.*, 1998) haben, für die Proteinreinigung eingesetzt. Der Pk-Tag stellt ein Epitop dar, das sehr gut in *S. pombe* funktioniert (Bureik *et al.*, 2002b). Die mutierten CYP11B1 Varianten aller Stämme wurden in den Hefezellextrakten mittels Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot nachgewiesen. Dabei wurden 10%ige und 15%ige SDS Gele verwendet. Für die Proteinextraktion wurde für jeden Stamm die gleiche Zellzahl ($2,5 \cdot 10^8$ Zellen) eingesetzt (Abb. 3.14).

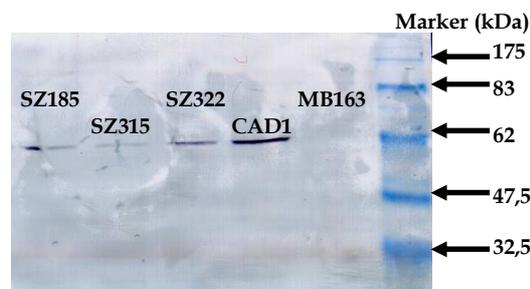


Abb. 3.14: Beispiel von einer Membran nach der Detektion über den Pk-Tag (10%iges SDS Gel) und Chlornaphtol Färbung. Hefeextrakte aus einigen pCAD1 transformierten Stämmen (SZ185, SZ315, SZ322, CAD1 und MB163). CAD1 dient als Referenzstamm und MB163 ist die Negativkontrolle

Die MB163 Spur diente als Negativkontrolle und wies, wie von einem nicht transformierten Stamm zu erwarten, keine Bande auf. Der Stamm (CAD1 Stamm), der das hsCYP11B1 Enzym exprimiert, wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Das native Protein ist primär 57kDa groß. Durch das Anhängen des Hexahistidin- und des Pk-Tags wird dieses Protein

jedoch etwas größer. Sowohl bei CAD1 als auch bei allen anderen Stämmen erkennt man eine Bande bei ungefähr 62kDa. Die Expression der Mutanten konnte dadurch in allen Stämmen bestätigt werden (Abb. 3.14, Abb. 3.15 und Abb. 3.16). In pCAD1 enthalten alle Enzyme die mitochondriale Importsequenz von hsCYP11B1, für die bereits eine gute Funktionalität nachgewiesen wurde. In Präparationen von Mitochondrien und Zytosol aus Hefezellen fand sich nur eine Bande in der mitochondrialen Fraktion. Vergleichbar dem Stamm SZ1B, wo das Enzym auch mit der mitochondrialen Importsequenz von hsCYP11B1 exprimiert wurde, entspricht diese singuläre Bande wahrscheinlich dem Protein mit fehlender posttranslationalen Prozessierung.

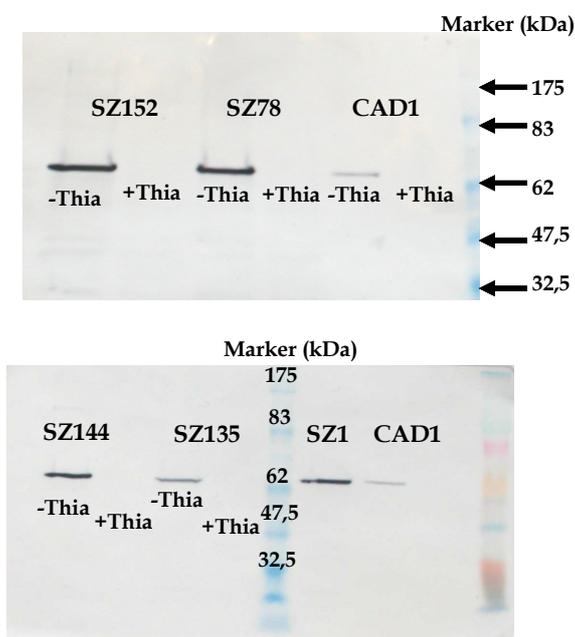


Abb. 3.15: Darstellung der Abhängigkeit der CYP11B1 Expression vom *nmt1* Promotor in einer Western Blot Analyse (10%iges SDS Gel) aus Extrakten verschiedener CYP11B1 exprimierender Hefen (pCAD1 Stämme)

Die CYP11B1 Expression in den pCAD1 Mutanten war durch den *nmt1* Promotor und die An- oder Abwesenheit von Thiamin im Medium reguliert. Der *nmt1* Promotor ist ein so genannter „leaky“ Promotor, weshalb man auch ein Signal bei Kulturen mit supprimiertem Promotor erwarten würde. Der Mangel an Banden in den Kulturen mit Thiamin ist deshalb am ehesten auf eine unzureichende Sensitivität der Färbung im niedrigen Konzentrationsbereich zurückzuführen.

Obwohl die Proteinextraktionen immer mit derselben Zellzahl durchgeführt wurden, lassen sich relevante Unterschiede in Bezug auf die Intensität der Banden der verschiedenen

Stämme nachweisen. Eventuelle Unterschiede durch einen ungleichen Zellaufschluss wurden durch erneute Analysen mit konstanten Proteinmengen auf allen Spuren ausgeschlossen (Abb. 3.16).

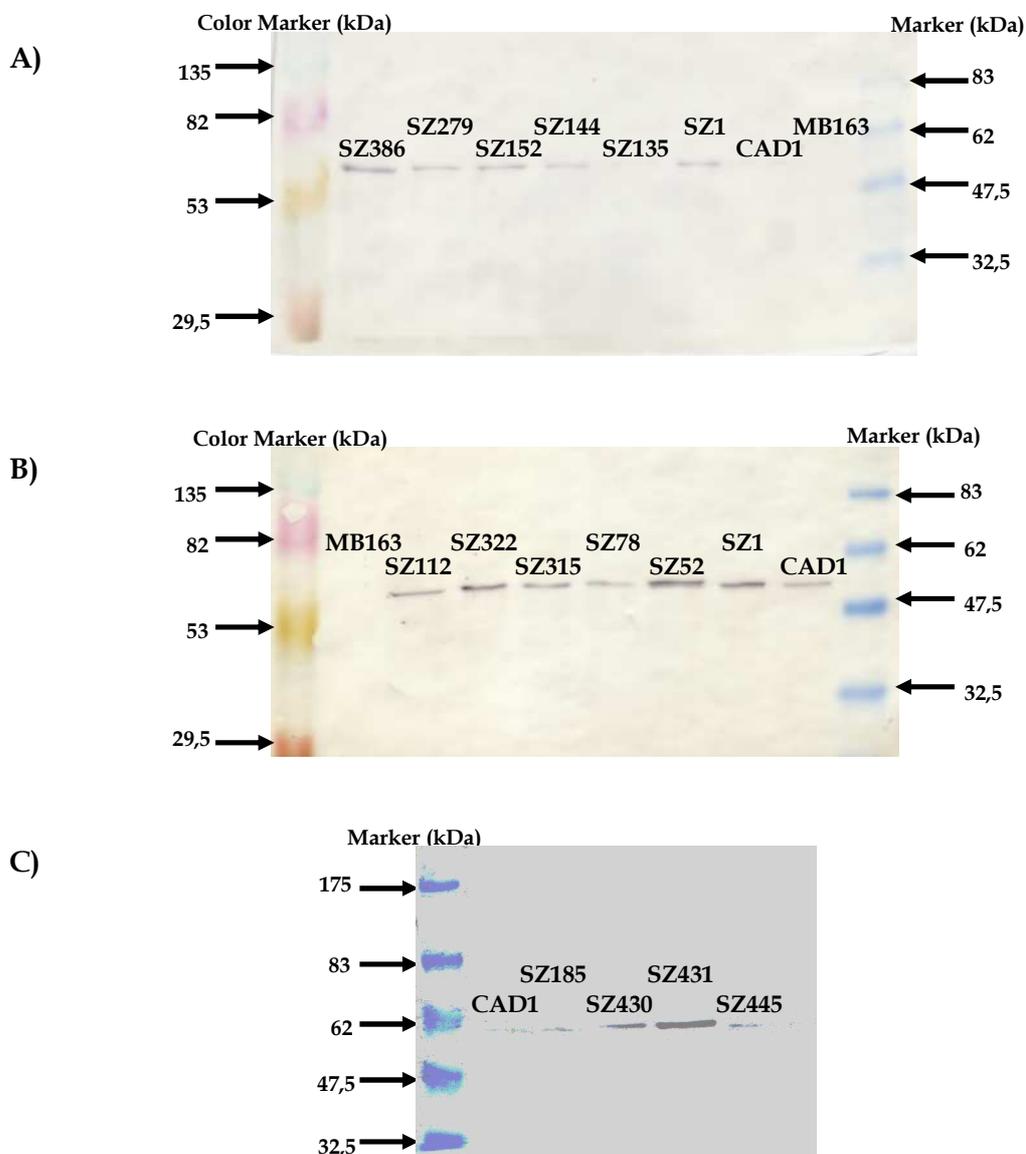


Abb. 3.16: Nachweis der verschiedenen pCAD1 Mutanten im Western Blot und Chlornaphtol Färbung. In den Gelen A und B beträgt die Gesamtproteinmenge pro Spur 40µg, im Gel C 50µg (15%iges SDS Gel)

Wenn man CAD1 als Referenz verwendet und seine Intensität auf 1 setzt, kann man die relative Intensität der Banden von verschiedenen Stämmen miteinander vergleichen. Da CAD1 auf allen Gelen mitgeführt wurde, konnten auch die relativen Intensitäten von Stämmen auf verschiedenen Gelen miteinander verglichen werden. Für die 5 Stämme SZ52,

SZ322, SZ386, SZ430, SZ431 ließ sich ein sehr hohes Expressionsniveau von CYP11B1 nachweisen. Die Mehrzahl der anderen analysierten Hefe-Stämme (SZ1, SZ112, SZ144, SZ152, SZ185, SZ279, SZ315, SZ445) zeigte eine dem CAD1 vergleichbare oder leicht erhöhte Expression. Nur für SZ78 und SZ135 war die Expression leicht erniedrigt. Da alle Zellen unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden und auch der Nachweis von CYP11B1 in allen Stämmen identisch war, lassen sich Unterschiede in der Expression nur auf individuelle Besonderheiten der einzelnen Mutationen zurückführen. Möglicherweise besitzen einige Mutationen einen stabilisierenden Effekt auf das Protein. Wahrscheinlich nehmen diese Proteine eine Konformation ein, die sie vor einer Degradation schützt. Wie auch schon bei den pNMT1-TOPO Mutanten, korrespondierten die Unterschiede im Expressionsniveau nicht mit der enzymatischen Aktivität. Ein Beispiel für diese Diskordanz sind die Mutationen in Position 52 und 78. Während die Mutation in Position 52 mit einer Erhöhung der Expression, aber einer unveränderten enzymatischen Aktivität einherging, war bei der Mutation in Position 78 genau das Gegenteil der Fall. Die Aktivität war erhöht, obwohl die Expression offenbar niedriger ausfiel. Die Kombination beider Mutationen im Stamm SZ1 zeigt bezüglich der einzelnen Effekte beider Mutationen einen additiven Effekt. Das Expressionsniveau war leicht erhöht, während die Aktivität eine starke Zunahme aufwies.

3.5.2 Expressionsnachweis von pNMT1-TOPO CYP11B

Alle pNMT1-TOPO Varianten wurden, wie bei den pCAD1 Varianten, am C-Terminus mit zwei angehängten Epitopen exprimiert. In diesem Fall wurden erst ein Pk- und dann ein Hexahistidintag eingeführt. Durch den pK-Tag konnte mittels Antikörper die Anwesenheit der entsprechenden CYP11B Proteine in den Zellextrakten nachgewiesen werden. Dabei wurden 10%ige und 15%ige SDS Gele verwendet.

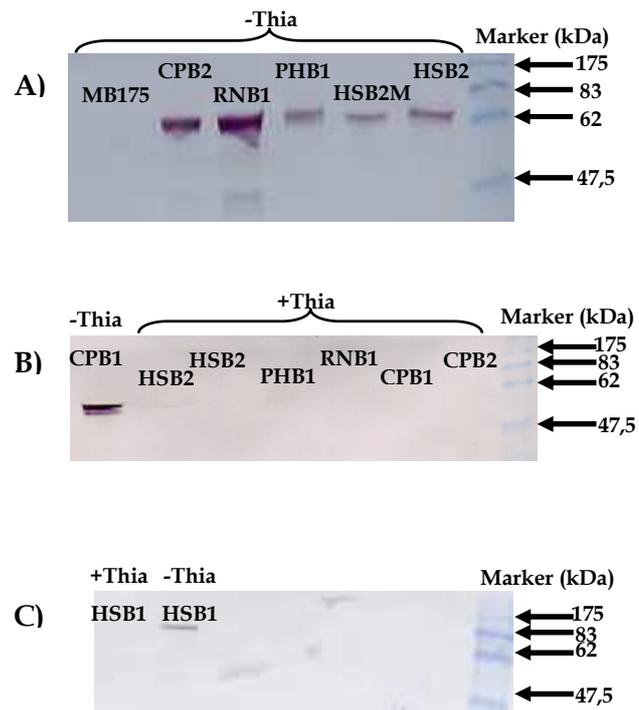


Abb. 3.17: Darstellung der Abhängigkeit der CYP11B Proteinexpression (pNMT1-TOPO Stämme) von *nmt1* Promotor in einer Western Blot Analyse (10%ige SDS Gele). A) Stämme MB175, CPB2, RNB1, PHB1, HSB2M und HSB2 nach der Induktion des *nmt1* Promotors. B) Stamm CPB1 nach der Induktion des *nmt1* Promotors und Stämme HSB2, HSB2M, PHB1, RNB1, CPB1 und CPB2 nach der Repression des *nmt1* Promotors. C) Stamm HSB1 nach der Repression (links) und nach der Induktion (rechts) des *nmt1* Promotors

Die Expression der Proteine unterliegt der Kontrolle des *nmt1* Promotors, der in Anwesenheit von Thiamin supprimiert ist, in Abwesenheit von Thiamin jedoch induziert wird. Auf der oberen Membran (Abb. 3.17A) sieht man, dass die Negativkontrolle (MB175) erwartungsgemäß kein CYP11B exprimiert. Die anderen Stämme hingegen zeigen alle eine deutliche Bande in den Kulturen, die in thiaminfreiem Medium wuchsen (Abb. 3.17A, B und C). Bei den Kulturen, in denen thiaminhaltiges Medium verwendet wurde, ist keine Expression der CYP11B Proteine in den transformierten Stämmen nachweisbar (Abb. 3.17B und C). Da, wie im Abschnitt 2.1.2 und 2.4.5 beschrieben, die verschiedenen CYP11B Plasmide auch die Sequenzen von zwei Epitopen, einem pK-Tag und einem Polyhistidin-Tag, am C-Terminus enthielten, wurden diese bei der Expression der CYP11B Proteine ebenfalls exprimiert. Dies führt dazu, dass die Masse des CYP11B Proteins (57kDa) um die der beiden Epitope zunimmt und die Banden deshalb bei 60kDa erscheinen.

Um eine optimale Vergleichbarkeit der Banden zu gewährleisten, wurden zunächst Zellysate aller Stämme vorbereitet und die Proteinkonzentrationen darin gemessen. Bei der anschließenden Western Blot Analyse auf einem 15%igem SDS-Gel wurden Proben mit einer konstanten Proteinmenge verwendet. Auf allen Gelen wurde außerdem der Referenzstamm HSB1 mit gleicher Proteinmenge mitgeführt (Abb. 3.18A und B).

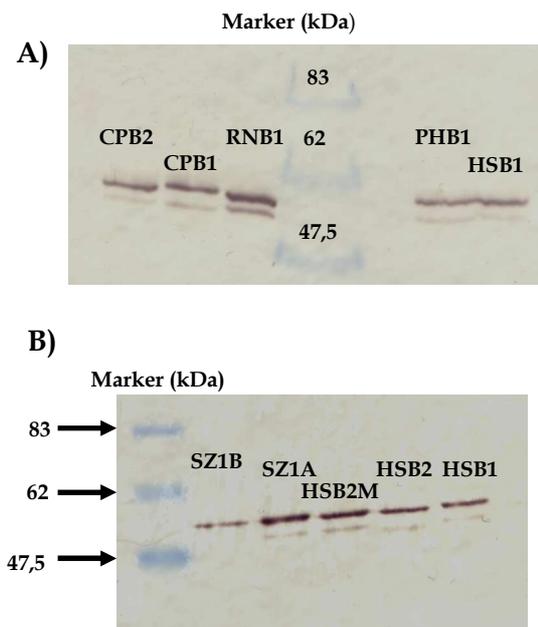


Abb. 3.18: Nachweis der verschiedenen CYP11B Proteine in Zellysaten von transformierten MB175 Hefezellen mittels Western Blot und Chlornaphtol Färbung (in 15%igen SDS Gelen). Es wurden pro Stamm 30µg Protein je Spur aufgetragen. Die Spuren für CPB1 und CPB2 wurden mit 60µg Protein beschickt. In A) sind die Stämme CPB1, CPB2, RNB1, PHB1 mit der Referenz HSB1 zu sehen. In B) sind die restliche Stämme (SZ1B, SZ1A, HSB2M, HSB2) mit dem Referenz Stamm HSB1 aufgetragen

Sowohl auf den Membranen aus Abb. 3.17 als auch auf denen aus Abb. 3.24 sind in der Region von 60kDa zwei Banden zu sehen. Die Auftrennung dieser beiden Banden war jedoch wesentlich deutlicher, wenn die Separation in einem 15%igen Gel erfolgte. Das Auftreten dieser Doppelbanden könnte durch die posttranslationale Prozessierung des exprimierten Proteins verursacht sein. Die im Plasmid enthaltene mitochondriale Importsequenz besitzt ein Molekulargewicht von 2657,25Da für CYP11B1 und 2625,19Da für CYP11B2. Verwendet man die Banden des Markers als Kalibrator so kann man näherungsweise den Unterschied im Molekulargewicht abschätzen. Dabei trägt man das

Molekulargewicht als dekadischen Logarithmus auf die Abszisse und die zurückgelegte Strecke auf die Ordinate eines zweidimensionalen Koordinatensystems auf und erstellt so eine Kalibrationskurve. Nun misst man den zurückgelegten Weg der zu untersuchende Bande, trägt den Datenpunkt auf der Eichkurve auf und liest das Molekulargewicht auf der Abszisse ab. Der so ermittelte Unterschied beträgt etwa 3 bis 3,5kDa. Zieht man die Ungenauigkeit der Positionsbestimmung der Banden in Betracht, so liegt die Vermutung nahe, dass eine Bande dem unprozessierten Protein mit der Importsequenz und die andere Bande dem prozessierten Protein ohne Importsequenz entspricht. Eine derartige Doppelbande aus prozessiertem und unprozessiertem Protein wurde bereits in der Literatur beschrieben (Bureik *et al.*, 2002b). Für genauere Angaben ist jedoch eine massenspektrometrische Analyse notwendig. Eine Degradation des Proteins als Erklärung für die beiden Banden ist unwahrscheinlich, da man sonst wesentlich mehr Banden auf dem Gel sehen müsste. Lediglich beim Stamm SZ1B war nur eine einzelne Bande bei ungefähr 60kDa zu sehen, was die Vermutung nahe legt, dass hier keine posttranslationale Prozessierung stattgefunden hat. Im Gegensatz zu allen anderen Stämmen wurde das CYP11B1 Enzym in SZ1B mit seiner eigenen Präsequenz exprimiert. Alle anderen Stämme enthielten die Präsequenz von CYP11B2. Auch bei der Western Blot Analyse der mittels pCAD1 exprimierten Proteine findet sich nur eine Bande (Abb. 3.16), wobei aber auch hier die mitochondriale Importsequenz die des CYP11B1 ist.

Bei genauer Beobachtung der Membranen fallen leichte Unterschiede in der Intensität der Banden auf (Abb. 3.18). Da alle Bahnen mit der identischen Proteinmenge beschickt wurden, deuten diese Differenzen auf Unterschiede im Expressionsniveau hin. Dabei fanden sich Intensitätsunterschiede sowohl bei den prozessierten als auch bei den unprozessierten Proteinen, die sich um den Faktor 2 bis 3 bewegten. Eine besonders kräftige Expression (etwa verdreifacht) war in den Stämmen RNB1, SZ1A und in HSB2M zu beobachten.

3.6 Aktivitätstest in *S. pombe*

Das humane CYP11B1 katalysiert die Umwandlung von RSS zu Cortisol. Alle generierten Varianten, sowohl die aus der gerichtete Mutagenese als auch die der verschiedenen Organismen, wurden getestet. Es wurde gemessen, wieviel Cortisol sie in einer vorgegebenen Zeit unter denselben Bedingungen produzieren. Das hsCYP11B1 findet man vorwiegend in den Mitochondrien der Zellen der Nebennierenschale. Der Elektronentransfer erfolgt normalerweise vom NADPH über die Adrenodoxinreduktase und das Adrenodoxin zum CYP11B1 (siehe Abschnitt 1.3.2). Zur Messung der enzymatischen Aktivität ist es nicht notwendig, dass diese beiden Proteine in *S. pombe* mitexprimiert werden. Tatsächlich wurde ein Gen in dem Genom von *S. pombe* gefunden, das für ein Protein codiert (*etp1_{fd}*), das dem Adx am C-Terminus homolog ist. Dieses Protein kann in einem *in vitro* System Adx ersetzen und ist auch in der Lage, Elektronen von AdR zum Cytochrom P450 zu transferieren (Bureik *et al.*, 2002b).

3.6.1 Aktivitätstest der pCAD1 Mutanten

Die enzymatische Aktivität der CYP11B1 Mutanten konnte durch ein *in vivo* System gemessen werden. Dabei wurde das Enzym induziert und das Substrat RSS zugegeben. Nach 24h wurde eine Probe aus jeder Kultur entnommen und eine Steroidextraktion daraus durchgeführt. Dieser Extrakt wurde anschließend mittels HPLC analysiert (Abschnitt 2.4.7). Die Quantifizierung des gebildeten Produktes Cortisol erfolgte anhand einer mitgeführten Standardgeraden und eines internen Standards (Abschnitt 2.4.9). Bei jedem Test wurde immer auch der Referenz Stamm CAD1 mitgeführt und die Experimente wurden pro Stamm mindestens 3mal wiederholt.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Analysen wurden die Mutanten in die vier schon beschriebenen Gruppen (Abschnitt 3.1) eingeordnet und als Prozentsatz der Aktivität des Referenzstammes CAD1 angegeben.

„I-Helix“- und „Substrateintrittskanal“ Gruppe

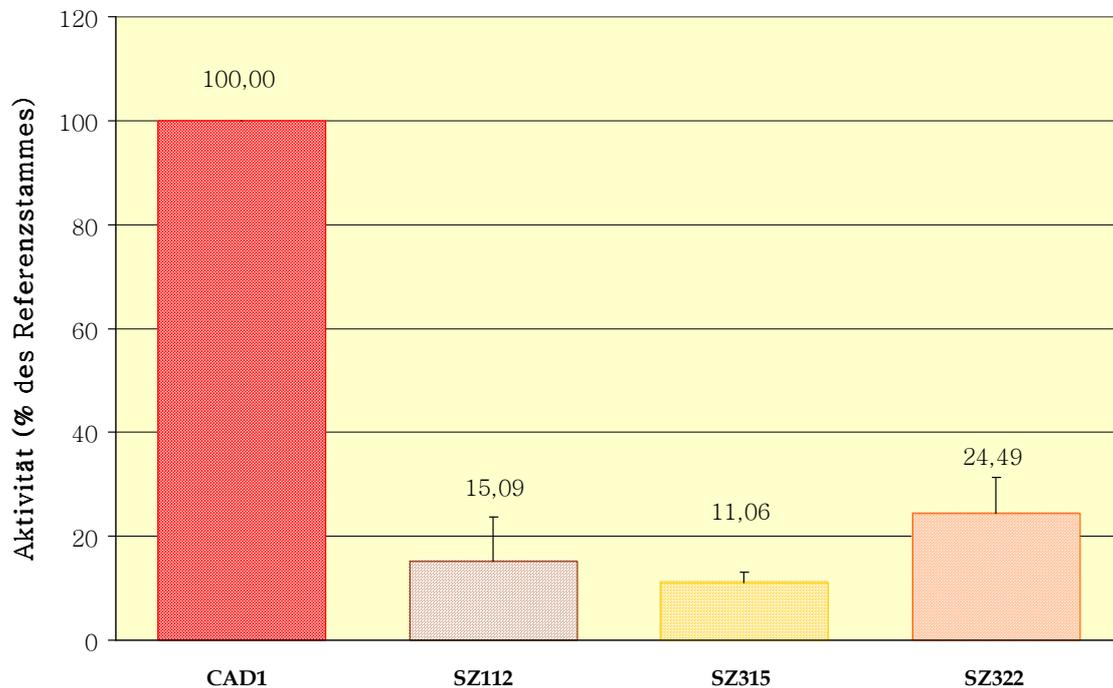


Abb. 3.19: Aktivitätstest der Mutanten der „I-Helix“ (S315G, P322S) und „Substrateintrittskanal“ (S112P) Gruppe. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Stämme in Relation zum Referenzstamm CAD1 (auf 100% gesetzt) sind dargestellt. Testkultur: 1×10^8 Zellen/ml, 10 ml Kultur; Schüttelbedingungen: 300U/min bei 30°C; Substratkonzentration: 1mM RSS; Zeit; 24h; Analyse des Substratumsatzes: HPLC Analytik

Die Daten für die Stämme SZ315 und SZ322 ergaben sich aus 5 bzw. 6 unabhängigen Experimenten und bestätigten eine drastische Reduktion der enzymatischen Aktivität des CYP11B1 (Abb. 3.19), die unabhängig vom Expressionniveau der Proteine ist (Abb. 3.16). Das Ausmaß des Aktivitätsverlustes belief sich auf 80-90% im Vergleich zum Referenzstamm CAD1. Die dramatischen Effekte dieser Mutationen auf die enzymatische Aktivität sind durch die Lokalisation der Mutationen in der funktionell wichtigen I-Helix zu erklären (Li und Poulos, 2004). Die I-Helix ist verantwortlich für die korrekte Positionierung des Häm. Auch die Mutation Ser112Pro im Substrateintrittskanal zeigt nicht den erhofften Effekt auf die Aktivität (Abb. 3.19). Auch hier gibt es keine direkte Korrelation mit der Expression (Abb. 3.16). Anstatt einer Erhöhung fand sich bei diesem Stamm sogar eine 85% Reduktion der Aktivität. Die Position 112 wurde bereits von Bechtel et al. in hsCYP11B2 analysiert (Bechtel *et al.*, 2002). Dabei wurde das Ile in Position 112 gegen ein Serin (wie bei hsCYP11B1)

sowie gegen ein Pro ausgetauscht. Nur die Prolin-Variante wies eine gesteigerte Hydroxylierungsaktivität gegenüber RSS auf, erreichte aber nicht die Aktivität des hsCYP11B1. Wahrscheinlich ist die Mutation Ile112Pro in hsCYP11B2 wesentlich effektiver, was eventuell durch die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der beiden Aminosäuren Ser und Pro zu erklären ist.

„Bindungsdomäne“ Gruppe



Abb. 3.20: Aktivitätstest der Mutanten aus der „Bindungsdomäne“ (P135A, L144K, N152K, A279K, A386F, D430R, I431K, F445W) Gruppe. CAD1 wurde auf 100% gesetzt und die jeweiligen Prozentsätze und ihren Standardabweichungen für die anderen Stämme dargestellt. Testkultur: 1×10^8 Zellen/ml, 10 ml Kultur; Schüttelbedingungen: 300U/min bei 30°C; Substratkonzentration: 1mM RSS; Zeit; 24h; Analyse des Substratumsatzes: HPLC Analytik

Die drei Stämme SZ144, SZ431 und SZ386 zeigten einen totalen Aktivitätsverlust (Abb. 3.20). In den Chromatogrammen konnte bei der entsprechenden Retentionszeit kein Signal nachgewiesen werden. Obwohl diese Mutationen weit voneinander entfernt liegen, haben sie offensichtlich eine vergleichbare Bedeutung für die Funktion des Enzyms. Sowohl die Einführung einer positiven Ladung durch ein Lys an den Positionen 144 und 431 als auch der Ersatz des hydrophoben Ala in Position 386 durch die noch hydrophobere Aminosäure Phe bringen keine Verbesserung der Aktivität.

Die Stämme SZ135, SZ430 und SZ445 setzten etwa 80-95% weniger RSS als CAD1 um (Abb. 3.20). Im Vergleich zu den vorher beschriebenen Mutationen blieb hier aber noch eine geringe Restaktivität erhalten. In Position 135 wurde durch den Austausch von Pro durch Ala eine größere Freiheit in der Helix erreicht, wodurch es aber zu keiner nennenswerten Verbesserung der Aktivität kam. Im Vergleich zum totalen Aktivitätsverlust der Mutation in Position 431 hatte die Mutation in Position 430 nicht ganz so fatale Konsequenzen, denn es verblieb noch Restaktivität von 12% im Vergleich zu CAD1. Die Restaktivität von 22% RSS-Umsatz im SZ445 Stamm zeigte klar, dass auch die Mutation Phe445Trp nicht zu einer vollständigen Ablation der enzymatischen Aktivität führt.

Lediglich die Stämme SZ152 und SZ279 besaßen eine leicht höhere enzymatische Aktivität (Abb. 3.20). Der Unterschied im Vergleich zu CAD1 war aber nur für den Stamm SZ152 signifikant. In beiden Fällen konnte man vermuten, dass die Mutationen eine verbesserte Interaktion zwischen Enzym und Substrat durch eine positive Ladung bewirken.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Einführung eines Lys (oder eines Arg im Falle des SZ430), je nach Position, mit erheblichen Auswirkungen auf die Enzymaktivität einhergeht, die von einer kompletten Ablation der Aktivität bis zu einer leichten Steigerung reichen. Es wurde mit keiner dieser Mutationen eine signifikante Erhöhung der enzymatischen Cortisolproduktion erzielt, obwohl bei allen Stämmen im Western Blot die Proteine immer nachweisbar waren (Abb. 3.16). Darüber hinaus wurde keine Mutation gefunden, die in der Bindungsdomäne einen signifikanten positiven Effekt besitzt.

„Genetische Variante“ Gruppe

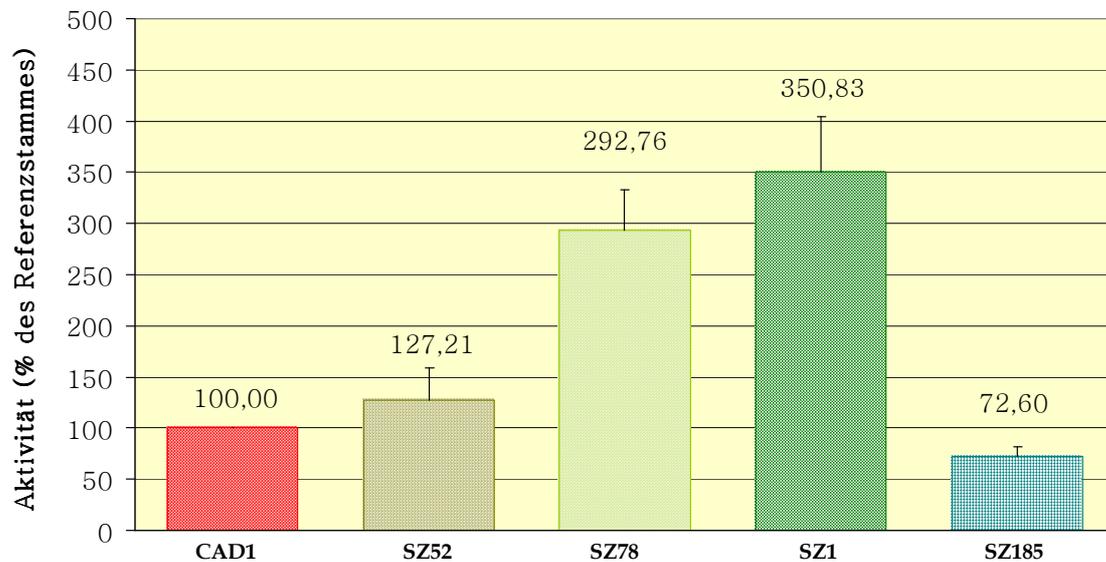


Abb. 3.21: Aktivitätstest der Mutanten der „Genetische Varianten“ (M52L, V78I, M52LV78I, T185I) Gruppe. CAD1 ist auf 100% gesetzt und die jeweiligen Prozentsätze und ihren Standardabweichungen für die anderen Stämme sind dargestellt. Testkultur: 1×10^8 Zellen/ml, 10 ml Kultur; Schüttelbedingungen: 300U/min bei 30°C; Substratkonzentration: 1mM RSS; Zeit; 24h; Analyse des Substratumsatzes: HPLC Analytik

Die Mutation T185I wurde erstmals in einem Patienten mit CMO II Defizienz („corticosterone methyl oxidase deficiency type II“) gefunden (Peter *et al.*, 1998) und ist mit einer Überproduktion von 18-Hydroxycorticoesteron verbunden. In der Folge wurde die Mutation von M. Hampf (Hampf, 2001) in CYP11B2 untersucht. Die dort in COS1 Zellen erzeugten Resultate zeigten eine erhöhte 11 β -Hydroxylierungsaktivität für die beiden relevanten Substrate, DOC und RSS. Diese Aktivität war aber allenfalls vergleichbar oder geringer als in CYP11B1. In *S. pombe* wurde die T185I Mutation in CYP11B1 analysiert und mit dem Referenzenzym verglichen (Abb. 3.21). Dabei fand sich eine leichte Senkung der Cortisolproduktion. Daraus lässt sich ableiten, dass diese Mutation zwar mit der 11 β -Hydroxylierungsaktivität assoziiert ist, aber in diesem Fall keinen nennenswerten Einfluss ausübt.

Die beiden anderen Mutationen in den Positionen 52 und 78 bewirkten jedoch ganz erhebliche Veränderungen der enzymatischen Aktivität (Abb. 3.21). Der Stamm SZ78 wies eine Verdreifachung der enzymatischen Aktivität auf. Der SZ1 Stamm, der beide Mutationen

zusammen beinhaltet, zeigte eine Erhöhung der Aktivität auf 350%. Beim Stamm SZ52 war die Aktivitätsänderung weniger ausgeprägt. Obwohl der Unterschied zwischen SZ1 und SZ78 nicht das Signifikanzniveau erreichte, besteht Anlass zu der Vermutung, dass sich die Effekte von M52L und V78I addieren. Diese Ergebnisse bestätigten die mit dem pNMT1-TOPO Vektor erzielten Resultate. Beide Mutationen zeigten einen stimulatorischen Einfluss auf die enzymatische Aktivität. In pCAD1 wurde CYP11B1^{M52LV78I} mit seiner eigenen Importsequenz exprimiert (Stamm SZ1) und zeigte eine Cortisolproduktion von 28,3µM/Tag pro 10⁹Zellen. Dagegen produzierte CYP11B1 (Stamm CAD1) 7,6µM/Tag pro 10⁹ Zellen. Im pNMT1-TOPO Plasmid wies CYP11B1^{M52LV78I} mit seiner eigenen Importsequenz (Stamm SZ1B) nur eine Cortisolproduktion von 4,1µM/Tag pro 10⁹ Zellen auf (Tab. 3.7), obwohl im Vergleich zu HSB1 die Aktivität von SZ1B deutlich höher war. Obwohl keine direkten Vergleiche der beiden Vektoren durchgeführt wurden, kann spekuliert werden, dass die Wahl des Vektors einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität ein und desselben Enzyms hat.

Bei allen Mutanten dieser Gruppe ist die Aktivität nicht mit dem Expressionsniveau assoziiert (Abb. 3.16). Insbesondere die Stämme mit einem höheren Aktivitätsniveau (SZ52, SZ78 und SZ1), zeigten im Western Blot keine stärkeren Banden.

Tab. 3.7: Mittelwerte ± Standardabweichung der Enzymaktivitäten der mutierten Stämme. In der linken Spalte ist in Klammern die Anzahl an Wiederholungen für jedes Experiment angegeben. Testkultur: 1x10⁸Zellen/ml, 10 ml Kultur; Schüttelbedingungen: 300U/min bei 30°C; Substratkonzentration: 1mM RSS; Zeit; 24h; Analyse des Substratumsatzes; HPLC Analytik

Stamm	µM/Tag (Cortisol)
CAD1 (13)	7,65 ±0,97
SZ52 (3)	4,44 ±0,30
SZ78 (6)	21,1 ±1,35
SZ1 (3)	28,27 ±0,78
SZ112 (3)	0,57 ±0,29
SZ135 (4)	0,25 ±0,18
SZ144 (3)	0,00 ±0,00
SZ152 (7)	9,45 ±0,57
SZ185 (6)	6,43 ±0,17

Stamm	$\mu\text{M}/\text{Tag}$ (Cortisol)
SZ279 (5)	$8,95 \pm 1,00$
SZ315 (6)	$0,99 \pm 0,24$
SZ322 (5)	$1,58 \pm 0,24$
SZ386 (3)	$0,00 \pm 0,00$
SZ430 (3)	$0,43 \pm 0,22$
SZ431 (3)	$0,00 \pm 0,00$
SZ445 (3)	$0,81 \pm 0,09$

3.6.2 Aktivitätstest der pNMT1-TOPO CYP11B

Die Aktivitätsmessung wurde für jeden Stamm mindestens 3mal wiederholt. Dabei wurde das in Abschnitt 2.4.6 beschriebene Protokoll verwendet. Bei jedem Test wurde immer der Referenzstamm HSB1 mitgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden 24h nach der Zugabe des Substrates entnommen und mittels HPLC analysiert. Die Berechnung der Aktivitäten erfolgte anhand einer Standardgeraden und eines internen Standards. In Abb. 3.22 sind die Aktivitäten als Prozentwerte des Referenzstammes HSB1 dargestellt.

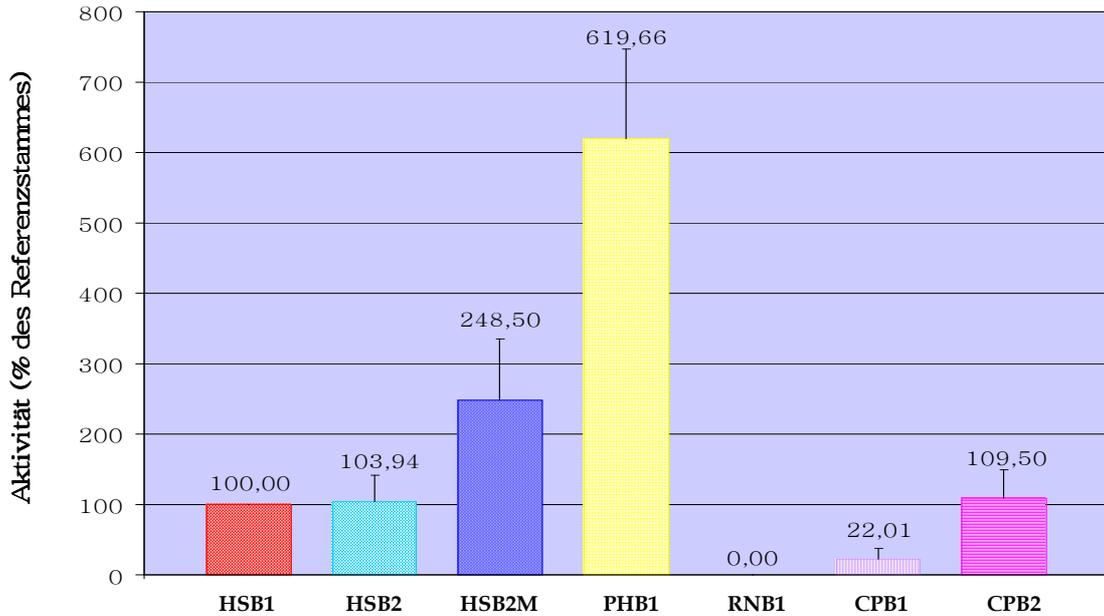


Abb. 3.22: Darstellung der enzymatischen Aktivität von *S. pombe* Stämmen, die die CYP11B Proteine aus verschiedenen Organismen (Mensch, Affe, Ratte und Meerschweinchen) exprimieren. Testkultur: 1×10^8 Zellen/ml, 10 ml Kultur; Schüttelbedingungen: 300U/min bei 30°C; Substratkonzentration: 1mM RSS; Zeit; 24h; Analyse des Substratumsatzes: HPLC Analytik

Der Vergleich der CYP11B Aktivitäten aus den verschiedenen Stämmen zeigt deutlich, dass sich trotz identischer Bedingungen erhebliche Unterschiede in Bezug auf den Umsatz des Substrates RSS ergeben. Leider fanden diese Unterschiede in den verschiedenen Organismen kein Äquivalent in der Proteinexpression (Abb. 3.18), wie zu erwarten gewesen wäre. Im Falle des Stammes RNB1 waren z.B. die Befunde von Proteinexpression und Aktivitätsmessung sogar entgegengesetzt. Bei der Expressionsanalyse (Abb. 3.18) war eine sehr starke Bande zu sehen, aber die Aktivität des Enzyms betrug null. CYP11B1 aus dem Meerschweinchen wies auch eine deutlich niedrigere Aktivität auf als der Referenzstamm HSB1. Der Grund könnte in einer geringen Interaktion mit dem Redoxpartner liegen. Der Proteinnachweis im Western Blot zeigte jedoch zweifelsfrei die Anwesenheit des Enzyms. Somit scheint es hier zu einer effektiven Reduktion der enzymatischen Aktivität gekommen zu sein. Im Gegensatz dazu gleichen die Aktivitäten von humanem CYP11B2 und CYP11B2 aus dem Meerschweinchen der des Referenzstammes. Auf der anderen Seite wies der Stamm HSB2M eine ungefähr 2,5fach höhere Aktivität als HSB1 auf. Ein derartiger Steigerung der Aktivität im Vergleich zum CYP11B1 Enzym war in der Zellkultur nicht zu beobachten (Bechtel *et al.*, 2002). Vergleicht man jedoch die absoluten Aktivitäten von HSB2 und HSB2M

(siehe Tab. 3.8), dann ist auch der Vergleich zwischen den beiden Enzymen in der Zellkultur bestätigt. Ursache dieser gesteigerten Aktivität sind möglicherweise die beiden Mutationen in den Positionen 112 und 147, die zu einer Steigerung der 11 β -Hydroxylierungsaktivität führen könnten. Die höchste Aktivität aller getesteten Stämme war jedoch in PHB1 zu beobachten. Trotzdem die Proteinexpression von PHB1 und der von Referenzstamm HSB1 vergleichbar war, lag die mittlere Cortisolproduktion um 620% über der von HSB1.

3.6.3 Aktivitätstest der Stämme SZ1A und SZ1B

Der Aktivitätsvergleich zwischen den Stämmen HSB1, SZ1A und SZ1B ist in Abb. 3.23 dargestellt. Die Stämme SZ1A und SZ1B exprimieren über das Plasmid pNMT1-TOPO das Protein hsCYP11B1^{M52LV78I}. Der einzige Unterschied liegt in der Präsequenz: der Stamm SZ1A enthält die Präsequenz von hsCYP11B2, während im Stamm SZ1B die Präsequenz von hsCYP11B1 vorliegt.

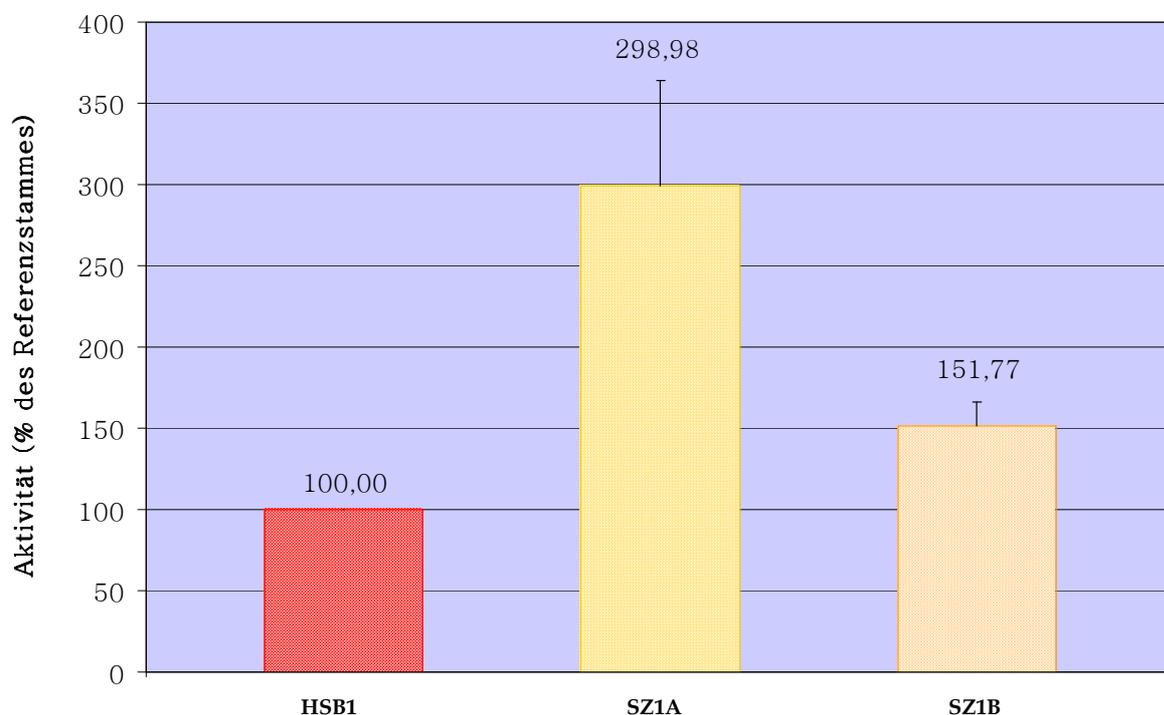


Abb. 3.23: Aktivitäten der Stämme SZ1A und SZ1B. Testkultur: 1x10⁸Zellen/ml, 10 ml Kultur; Schüttelbedingungen: 300U/min bei 30°C; Substratkonzentration: 1mM RSS; Zeit; 24h; Analyse des Substratumsatzes: HPLC Analytik

Auch bei den Stämmen SZ1A und SZ1B wurden deutliche Erhöhungen der enzymatischen Aktivität im Vergleich zu HSB1 beobachtet. Ursache für diese Aktivitätssteigerungen sind die Mutationen M52L und V78I. Diese beiden Mutationen waren die einzigen Unterschiede in der Aminosäuresequenz zu HSB1. Der Stamm SZ1A zeigte im Vergleich zum Referenzstamm eine 3fach höhere Aktivität, was die Befunde aus den Versuchen mit dem Plasmid pCAD1 bestätigte (Abb. 3.21). Im Plasmid pCAD1 wies der Stamm SZ1 eine 3,5fache Aktivitätssteigerung im Vergleich zu seinem Referenzstamm CAD1 auf. Bei SZ1B fand sich ebenfalls eine signifikante Aktivitätserhöhung, die jedoch nur das 1,5fache des Referenzstammes (HSB1) betrug. Im Gegensatz zu HSB1 wird das Cytochrom in SZ1B nicht mit der Präsequenz von hsCYP11B2 sondern mit der mitochondrialen Importsequenz von hsCYP11B1 exprimiert. Man könnte also vermuten, dass der Unterschied in der Präsequenz zu Differenzen in der Aktivität führt. Bereits in den Western Blots Analyse wurden Unterschiede in der Proteinexpression beobachtet, die aber nicht die Muster der Aktivitäten widerspiegeln.

Tab. 3.8: Mittelwerte \pm Standardabweichung der absolute Aktivitäten der verschiedenen pNMT1-TOPO Stämme. In der linken Spalte ist in Klammern die Anzahl an Wiederholungen für jedes Experiment angegeben. Testkultur: 1×10^8 Zellen/ml, 10 ml Kultur; Schüttelbedingungen: 300U/min bei 30°C; Substratkonzentration: 1mM RSS; Zeit; 24h; Analyse des Substratumsatzes; HPLC Analytik

Stamm	$\mu\text{M}/\text{Tag}$ (Cortisol)
HSB1 (5)	$2,32 \pm 1,10$
HSB2 (3)	$1,85 \pm 0,30$
HSB2M (3)	$4,39 \pm 0,67$
PHB1 (4)	$12,54 \pm 3,15$
RNB1 (4)	$0,00 \pm 0,00$
CPB1 (4)	$0,61 \pm 0,36$
CPB2 (4)	$1,45 \pm 0,28$
SZ1A (4)	$6,48 \pm 3,34$
SZ1B (3)	$4,07 \pm 2,09$

angegebenen Farbschlüssels gekennzeichnet sind, . - die Spalte weist nur semierhaltene Substitutionen auf.

Das Alignment zeigte eine sehr hohe Homologie zwischen den Sequenzen. Insgesamt waren 210 von 503 Aminosäuren in allen Sequenzen identisch. Das entspricht einem Anteil von 42%. Die Score-Werte für das paarweise Alignment sind ebenfalls sehr hoch, was ebenfalls auf einen hohen Grad der Homologie hinweist (Tab. 3.9). Der in Tab. 3.9 angegebene Score-Wert wurde berechnet, indem die Anzahl der Übereinstimmungen bei optimalem Alignment durch die Anzahl der analysierten Reste geteilt und dann als Prozentwert angegeben wurde. Die Werte schwanken zwischen 59% beim Vergleich von btCYP11B1/rnCYP11B1 sowie rnCYP11B1/cpCYP11B1 und einem Maximum von 96% zwischen hsCYP11B1/phCYP11B1.

Tab. 3.9: Ergebnisse des paarweisen Alignments der Aminosäuresequenzen aus verschiedenen Organismen

%	hsB1	hsB2	phB1	btB1	rnB1	cpB1	cpB2
hsB1	100	92	96	72	63	63	70
hsB2		100	92	74	64	64	71
phB1			100	72	64	63	70
btB1				100	59	62	67
rnB1					100	59	62
cpB1						100	74

Fehlende Übereinstimmungen finden sich insbesondere im Bereich der Substratbindungsstelle (SRS2 und SRS3), welche, legt man das hsCYP11B1 Modell zugrunde, die Aminosäuren der F- und G-Helix umfassen. Wahrscheinlich führen diese Unterschiede zu signifikanten Differenzen in der Affinität zum Substrat RSS. Dieser Befund erklärt möglicherweise die unterschiedlichen Aktivitäten der verschiedenen Cytochrome aus verschiedenen Organismen unter identischen experimentellen Bedingungen. Unklar ist jedoch, ob diese Differenzen von physiologischer Relevanz sind. Im Gegensatz zu den Substratbindungsstellen SRS2 und -3 weisen die Stellen SRS1, -4, -5 und -6 eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuren auf. Diese Bindungsstellen sind für das Enzym

besonders wichtig, da sie sich in funktionell und strukturell kritischen Regionen wie der I-Helix (SRS4) befinden.

Des Weiteren finden sich in dem Alignment diverse charakteristische Motive aus der Superfamilie der Cytochrome P450 (Denisov *et al.*, 2005). So zeigte sich eine absolute Erhaltung des Cys in Position 450, welches als fünfter Ligand für das Eisen des Hämmoleküls fungiert (Denisov *et al.*, 2005). Dieses Cys ist Bestandteil einer "Signatur", die im strukturellen Kern des Moleküls hoch konserviert ist. Im Falle des hier durchgeführten Alignments ist diese Signatur für alle Sequenzen FG(M/V)RQCLG. Die benachbarten beiden Arg (R453, R454) kommen ebenfalls in allen 7 Sequenzen vor und sind Bestandteil eines hoch konservierten Motivs aller mitochondrialen Cytochrome. Die I-Helix ist ein funktionell wichtiges Strukturelement, das für die Positionierung der Hämgruppe und folglich für die katalytische Aktivität verantwortlich ist. Das in dieser Helix vorhandene Motiv ist im sogenannten Knick-Punkt zentriert. Das Motiv ist wiederum für alle 7 Sequenzen identisch und lautet AGSVDT. Das Thr (T318), dem eine saure Aminosäure vorausgeht (in diesem Fall D317) ist im aktiven Zentrum lokalisiert und somit wahrscheinlich in den katalytischen Prozess involviert. (Imai *et al.*, 1989), (Kimata *et al.*, 1995). Ein weiteres absolut konserviertes Motiv befindet sich in der K-Helix.

Die Sequenzen von cpCYP11B1 und cpCYP11B2 haben eine zusätzliche Aminosäure im Bereich der A-Helix (immer in Bezug auf das hsCYP11B1 Modell). Dabei handelt es sich um Ser35 bzw. um Thr35. Andererseits haben die Sequenzen von rnCYP11B1 und cpCYP11B1 eine Aminosäure weniger im Bereich der H-Helix. Alle anderen Sequenzen haben in dieser Position 288 ein Gly oder wie im Falle von hsCYP11B1 und phCYP11B1 ein Ser. Auf Höhe der funktionell wichtigen Schleife, welche sich auf der proximalen Seite befindet und der L-Helix vorausgeht, findet sich eine Serie von 3 Aminosäuren (Gly433, Ser434, Gly435), die sich lediglich bei den Sequenzen hsCYP11B1, hsCYP11B2, phCYP11B1 und btCYP11B1 zeigt. Bei den Sequenzen, die aus Organismen der Ordnung der Nagetiere entstammen (rnCYP11B1, cpCYP11B1 und cpCYP11B2), fehlen diese Aminosäuren.

Die Aktivität des Enzyms phCYP11B1 übertrifft die von hsCYP11B1 erheblich. Darüber hinaus sieht man eine Aktivitätserhöhung, wenn auch nicht so ausgeprägt, in hsCYP11B2. Bezüglich des Sequenzvergleichs sind die Unterschiede zwischen diesen drei Enzymen in der Aminosäuresequenz in Tab. 3.10 dargestellt.

Tab. 3.10: Alignment der Aminosäuresequenzen von hsB1, phB1 und hsB2m. Unterschiede in der Sequenz sind rot markiert. Unterschiede im Signalpeptid werden nicht gezeigt

Position	hsB1	phB1	hsB2m	Struktur im Modell
29	Ala	Thr	Ala	
31	Val	Val	Ala	A-Helix
43	Arg	Arg	Gln	A-Helix
44	Arg	Arg	His	A-Helix
52	Met	Leu	Leu	
63	Asp	His	His	
68	Val	Val	Met	
78	Val	Ile	Ile	SRS1
82	Asp	Asp	Asn	SRS1
86	Ala	Ala	Pro	SRS1
87	Gly	Gly	Arg	SRS1
107	His	Asn	His	SRS1
109	His	Arg	Cys	SRS1
112	Ser	Ser	Pro	SRS1
147	Glu	Asp	Glu	C'-Helix
152	Asn	Lys	Lys	
173	Lys	Arg	Lys	D-Helix
182	Gly	Asp	Gly	
184	Leu	Val	Leu	
188	Val	Ile	Val	E'-Helix
222	Asn	Ser	Asn	
248	Thr	Thr	Ile	G-Helix, SRS2-3
280	Phe	Leu	Phe	G-Helix, SRS2-3
281	Ser	Ser	Asn	G-Helix, SRS2-3
285	Gln	Gln	His	SRS2-3
288	Ser	Ser	Gly	
296	Asn	Asn	Lys	H-Helix
301	Pro	Pro	Leu	I-Helix
302	Asp	Asp	Glu	I-Helix
320	Val	Val	Ala	I-Helix, SRS4
335	Asn	Asn	Asp	J-Helix
339	Ala	Ala	Ile	J-Helix
386	Ala	Val	Val	ß1-4, SRS5-6
404	Arg	Arg	Gln	ß1-3
414	Pro	Pro	Ala	
439	Tyr	Tyr	His	„Mäander“
471	Leu	Leu	Phe	
472	Gln	Gln	Leu	
492	Ser	Ser	Gly	C-terminus
493	Met	Thr	Thr	C-terminus
494	Phe	Phe	Ser	C-terminus
501	Ala	Ser	Ala	C-terminus

Die einzige Position, in der sich alle drei Enzyme voneinander unterscheiden, ist die Position 109, in der ein His (hsCYP11B1), Arg (phCYP11B1), bzw. Cys (hsCYP11B2m) zu finden sind.

Im Vergleich zu hsCYP11B2 und phCYP11B1 weist hsCYP11B1 zusätzliche Differenzen an insgesamt weiteren sechs Positionen auf. Unter diesen sechs Positionen finden sich u.a. die Positionen 52 und 78, die jenen Mutationen entsprechen, die sowohl in pCAD1- als auch in pNMT1-TOPO Plasmid zu Aktivitätsänderungen führten (Abschnitt 3.6.1). Zwei weitere Differenzen sind in den Positionen 152 und 386 zu finden. Auch diese waren in pCAD1, wie auch in fast allen anderen Sequenzen, mit Aktivitätsänderungen verbunden (Abschnitt 3.6.1). Dabei war in pCAD1 Asn152 durch Lys ersetzt, was zu einer leichten Aktivitätserhöhung führte. Ala386 hingegen war durch Phe ersetzt, was mit einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms einherging.

Von besonderem Interesse sind Änderungen in der Aminosäuresequenz, die für phCYP11B1 spezifisch sind, da dieses Enzym die absolut höchste Aktivität hinsichtlich der Umwandlung von RSS in Cortisol aufwies. Der Bereich zwischen den Aminosäuren Asn107 und Leu280, der die Substratbindungsstelle SRS1 sowie die C-, D-, E- und F-Helices enthält, konnte als ein Bereich mit hoher Variabilität in der Aminosäuresequenz definiert werden. Bei genauerem Hinsehen fallen insbesondere die eng benachbarten Aminosäuren Arg173, Asp182, Val184, Ile188 und Ser222 auf. Die korrespondierenden Positionen in hsCYP11B1 befinden sich, wenn man das hsCYP11B1 Modell (Belkina *et al.*, 2001) betrachtet, gegenüber vom Substrateintrittskanal. Sie könnten möglicherweise für die Position und den Winkel der Schleife (insbesondere 173, 182, 184 und 188) zwischen den Helices D, E und F wichtig sein. Beim Vergleich von hsCYP11B2 mit phCYP11B1 und hsCYP11B1 fallen wesentlich mehr Unterschiede auf, die sich auf verschiedenste Regionen, verteilt über das ganze Enzym, erstrecken.

4 Diskussion und Ausblick

Im Menschen wird die Cortisolproduktion über die Reaktion des Enzyms CYP11B1 durchgeführt. 11-Desoxycortisol (RSS) wird durch Hydroxylierung an Position 11 des Steroidgerüsts in Cortisol umgewandelt. Im Körper besitzt Cortisol regulatorische Wirkungen auf verschiedene Prozesse. Außerdem wird es in der Medizin in verschiedenen Bereichen eingesetzt. Deshalb ist eine effiziente Cortisolproduktion von allgemeinem Interesse. Ziel dieser Arbeit war es, eine Variante des Enzyms CYP11B1 zu generieren, die eine erhöhte katalytische Aktivität gegenüber der humanen Form (in den Referenzstämmen) besitzt. Dabei wurde *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) als modernes mikrobiologisches System für die Expression und Analyse von Proteinen eingesetzt. Mit Hilfe dieses Systems war es erstmals möglich, Informationen über die diversen Varianten des CYP11B1 (Enzyme verschiedener Spezies und Mutanten aus der gerichteten Mutagenese) zu generieren, und einen Anhaltspunkt darüber zu bekommen, welchen Einfluss die strukturellen Unterschiede auf die enzymatische Aktivität haben.

In den Tab. 4.1 und Tab. 4.2 werden alle *S. pombe* Stämme aufgelistet, die die generierten Varianten exprimieren.

Tab. 4.1: Liste der erzeugten CYP11B Variante in den pNMT1-TOPO Vektor und der dazugehörigen Stämme

cDNA von:	Organismus	Stamm
hsCYP11B1	Mensch	HSB1
hsCYP11B2	Mensch	HSB2
hsCYP11B2 ^{P112IE147D} (hsCYP11B2m)	Mensch	HSB2M
phCYP11B1	Affe	PHB1
rnCYP11B1	Ratte	RNB1
cpCYP11B1	Meerschweinchen	CPB1
cpCYP11B2	Meerschweinchen	CPB2

cDNA von:	Organismus	Stamm
hsCYP11B1 ^{M52LV78I} (Präsequenz von hsCYP11B2)	Mensch	SZ1A
hsCYP11B1 ^{M52LV78I} (Präsequenz von hsCYP11B1)	Mensch	SZ1B

Tab. 4.2: Liste der erzeugten CYP11B Varianten in den pCAD1 Vektor und der dazugehörigen Stämme

Mutation in hsCYP11B1	Stamm	Mutation in hsCYP11B1	Stamm
Leu144Lys	SZ144	Met52Leu	SZ52
Asn152Lys	SZ152	Val78Ile	SZ78
Ala279Lys	SZ279	Met52Leu, Val78Ile	SZ1
Ile431Lys	SZ431	Thr185Ile	SZ185
Asp430Arg	SZ430	Ser112Pro	SZ112
Pro135Ala	SZ135	Ser315Gly	SZ315
Ala386Phe	SZ386	Pro322Ser	SZ322
Phe445Trp	SZ445		

4.1 *S. pombe* als System für die Expression und Analyse der CYP11B Proteine

Nach erfolgreicher Transformation von *S. pombe* sowohl mit den verschiedenen pCAD1 als auch mit den pNMT1-TOPO Plasmiden wurde die Expression der Proteine durch die Verwendung von thiaminfreiem Medium über den *nmt1* Promotor induziert. Alle pCAD1 Mutanten waren am C-Terminus mit zwei zusätzlichen Epitopen, einem Hexahistidin- und einem Pk-Tag, versehen. Bei den pNMT1-TOPO transformierten Stämmen war die Reihenfolge der beiden Epitope umgekehrt; erst ein Pk- und dann ein Hexahistidin-Tag. Die molekulare Masse der unprozessierten Enzyme beträgt ungefähr 57kDa. Dazu kommt die Masse der beiden Epitope (pK- und Hexahistidin-Tag) mit jeweils ca. 1,4kDa und 0,85kDa. Der Proteinnachweis aller Varianten ergab deshalb ein Signal bei ungefähr 60kDa.

Die Stämme wurden in An- bzw. Abwesenheit von Thiamin kultiviert, um die Expression der Cytochrome zu unterdrücken oder zu induzieren (Abb. 3.12 und Abb. 3.14). Die mit thiaminfreiem Medium behandelten Kulturen zeigten durchweg eine deutliche Bande. Bei den mit thiaminhaltigem Medium behandelten Kulturen lies sich keine solche Bande nachweisen, was die Funktionalität des *nmt1* (**n**o **m**essage in **t**hiamine (Maundrell, 1990)) Promotors bestätigt. Der *nmt1* Promotor ist ein so genannter undichter („leaky“) Promotor, dessen Aktivität über die Thiamin-Konzentration im Kulturmedium geregelt werden kann. Dabei reicht die Bandbreite der Regulation von unterdrückt über partiell aktiv bis zu maximaler Aktivität (Basi *et al.*, 1993), (Maundrell, 1993). Der Name „leaky Promotor“ rührt daher, dass der *nmt1* Promotor normalerweise nie vollständig abgeschaltet wird. Aufgrund der Einordnung des *nmt1* Promotors als durchlässiger Promotor wurde bei den Kulturen mit thiaminhaltigem Medium (Suppression des *nmt1* Promotors) zumindest eine geringe basale Proteinexpression erwartet. Überraschenderweise ließ sich jedoch bei keiner der Kulturen eine entsprechende Bande nachweisen. Ein Blick in die Literatur zeigt jedoch, dass zahlreiche Gene beschrieben sind, bei denen es zu einer vollständigen Abschaltung des *nmt1* Promotors kommt und ein Null-Phänotyp entsteht (Maundrell, 1990). Dieses Phänomen hängt u.a. von der Art des exprimierten Proteins und dessen Stabilität ab (Forsburg, 1993). Eine weitere Erklärung für die fehlenden Banden könnte in einer limitierten Sensitivität der verwendeten Färbung liegen.

Eine weitere Besonderheit beim Proteinnachweis der verschiedenen CYP11B Varianten mittels immunologischer Methoden war das Auftreten einer Doppelbande bei der Analyse von Extrakten der pNMT1-TOPO transformierten Stämme (Abb. 3.15). Einzige Ausnahme war der Stamm SZ1B. Im Gegensatz dazu war bei allen pCAD1 transformierten Stämmen

nur eine Bande im Bereich von 60 kDa zu sehen. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten dieser Doppelbanden könnte eine posttranslationale Prozessierung der exprimierten Proteine sein. Für die Expression sowohl von CYP11B1 als auch von CYP11B2 wird eine mitochondriale Importsequenz benötigt. Die Funktionalität der mitochondrialen Importsequenz wurde bereits von Bureik et al. gezeigt, (Bureik *et al.*, 2002b). Dabei fanden sich in Präparationen von Mitochondrien und Zytosol aus Hefezellen diese Proteine nur in der mitochondrialen Fraktion. Die im pNMT1-TOPO Plasmid enthaltene mitochondriale Importsequenz besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 2,7kDa. Bei genauerer Betrachtung der beiden Banden in den Extrakten der pNMT1-TOPO transformierten Stämme stellt man fest, dass die Differenz im Molekulargewicht in etwa diesen 2,7kDa entspricht. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass die Bande mit dem größeren Molekulargewicht dem unprozessierten Protein entspricht, welches noch die mitochondriale Importsequenz enthält. Die andere Bande hingegen repräsentiert das prozessierte Protein ohne Importsequenz. Im Fall der pCAD1 transformierten Stämme und des SZ1B Stammes befindet sich das Signal auf Höhe des unprozessierten Proteins mit der Importsequenz. Um diese Theorie durch weitere Fakten zu untermauern, wären allerdings weitere Analysen, z.B. mittels Massenspektrometrie, notwendig.

Eine Doppelbande aus prozessiertem und unprozessiertem Protein wurde bereits in der Literatur beschrieben (Bureik *et al.*, 2002b). Bureik et al. exprimierten hsCYP11B2 in *S. pombe* und fügten einen pK-Tag zunächst am N-Terminus und anschließend am C-Terminus ein. Bei Lokalisation des pK-Tags am C-Terminus beobachteten sie zwei Banden während bei der Variante mit dem pK-Tag am N-Terminus nur eine Bande nachweisbar war. In der vorliegenden Arbeit wurde nur die C-terminale Anwesenheit des pK-Tags und des Hexahistidin-Tag getestet. Die Anordnung der beiden Epitope war jedoch in den zwei verwendeten Vektoren (pCAD1 und pNMT1-TOPO) invers. Es zeigte sich aber, dass die Position der beiden Epitopen zueinander keine Auswirkung auf das Auftreten von einer oder zwei Banden hatte. Sowohl in den Proteinen, die mittels pCAD1 als auch in jenen, die mit dem pNMT1-TOPO Vektor (Stamm SZ1B) exprimiert wurden, war jeweils nur eine Bande nachweisbar. Im Gegensatz zur Anordnung der verschiedenen Epitope scheint die Anwesenheit von Aminosäuresequenzen mit bestimmten Charakteristika am N-Terminus von besonderer Bedeutung für die posttranslationale Prozessierung der Proteine zu sein. Tatsächlich wurde CYP11B1 in SZ1B im Gegensatz zu allen anderen pNMT1-TOPO transformierten Stämmen mit seiner eigenen spezifischen Präsequenz exprimiert. Alle anderen Stämme enthielten die Präsequenz des CYP11B2.

Eine weitere Erklärung für das Vorhandensein einer Doppelbande könnte eine Degradation des Proteins sein. Da bei einer Degradation aber in der Regel diverse Abbauprodukte entstehen, würde man auf den Gelen mehr als zwei Banden erwarten. Da aber nur zwei Banden bei den hier durchgeführten Analysen gefunden wurden, ist die Degradation der CYP11B Enzyme eine eher unwahrscheinliche Erklärung für die beobachtete Doppelbande.

Der intrazelluläre Transport von neu synthetisierten Vorläuferproteinen zu den Mitochondrien hängt von der so genannten „**m**itochondrial **t**argeting **s**equence“ (MTS) ab, die am N-Terminus des Präproteins lokalisiert ist (Schleiff, 2000). Die MTS ist allerdings nicht nur der intrazelluläre Lotse, der die Präproteine zu den Mitochondrien geleitet, sondern ist auch für alle nachfolgenden Schritte des Transports der Präproteine aus dem Zytosol in die Mitochondrien notwendig (Omura, 1998), (Stojanovski *et al.*, 2003). Nach dem erfolgreichen Transfer der Präproteine in die Mitochondrien sind drei Peptidasen für die proteolytische Prozessierung dieser Vorläuferproteine verantwortlich. Die „**m**itochondrial **p**rocessing **p**eptidase“ (MPP) spaltet die große Mehrheit der mitochondrialen Proteine, während die „**i**nner **m**embrane **p**eptidase“ (IMP) und die „**m**itochondrial **i**ntermediate **p**eptidase“ (MIP) nur spezifische Vorläuferpolypeptide spalten (Gakh *et al.*, 2002). Für einige Fe/S Proteine verschiedenen Ursprungs wurden Sequenzen identifiziert, die für die Erkennung der entsprechenden Peptidasen zuständig sind, insbesondere für MPP und MIP (Nett *et al.*, 1998), (Hartl *et al.*, 1986). Modifikationen in den entsprechenden Aminosäuresequenzen führten zu Änderungen bei der Prozessierung der Proteine. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Anwesenheit bestimmter Aminosäuren und die Länge der mitochondrialen Importsequenzen eine wichtige Rolle beim Import und bei der intramitochondrialen Prozessierung spielen (Kojima *et al.*, 2001), (Kumamoto *et al.*, 1989). Aus diesen Befunden lässt sich schlussfolgern, dass Signale humanen Ursprungs für den mitochondrialen Import in *S. pombe* different wahrgenommen werden. In der Folge läuft dann wahrscheinlich auch die posttranslationale Prozessierung anders ab. Dabei sind einige Sequenzen mehr und andere weniger effektiv, wie an der Anwesenheit von einer oder zwei Banden bei verschiedenen Importsequenzen zu sehen ist.

Die Anwesenheit diverser CYP11B Varianten in den Mitochondrien von *S. pombe* konnte bereits gezeigt werden. Es bleibt jedoch noch zu klären, ob sich die Proteine tatsächlich an der inneren Mitochondrienmembran befinden oder ob sie in anderen Kompartimenten (z.B. äußere Membran, zwischenmembranöser Raum, Matrix) lokalisiert sind. Gesichert ist jedoch, dass die katalytische Aktivität der Enzyme erhalten bleibt. Wenn man die Aktivitäten der beiden Stämme SZ1A und SZ1B betrachtet, welche das gleiche Protein mit unterschiedlichen Präsequenzen exprimieren, so findet man einen statistisch signifikanten Unterschied (Abb.

3.20). Dabei wies SZ1B in der Position des Cytochroms nur eine Bande auf, die wahrscheinlich dem unprozessierten Protein entspricht. Es kann deshalb spekuliert werden, dass das Vorhandensein der Importsequenz im unprozessierten Protein die enzymatische Aktivität im Vergleich zu SZ1A reduziert. Es bleibt jedoch unklar, warum nicht prozessierte Proteine überhaupt enzymatische Aktivität besitzen und woher die für die Katalyse notwendigen Elektronen stammen. CYP11B Enzyme benötigen Elektronen, um ihre katalytische Aktivität entfalten zu können. Bei Menschen entstammen diese Elektronen ausschließlich von dem Elektronentransporter Adx, das die Elektronen von einer NADPH-abhängige Reduktase (AdR) bekommt. In *S. pombe* hingegen wurde in den Mitochondrien das Protein *etp1_{fd}* identifiziert, welches die Funktion von Adx ersetzen kann (Bureik *et al.*, 2002b). Zwar konnte die Anwesenheit und Funktion von *etp1_{fd}* in den Mitochondrien von *S. pombe* gezeigt werden, aber das genaue Kompartiment, in dem *etp1_{fd}* lokalisiert ist, ist noch Gegenstand von Spekulationen. Es könnte jedoch vermutet werden, dass sich *etp1_{fd}* im selben Kompartiment befindet, wie auch die Cytochrome, weil die Umsetzung von RSS zu Cortisol durch die Proteine gemessen werden konnte.

Die mitochondriale Importsequenz ist aber nicht der einzige Einflussfaktor für die Aktivität der CYP11B Enzyme. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass in *S. pombe* auch noch andere Faktoren eine Rolle spielen. Obwohl kein direkter Vergleich der beiden in dieser Arbeit verwendeten Vektoren (pCAD1 und pNMT1-TOPO) durchgeführt wurde, besteht Anlass zu der Vermutung, dass die Wahl des Vektors einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität ein und desselben Enzyms hat. In den vorgestellten Versuchen wurde das gleiche Enzym mit derselben Präsequenz, aber in zwei Vektoren, in *S. pombe* exprimiert (Stamm SZ1 und SZ1B). Dabei fanden sich starke Aktivitätsunterschiede sowohl im Vergleich zu den Referenzstämmen (Abb. 3.18 und 3.20) als auch in den absoluten Werten des aus RSS synthetisierten Cortisols (Tab. 3.7 und 3.8). Der Vergleich zu den Referenzstämmen ergab, dass SZ1 (350,83%) 3,5mal mehr Cortisol als CAD1 produzierte und SZ1B (151,77%) nur 1,5mal mehr als HSB1. Die absoluten Werte zeigten eine Cortisolsynthese von 28,27µM/Tag für SZ1 und 6,48µM/Tag für SZ1B pro 10⁹Zellen. Es ist schwierig, eine plausible Erklärung für diesen Unterschied zu finden, weil die Daten nicht ausreichend sind. Man kann höchstens vermuten, dass sowohl die Anordnung der Tags als auch die Wahl des zu transformierenden Stammes eine Rolle in der Aktivitätsentfaltung spielt.

Die humanen mitochondrialen Importsequenzen scheinen in *S. pombe* gut zu funktionieren, so dass die Proteine tatsächlich in die Mitochondrien gelangen. Die genauen Mechanismen

des Transportes der Vorläuferproteine in die Mitochondrien und die genauen Mechanismen der intramitochondrialen Prozessierung der Proteine in *S. pombe* sind bislang aber noch unzureichend aufgeklärt und verstanden. Darüber hinaus sind auch die Faktoren, die die enzymatische Aktivität von in *S. pombe* exprimierten Proteinen aus anderen Organismen regulieren, bislang noch Gegenstand von Spekulationen. Trotz aller Unklarheiten hat sich *S. pombe* in der vorliegenden Arbeit als ein geeignetes System für die Expression von CYP11B Proteinen bestätigt. Da auch die katalytische Aktivität der Enzyme erhalten blieb, war mit diesem System erstmals eine Untersuchung von verschiedenen CYP11B Varianten möglich.

4.2 Die CYP11B1 Varianten

Enzyme sind Proteine, die chemische Reaktionen katalysieren. Ihre Funktion beruht auf Interaktionen zwischen Enzym und Substrat, Enzym und Produkt sowie auf Wechselwirkungen mit anderen Enzymen. Daneben wird die katalytische Aktivität auch wesentlich von den Umgebungsbedingungen, wie z.B. Temperatur und pH, beeinflusst. In der Natur existieren darüber hinaus verschiedene Arten von Wechselwirkungen, die am korrekten Ablauf einer chemischen Reaktion beteiligt sind. Dazu gehören z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Wechselwirkungen, hydrophobe Kräfte und sterische Effekte. Eine enzymatische Reaktion ist das Abbild all dieser Einflussfaktoren, die in ihrer Summe und aufgrund ihrer Wechselwirkungen untereinander in der Lage sind, eine Reaktion in eine bestimmte Richtung zu treiben. Das Vorhandensein von Modifikationen (Mutationen) im Enzym kann deshalb zu erheblichen Änderungen im Gleichgewicht der betreffenden Reaktion führen. Die Funktion eines Enzyms hängt von seiner Primär (Abfolge der Aminosäuren mit ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften)-, Sekundär (Anordnung der Atome eines Moleküls im dreidimensionalen Raum)-, Tertiär (dreidimensionale Anordnung der gesamten Aminosäurekette im Raum)- und, sofern vorhanden Quartärstruktur (Anordnung der Bestandteile eines Proteinkomplexes) ab. Das Enzym hsCYP11B1 befindet sich *in vivo* an der inneren Mitochondrienmembran, weshalb seine dreidimensionale Struktur schwierig zu analysieren ist. Um trotzdem Informationen über seine räumliche Struktur zu erhalten, wurde im Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes ein dreidimensionales Modell von hsCYP11B1 mittels „homology modeling“ hergestellt (Belkina *et al.*, 2001). Dieses Modell wurde als Grundlage für die Untersuchungen an hsCYP11B1 verwendet. Prinzipiell besitzen die Cytochrome P450 eine relativ ähnliche dreidimensionale Struktur, obwohl die Aminosäuresequenzen extreme Unterschiede aufweisen. Auch im Falle des hsCYP11B1 existieren hoch konservierte und sehr variable Regionen (Abb. 4.1). Eine der hoch konservierten Regionen ist in der Nähe des Häms lokalisiert und umfasst mehrere Strukturelemente, unter denen sich auch die besonders wichtige I-Helix befindet. Die variablen Abschnitte hingegen beinhalten einerseits die Regionen der Substraterkennung (SRS), die sich in der Nähe des Substrateintrittskanals und der Substratbindungsstelle befinden, und auf der anderen Seite die Regionen, die für Interaktionen mit dem Redoxpartner verantwortlich sind (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000).

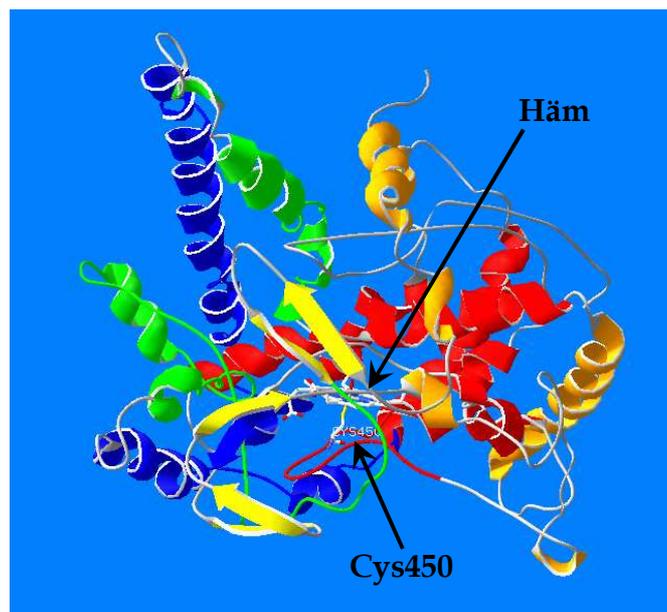


Abb. 4.1: Modell von humanem CYP11B1. Die verschiedenen Farben repräsentieren die unterschiedliche strukturellen und funktionellen Bereiche: rot - I-Helix und Core-Domäne, blau - Bindungsdomäne, grün - Regionen für die Interaktionen mit dem Substrat. Außerdem sind das Häm und Cys450 dargestellt

Die hier untersuchten natürlichen Varianten des hsCYP11B1 sowie die Mutanten des Plasmids pCAD1 repräsentieren einerseits Zufallsmodifikationen und andererseits gerichtete Mutanten. Mit Hilfe der in der vorliegenden Promotionsarbeit erhobenen Daten ist es nun erstmals möglich, die enzymatischen Aktivitäten all dieser Varianten miteinander zu vergleichen und unter Verwendung adäquater Referenzstämme Erhöhungen bzw. Erniedrigungen in der Aktivität festzustellen. Außerdem können durch die Identifikation von gemeinsamen Eigenschaften Gruppen gebildet werden, die die Lokalisation und Funktion von Veränderungen in der Aminosäuresequenz bestimmten Bereichen der dreidimensionalen Struktur zuordnen.

4.2.1 CYP11B1 Varianten mit niedrigerer Aktivität

In der vorliegenden Studie wiesen die meisten Varianten des hsCYP11B1 eine erniedrigte enzymatische Aktivität gegenüber dem entsprechenden Referenzstamm auf. Insgesamt 4 Stämme zeigten einen vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität. Bei fast allen anderen Varianten mit erniedrigter Aktivität erreichte die verbliebene Aktivität maximal

25% des Referenzstammes. Es fällt auf, dass bei fast allen Varianten mit Aktivitätsverlust dieser Aktivitätsverlust sehr deutlich ausfiel. Eine graduelle Abstufung des Aktivitätsverlusts über die ganze Bandbreite scheint kaum zu existieren. Die einzige Ausnahme stellt die Mutation Thr185Ile mit einer Restaktivität von 73% dar.

Die Mutation Ser112Pro zeigte eine Restaktivität von ungefähr 15% (Abb. 3.16) im Vergleich zum Referenzenzym (hsCYP11B1). Die Position 112 wurde bereits von Bechtel et al. in hsCYP11B2 analysiert (Bechtel *et al.*, 2002). Dabei führte ein Austausch des Ile in Position 112 gegen ein Pro (wie bei mCYP11B1) zu einer gesteigerten Hydroxylierungsaktivität gegenüber RSS und 11-Desoxycorticosterone (DOC). Der Austausch gegen ein Serin (wie bei hsCYP11B1) hingegen hatte keine Änderung der Aktivität zur Folge. In beiden Fällen erreichte die Aktivität aber nicht die des hsCYP11B1. Wahrscheinlich ist die Mutation Ile112Pro in dem aldosteronsynthetisierenden Enzym (hsCYP11B2) wesentlich effektiver als bei hsCYP11B1, was eventuell durch die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der beiden Aminosäuren Serin und Pro zu erklären ist. Obwohl beide Aminosäuren sehr klein sind, ist Serin deutlich hydrophiler, was als Hinweis auf eine erhöhte Substratspezifität gewertet werden kann. Das Substrat RSS besitzt eine OH-Gruppe in Position 17 mit Hilfe derer es eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Ser112 ausbilden könnte, die möglicherweise Einfluss auf die korrekte Positionierung des Substrates nimmt. Dies könnte erklären, warum die Insertion eines Pro nicht den erwarteten Einfluss in hsCYP11B1 hatte. DOC hingegen besitzt diese OH-Gruppe nicht. In hsCYP11B2 könnte die aktivitätssteigernde Wirkung solcher Mutationen (Austausch des Ile112 gegen eine kleinere Aminosäure, wie z.B. Pro) mit einer schnelleren und einfacheren Passage des Substrates durch einen verbreiterten Substrateintrittskanal erklärt werden. Die Anwesenheit eines Ile in hsCYP11B2 und eines Ser in hsCYP11B1 ist deshalb ein guter Indikator für die funktionellen Unterschiede beider Enzyme.

Die beiden Mutationen Ser315Gly und Pro322Ser befinden sich beide in der für das Enzym besonders wichtigen I-Helix (Li und Poulos, 2004), und wiesen eine Restaktivität von 11% bzw. 25% auf (Abb. 3.16). In Patienten mit adrenogenitalem Syndrom (AGS) wurde kürzlich gezeigt, dass die dem Ser315 benachbarte Mutation Gly314Arg in CYP11B1 auch aktivitätszerstörend wirkt (Kuribayashi *et al.*, 2005). Sowohl Ser315 als auch Pro322 sind Teil eines Umschlagpunktes (Knick) der I-Helix. Die Aminosäure Gly ermöglicht eine maximale Rotationsfreiheit am α -Kohlenstoff. Im Gegensatz dazu zerstört Pro im Zentrum der Helix deren Kontinuität. Aufgrund dessen sollten diese beiden Varianten einen Einfluss auf die Struktur der I-Helix haben. Die besondere Bedeutung der I-Helix liegt in ihrer Rolle bei der

korrekten Positionierung des Häms, dem katalytischen Zentrum des Enzyms (Denisov *et al.*, 2005). Eine Verdrehung der I-Helix wurde in diversen Strukturmodellen von Cytochromen P450 beobachtet. Beim CYP121 fehlt diese Verdrehung allerdings (Leys *et al.*, 2003). In anderen Cytochromen, wie z.B. dem CYP51, ist diese Verdrehung stark ausgeprägt (Podust *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass die meisten hier untersuchten Varianten des CYP11B1 eine erniedrigte Aktivität gegenüber dem hsCYP11B1 aufwiesen, kann dahingehend interpretiert werden, dass hsCYP11B1 evolutionsbedingt bereits eine nahezu perfekte Orientierung für seine Aufgabe erreicht hat. Das Potential für eventuelle Verbesserungen in dieser Molekülregion ist deshalb nur noch sehr gering. Andererseits bleibt festzustellen, dass trotz des Angriffs in einem derart wichtigen Abschnitt des Enzyms wie der I-Helix die Aktivität nur herabgesetzt aber nicht komplett abgeschaltet wurde. Wenn die enzymatische Aktivität in Bezug auf ein spezifisches Substrat herabgesetzt wird, kann spekuliert werden, dass im Gegenzug die Spezifität für andere Substrate erhöht wird. So wurden beispielsweise singuläre und kombinierte Mutationen im Bereich der I-Helix von hsCYP11B1 und hsCYP11B2 beschrieben, bei denen jeweils die komplementäre Aminosäure des anderen Enzyms eingefügt wurde (Bottner *et al.*, 1996), (Bottner *et al.*, 1998), (Curnow *et al.*, 1997). Alle diese Änderungen in der Aminosäuresequenz führten zwar nicht zu einem Aktivitätsverlust, aber zu einem Tausch in der Substratspezifität der beiden Enzyme. Es wäre deshalb sehr interessant den Effekt dieser beiden Mutationen (Ser315Gly und Pro322Ser) auf andere Substrate zu untersuchen.

Bei der Mutation Thr185Ile wurde nur eine leichte Verringerung der Aktivität gefunden. Die Restaktivität betrug 73% (Abb. 3.18). Ein vergleichbares Ergebnis wurde von Hampf (Hampf, 2001) für dieselbe Mutation in hsCYP11B2 in COS1 Zellen berichtet. Im Vergleich zum hsCYP11B1 zeigte sich jedoch eine deutliche Erhöhung der 11 β -Hydroxylierungsaktivität. Der Umsatz von RSS zu Cortisol war allerdings um 30% niedriger als der des hsCYP11B1. Die Position 185 befindet sich an der Oberfläche des Enzyms und könnte zu einer Abschwächung der Bindung von Adrenodoxin führen (Sugano *et al.*, 1996). Es wurde postuliert (Hampf, 2001), (Bureik *et al.*, 2002a), dass der Einfluss dieser Mutation auf diese Bindung in hsCYP11B1 wahrscheinlich nicht so ausgeprägt ist wie in hsCYP11B2. Eine Substitution an Position 185 durch eine Aminosäure, die einen noch größeren Einfluss auf die Ionenstärke zur Folge hat, könnte möglicherweise einen deutlich ausgeprägteren Einfluss auf die enzymatische Aktivität ausüben.

Die Mutationen Asp430Arg, Leu144Lys und Ile43Lys hatten das Ziel, eine positive Ladung in das Molekül einzubringen, und somit Einfluss auf die Redoxpartnerbindung zu nehmen (Abb. 3.17). Von diesen 3 Mutationen wies nur Asp430Arg eine Restaktivität von ungefähr

12% auf. Bei den Varianten Leu144Lys und Ile431Lys hingegen war keinerlei Restaktivität messbar. Obwohl im Western Blot eine deutliche Expression dieser Mutanten zu sehen, war (Abb. 3.13), was als Hinweis auf die Stabilität dieser Proteine ist, haben die Ergebnisse der Aktivitätstest dies nicht bestätigen können. Die Bedeutung von positiv geladenen Aminosäuren für die Funktion der Cytochrome P450 wurde bereits mehrfach gezeigt und ist am ehesten in der Interaktion mit dem entsprechenden Redoxpartner zu sehen. Das Enzym CYP27A1 besitzt eine erhöhte Affinität gegenüber seinem Redoxpartner Adx, den es mit hsCYP11B1 gemeinsam hat (Pikuleva *et al.*, 1999). Die Mutationen der beiden konservierten Lys (Lys354Ala und Lys358Ala) sowie die Modifikation des Arg418 (entspricht der Position 430 des hsCYP11B1) führten zu einer Verringerung der Affinität gegenüber Adx um mindestens das 20fache. Ein vergleichbarer Effekt wurde für CYP11A1 beobachtet. Die Mutation von positiv geladenen Resten (Lys405, Arg425, Arg426) an der Oberfläche des Proteins CYP11A1 haben übereinstimmend einen Einfluss auf die elektrostatische Interaktion zwischen dem Protein und seinem physiologischen Redoxpartner Adx gezeigt (Lepesheva *et al.*, 2000), (Azeva *et al.*, 2001). Obwohl hsCYP11B1 derselben Familie wie CYP11A1 angehört und eine relativ große Homologie zum CYP27A1 aufweist, resultierte die Substitution mit positiv geladenen Aminosäuren nicht in dem erhofften Effekt. Die Positionen 430 und 431 befinden sich in der der I-Helix vorgeschalteten Schleife und entsprechen der Position Arg418 des CYP27A1 bzw. der Position Lys405 des CYP11A1. Die Funktion dieser Aminosäuren bezüglich der Interaktion mit Adx wird daher möglicherweise in hsCYP11B1 von anderen positiv geladenen Aminosäuren ausgeübt (Arg422, Arg427 und Arg432), die sich räumlich ganz in der Nähe befinden und von Aminosäuren wie z.B. Trp und Tyr gefolgt sind. Trp und Tyr können auch eine Rolle für den Elektronentransfer zwischen beiden Redoxpartnern spielen. Die Position 144 befindet sich in der Nähe eines Arg zwischen der C- und der C1-Helix. In dieser Region (B-, C- und C1-Helix) befinden sich bereits diverse positive Reste. In der D-Helix existieren sogar 3 direkt hintereinander geschaltete Lys. Sehr wahrscheinlich hat die Verteilung der positiven Ladungen, die an der Wechselwirkung mit Adx beteiligt sind, bereits einen optimalen Zustand erreicht, was erklären könnte, dass die Mutation Leu144Lys zu einer Störung der Interaktion mit Adx führt und mit einem kompletten Verlust der Aktivität einhergeht. Neben dem eben beschriebenen Einfluss positiv geladener Reste wurde postuliert, dass auch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Redoxpartnern eine wichtige Rolle spielen (Beckert und Bernhardt, 1997).

Von den hier untersuchten Mutationen sind 3 weitere, Pro135Ala, Ala386Phe und Phe445Trp, an der Redoxpartnerbindung und dem Elektrontransfer (ET) beteiligt (Abb. 3.17). Von diesen 3 Mutationen besaß nur Phe445Trp eine Restaktivität, die sich auf 22%

belief. Bei den anderen beiden schwankten die Werte zwischen 0 und 3%. Die Position 135 befindet sich mitten in einer hoch konservierten Region der C-Helix. Dieser Bereich wird als möglicher Bereich der Adx-Bindung angesehen (Belkina *et al.*, 2001). Die Substitution eines sog. „Helixbrechers“, wie z.B. Pro, stört die korrekte Positionierung der Helix und somit den Elektronentransfer. In der Originalsequenz des CYP11B1 von Kawamoto (Kawamoto *et al.*, 1990b) befindet sich an Position 386 ein Val. Funktionell macht es jedoch keinen Unterschied, ob an dieser Stelle ein Val oder ein Ala vorliegt. Der Einbau einer noch größeren und hydrophoberen Aminosäure, wie z.B. Phe, hat jedoch sehr negative Auswirkungen. Deutlich schwächer im Vergleich zu Pro135Ala sind die Auswirkungen der Mutation Phe445Trp auf die enzymatische Aktivität. Die Position 445 befindet sich in der wichtigen Signatur (F-x-x-G-x-R/H-x-C-x-G), die die absolut konservierte Aminosäure Cys450 als fünften Ligand des Häm-Eisen enthält. Obwohl bei der getesteten Mutation Phe durch eine andere aromatische Aminosäure (wie z.B. in CYP27A1 [Tyr] und in CYP11A1 [Trp])) ersetzt wurde, war die enzymatische Aktivität stark reduziert. Dieser Befund, zusammen mit dem hohen Konservierungsgrad dieser Aminosäure in den P450 Cytochromen anderen Organismen, lässt die Vermutung zu, dass Phe für den ET zwischen den beiden Redoxpartnern von essentieller Bedeutung ist. Tatsächlich befindet sich diese Position in einem Hot-Spot des Elektronenwegs für dieses Cytochrom (Programm: HARLEM, (Beratan und Skourtis, 1998)).

Auch bei den Stämmen, die die Enzyme der verschiedenen Organismen exprimieren, gab es zwei Stämme, bei denen die Cortisolproduktion stark reduziert war. Im Stamm RNB1 war keine Enzymaktivität nachweisbar. Der Stamm CPB1, der das CYP11B1 Enzym aus Meerschweinchen exprimiert, besaß hingegen noch eine Restaktivität von 22%. Bei beiden Stämmen könnte die reduzierte enzymatische Aktivität verschiedene Ursachen haben. Betrachtet man den in Abb. 4.2 dargestellten Sequenzvergleich, dann fällt auf, dass nur bei diesen beiden Enzymen im Bereich der Verbindung zwischen G- und H-Helix, der als wichtig für die Interaktion mit dem Redoxpartner angesehen wird (Hlavica *et al.*, 2003), eine Aminosäure fehlt. Diese Region ist außerdem durch eine Serie hydrophiler Aminosäuren gekennzeichnet, die in mCYP11B1 durch ein Trp unterbrochen wird. Die Anwesenheit dieses Trp in Position 366 des cpCYP11B1, an der sich bei allen anderen Enzymen eine positiv geladene Aminosäure befindet (Abb. 4.2), könnte eine Erklärung für dessen reduzierte Aktivität sein (Bulow und Bernhardt, 2002). Beim Enzym der Ratte wird die positive Ladung an dieser Stelle beibehalten. Allerdings geht die Elektropositivität an anderen Stellen, im Inneren des Enzyms, verloren. In der G-Helix befindet sich in Position 273 ein Asn an Stelle des Lys. In der Nähe befinden sich jedoch mit Lys272 und Arg276 noch

weitere positiv geladene Aminosäuren. Besonders auffällig ist das His304, welches immer ein Lys am Beginn der I-Helix ersetzt. In diesem Fall kann man eine Verbindung zwischen der Interaktion des Cytochroms mit seinem Redoxpartner und dem aktiven Zentrum des Enzyms vermuten. Schlussendlich muss noch das Gln478 erwähnt werden, welches immer ein Lys in der C-terminalen Region ersetzt. Basierend auf Erkenntnissen vorausgegangener Studien (Bottner *et al.*, 1998) hat eine Mutation in diesem Bereich keine Auswirkung auf die enzymatische Aktivität. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass, wie bereits erläutert, die Substitution des Ala in Position 135 fatale Folgen für die Enzymaktivität hat. Zusammenfassend weisen alle diese Faktoren darauf hin, dass die erniedrigte Aktivität der Stämme RNB1 und CPB1 durch eine reduzierte Bindungskapazität für den Redoxpartner und eine gestörte Interaktion mit Selbigem zu erklären ist. In dem hier verwendeten System *S pombe* wird *etp1_{ft}* als Redoxpartner vermutet. Die Anwesenheit von Adx (z.B. mit einer Coexpression derselben) würde vermutlich zu differenten Ergebnissen führen, was allerdings nicht das Ziel dieser Arbeit war.

hsB1	269	CIFQYGDNCIQKIYQELAFSRPQQYTSIVAELLNNAELSPDAIKANSMELT	312
phB1	269	CIFQYGDNCIQKIYQELALSRPQQYTSIVAELLNNAELSPDAIKANSMELT	312
hsB2	269	CIFQYGDNCIQKIYQELAFNRPQHYTGIVAELLNNAELSLDAIKANSMELT	312
btB1	269	YIFQYANRAIQRIYQELALGHPWHYSGIVAELLMRADMTLDTIKANTIDL	312
cpB1	269	YISEYAENRIQKKYEELARGCSQYNS-IVANLMLQGNLPLRAMKANIMDLV	312
cpB2	270	YIFDYADSWIQKTYQKLVCSYPQYYSGIMADLLLQGDLSVNAIKANSIELT	313
rnB1	268	IISEYVTKCIKNVYRELAEGRQQSWS-VISEMVAQSTLSMDAIHANSMELI	311
		■ : ■ ■ : ■ : ■ : . . : : : : : . . : . : ■ : ■	
hsB1	360	TEPLLLRAALKETLRL	375
phB1	360	TEPLLLRAALKETLRL	375
hsB2	360	TEPLLLRAALKETLRL	375
btB1	360	TEPLLLRAALKETLRL	375
cpB1	360	MELPLLWAAIKETLRM	375
cpB2	361	TEPLLLRAALKETLRL	376
rnB1	359	SDLPLLRAALKETLRL	374
		: ■ ■ ■ : ■ ■ ■ :	

Abb. 4.2: Ausschnitte des Sequenzvergleichs verschiedener CYP11B Enzyme aus verschiedenen Spezies. Oben: Bereich zwischen G-Helix und Anfang der I-Helix. Unten: Teil der K-Helix mit der Position 366

4.2.2 CYP11B1 Varianten mit vergleichbarer Aktivität

Während die meisten der untersuchten Stämme eine reduzierte Aktivität aufwiesen, zeigten andere keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf die Aktivität. Bei einigen dieser Stämme war die beobachtete Aktivität mit dem Referenzstamm identisch. Die Stämme

SZ152, SZ52 und CPB2 zeigten sogar eine tendenzielle Erhöhung der Cortisolproduktion. Die relativ kleinen Unterschiede erreichten aber aufgrund der zahlreichen Interaktionen mit anderen Proteinen, wie sie in einem *in vivo* System wie *S. pombe* unvermeidbar sind, wahrscheinlich das Signifikanzniveau nicht. Ein direkter Vergleich der Enzyme mit einem *in vitro* System könnte hier möglicherweise die potentiellen Störfaktoren eliminieren und die beobachteten Unterschiede besser herausarbeiten.

Die CYP11B1 Mutanten Asn152Lys und Ala279Lys besaßen eine enzymatische Aktivität von 121% bzw. 104% im Vergleich zum entsprechenden Referenzstamm (Abb. 3.17). In beiden Fällen wurde durch das Einführen des Lys eine positive Ladung transferiert, die die Bindung mit dem Redoxpartner beeinflussen sollte. Das Ergebnis war allerdings nur eine tendenzielle Erhöhung der enzymatischen Aktivität. Beide Positionen befinden sich in putativen Regionen für die Redoxpartnerbindung; Ala279 in der G-Helix, und Asn152 in der Sequenz zwischen C1- und D-Helix. In der zur Position 279 homologen Position des CYP102 ist ein Lys vorhanden, das als hoch konservierte basische Aminosäure angesehen wird (Hlavica *et al.*, 2003). In hsCYP11B1 hat die Mutation eines Ala in ein Lys keinen nennenswerten positiven Einfluss auf die Aktivität. Dieser Befund ist erstaunlich, da zwischen Ala und Lys erhebliche Unterschiede bezüglich Struktur und Ladung bestehen. Die Erklärung für diesen unerwarteten Befund könnte möglicherweise in den feinen Unterschieden zwischen dem korrekten Redoxpartner (Adx) und seinem Homolog in *S. pombe etp1_{fd}* liegen. Eine ähnliche Überlegung kann für die Mutation Asn152Lys angestellt werden, obwohl hier die Aktivität immerhin um 21% höher lag als beim Referenzstamm. Auch Hampf (Hampf, 2001) untersuchte diese Position sowohl in hsCYP11B2 als auch in hsCYP11B1. Allerdings verwendete er COS1 Zellen als Expressionssystem und setzte nur DOC als Substrat ein. Der Verlust des Lys in hsCYP11B2 resultierte in einer generellen Reduktion aller katalytischen Aktivitäten, auch der 11 β -Hydroxylierung. In hsCYP11B1 hingegen wurde ein Lys hinzugefügt, was aber keinen Einfluss auf die 11 β -Hydroxylierungsaktivität hatte. Aufgrund der derzeitigen Datenlage kann man somit nicht von einer Mutation mit Auswirkungen auf die Redoxpartnerbindung sprechen.

Eine der höchsten Aktivitäten in dieser Gruppe wurde vom Stamm SZ52 mit 127% erreicht (Abb. 3.19). In der Originalsequenz von Kawamoto befindet sich in Position 52 ein Leu (Kawamoto *et al.*, 1990b). btB1 und rnB1 weisen hingegen an Position 52 ein Met auf, während bei cpB1 und cpB2 ein Val an dieser Stelle steht. In allen anderen Sequenzen ist die Position 52 durch ein Leu besetzt. Die Position 52 befindet sich in einer Region großer Variabilität an der Oberfläche des Proteins, zwischen A-Helix und dem β -Faltblatt. Daher

kann vermutet werden, dass Modifikationen in diesem Bereich nur einen relativ geringen Einfluss auf die katalytische Aktivität des Enzyms haben.

Zu dieser Gruppe von Varianten gehören die Enzyme von zwei Organismen, die überraschenderweise eine höhere Cortisolproduktion als erwartet zeigen. Im Stamm HSB2 betrug die Aktivität 104% im Vergleich zum Referenzstamm HSB1 (Abb. 3.19). Es ist allerdings nicht überraschend, dass die 11 β -Hydroxylierungskapazität von hsCYP11B2 der von hsCYP11B1 gleicht, da sowohl die Primär- als auch die Tertiärstruktur sehr ähnlich sind (92% Homologie in Bezug auf die Primärstruktur, siehe Tab. 3.9). Außerdem katalysiert hsCYP11B2 im Menschen zunächst die Hydroxylierung von DOC in Position 11, dann in Position 18, und schlussendlich die Oxidation in Position 18. Es wurde bereits in mehreren Studien die Fähigkeit von hsCYP11B2 und diversen Mutanten untersucht, RSS in Cortisol zu konvertieren, (Bottner *et al.*, 1996), (Bottner *et al.*, 1998), (Curnow *et al.*, 1997), (Bechtel *et al.*, 2002), (Bottner *et al.*, 1998). Dabei sollte herausgefunden werden, welche Aminosäuren den Unterschied zwischen hsCYP11B1 und hsCYP11B2 determinieren. Die Affinität beider Enzyme zu verschiedenen Substraten reflektiert eine gewisse Flexibilität der Enzyme. Die Ursache für diese Flexibilität liegt möglicherweise in der Anwesenheit von strategisch wichtigen Aminosäuren in der Primärstruktur beider Enzyme. In den im Rahmen dieser Studie verwendeten Sequenzen finden sich an insgesamt 34 Positionen Differenzen in der Aminosäuresequenz zwischen hsCYP11B1 und hsCYP11B2. Da diese Positionen über das ganze Enzym verteilt, sind ist es schwierig, potentielle Schlüsselpositionen herauszufiltern. In Versuchen mit COS1 Zellen, wurden unter Verwendung des Substrates RSS (im Gegensatz zu DOC) ein signifikanter Unterschied beobachtet (Bottner *et al.*, 1996). Der Umsatz von RSS durch hsCYP11B2 war viel niedriger als durch hsCYP11B1. Diese Befunde konnten mit *S. pombe* im Rahmen der vorliegenden Studie allerdings nicht bestätigt werden. Dabei dürfte die Diskrepanz zwischen beiden Studien am ehesten in der Diversität der verwendeten Expressionssysteme und in einer unterschiedlichen Affinität zum Redoxpartner *etp1_{fa}* zu suchen sein.

Auch der Stamm CPB2 zeigte tendenziell eine leicht erhöhte Aktivität (110% im Vergleich zu HSB1). Diese Werte sind mit denen von hsCYP11B2 vergleichbar (Abb. 3.19). Die Sequenz des Meerschweinchenenzym weist einen hohen Grad der Homologie mit den beiden humanen Enzymen auf (Tab. 3.9). Die Homologie von CPB2 mit hsCYP11B1 und hsCYP11B2 ist sogar größer als die von cpCYP11B1 mit den beiden humanen Enzymen. Dementsprechend ist auch die Aktivität von cpCYP11B2 größer als die von cpCYP11B1. In einer Studie von Bulow *et al.* konnte in COS1 Zellen eine höhere 11 β -

Hydroxylierungsaktivität von cpCYP11B2 im Vergleich zu cpCYP11B1 gezeigt werden (Bulow und Bernhardt, 2002). Dieser Befund ähnelt den Resultaten des humanen CYP11B2 und untermauert die Hypothese, dass die aldosteronsynthetisierenden Enzyme wahrscheinlich flexibler bezüglich des Substrates für die 11 β -Hydroxylierung sind. Diese Flexibilität verstärkt sich, wenn, wie z.B. im Fall von DOC, das Substrat in Position C17 einen kleineren Substituenten aufweist.

4.2.3 CYP11B1 Varianten mit erhöhter Aktivität

Alle in diesem Kapitel diskutierten Stämme zeigten eine signifikant höhere enzymatische Aktivität als die entsprechenden Referenzstämme.

SZ78 und SZ1 sind die einzigen pCAD1 transformierten Stämme, die einen gesteigerten Umsatz zeigten (293% und 351%) (Abb. 3.19). Die Substitution des Val in Position 78 durch Ile ist die zweite Mutation neben der Position 52, durch die versucht werden sollte, die Originalsequenz von Kawamoto zu imitieren (Kawamoto *et al.*, 1990b). Im Stamm SZ1 befinden sich Met52Leu und Val78Ile gemeinsam in hsCYP11B1. Der Unterschied bezüglich der enzymatischen Aktivität zwischen beiden Stämmen war nicht sehr groß. Während SZ78 eine 3fach erhöhte Aktivität besaß, war es bei SZ1 eine 3,5fache. Obwohl die Mutation der Position 52 allein die Aktivität nicht signifikant erhöhte (SZ52), scheint das Vorhandensein beider Mutationen, Met52Leu und Val78Ile, einen synergistischen Effekt auf die Aktivität zu haben. Betrachtet man die Positionen 52 und 78 im Alignment, so stellt man hier Unterschiede zwischen den Sequenzen der verschiedenen Varianten fest. Von besonderem Interesse erweist sich Val78. Bei allen Enzymen der verschiedene Spezies befindet sich in dieser Position ein Ile (wie in der Kawamoto Sequenz). Darüber hinaus liegt die Position 78 im Bereich einer Substratbindungsstelle (SRS1) zwischen B- und B'-Helix, die ausgerechnet durch eine Sequenz von 8 identischen Aminosäuren gekennzeichnet ist. In enger räumlicher Nähe befindet sich auch die Position 112, die einen Einfluss auf den Substrateintrittskanal hat. Bei anderen P450 Cytochromen (P450BM-3 und CYP2C9) wurden in dieser Region Mutationen identifiziert, die einen starken Einfluss auf die Substratspezifität und den Substrateintrittskanal hatten (Sulistyaningdyah *et al.*, 2005), (Zhou *et al.*, 2006). In einer kürzlich publizierten Arbeit wurden Zellen untersucht, in die ein defektes CYP11B1 Enzym eingeführt worden war, das bei Patienten das adrenogenitale Syndrom (AGS) auslöst. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation Pro94Leu eine Veränderung der am Substrateintrittskanal beteiligten B-Helix bewirkt, was zu einem kompletten

Aktivitätsverlust des Enzyms führt (Krone *et al.*, 2006). Zusammenfassend deuten die existierenden Daten darauf hin, dass diese Region eine wichtige Bedeutung bei der Substraterkennung und -bindung hat, und die Mutation Val78Ile eine große Rolle dabei spielt. Val und Ile sind relativ ähnliche Aminosäuren, die sich durch einen stark hydrophoben Charakter auszeichnen. Der Unterschied zwischen beiden liegt in der Länge der lateralen Seitenkette (Abb. 4.3). Val besitzt hier eine Isopropylgruppe, während Ile eine lange, sich teilende Seitenkette aufweist (Isobutylgruppe). Dabei hat es den Anschein, dass diese Seitenkette wie ein Arm funktioniert, der dem Substrat beim Eintritt in den Substrateintrittskanal hilft.

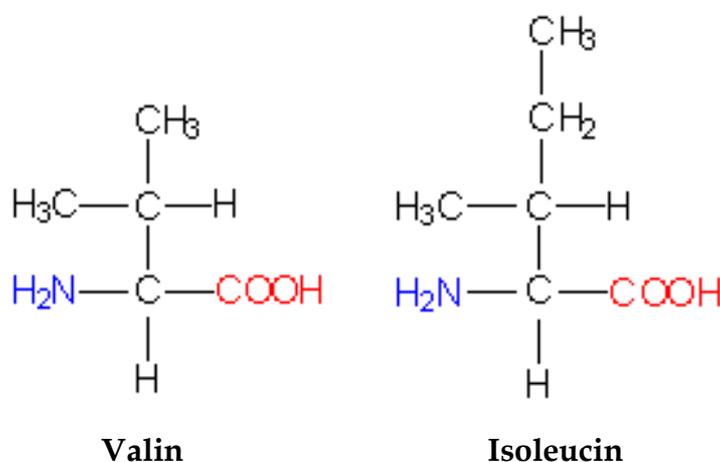


Abb. 4.3: Struktur der Aminosäuren Val und Ile mit besonderem Augenmerk auf die Seitenketten.

Man findet auch zwei Enzyme in der Gruppe der Varianten mit erhöhter Aktivität, die von Mensch und Affe stammen. Der Stamm HSB2M zeigte erhöhte Aktivität. Er exprimiert hsCYP11B2m, was dem humanen hsCYP11B2 mit den beiden Mutationen Ile112Pro und Asp147Glu entspricht. Die katalytische Aktivität betrug 249% im Vergleich zu HSB1 (Abb. 3.19). Die Mutationen Ile112Pro und Asp147Glu wurden sowohl einzeln als auch in Kombination bereits in COS1 Zellen untersucht (Hampf, 2001), (Bechtel *et al.*, 2002). Hampf und Bechtel *et al.* konnten nachweisen, dass die Substitution des Asp an Position 174 durch Glu zu einer erhöhten 11 β -Hydroxylierungsaktivität im Vergleich zum Wildtyp führt (Hampf, 2001), (Bechtel *et al.*, 2002). Die inverse Mutation in hsCYP11B1 hingegen verringerte dessen katalytische Aktivität (Hampf, 2001). Für die Position 112 wurden ähnliche Effekte gezeigt, die aber weniger ausgeprägt waren (Bechtel *et al.*, 2002). In den

Versuchen mit COS1 Zellen hatte die Einführung der doppelten Mutation eine starke Steigerung der enzymatischen Aktivität zur Folge, die auf einen additiven oder sogar potenzierenden Effekt dieser beiden Mutationen schließen lässt (Bechtel *et al.*, 2002). Während die Mutation in Position 112 einen Effekt auf den Substrateintrittskanal hat (wahrscheinlich kommt es zu einer Verbreiterung), scheint die Modifikation der Position 147 über indirekte Effekte zu fungieren, die auf strukturellen Veränderungen der Bindung des Enzyms mit dem Redoxpartner basieren. In all diesen Studien wurde die enzymatische Aktivität relativ zu hsCYP11B2 angegeben. Die Steigerung der Aktivität erreichte aber nie die Aktivität des hsCYP11B1, was dadurch gezeigt wurde, dass die absolute Cortisolproduktion in den CYP11B2 Varianten deutlich unter der von hsCYP11B1 lag. Prinzipiell stehen die in dieser Studie generierten Daten mit den Literaturergebnissen gut im Einklang. Allerdings ergaben die durchgeführten Experimente mit HSB2M in *S. pombe* eine Erhöhung der Aktivität, die sogar 2,5fach über der des Referenzstammes HSB1 lag. Wie für das Enzym hsCYP11B2 (Stamm HSB2) kann man auch hier vermuten, dass die Affinität für den Redoxpartner, in diesem Fall *etp1_{fd}*, bei einem aldosteronsynthetisierenden Enzym höher ist als die von hsCYP11B1. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass hsCYP11B2 und hsCYP11B1 eine vergleichbare Aktivität besitzen (siehe 4.2.2), aber hsCYP11B2m eine Steigerung der Aktivität gegenüber dem Wildtyp hsCYP11B2 aufweist, die sogar die Aktivität von hsCYP11B1 übersteigt.

Der Stamm PHB1 zeigte die mit Abstand ausgeprägteste Aktivitätserhöhung von 620% im Vergleich zu HSB1 (Abb. 3.19). Die Steigerung lag damit um mindestens 100% über allen anderen Stämmen. Untersuchungen mit dem Bärenpavian Enzym wurden bereits von Hampf in COS1 Zellen durchgeführt (Hampf, 2001). Die Befunde dieser Arbeit stehen mit den hier vorgestellten Daten im Einklang. In COS1 Zellen wies das Enzym sowohl für das Substrat DOC als auch für RSS eine erhöhte 11 β -Hydroxylierungsaktivität auf. Das Ausmaß der Erhöhung war allerdings deutlich geringer. Ursächlich für die Unterschiede in der Aktivitätssteigerung sind wahrscheinlich das Expressionssystem (*S. pombe* vs. COS1 Zellen) und die Redoxpartner (*etp1_{fd}* vs. Adx). Betrachtet man auch die bisher besprochenen Stämme, so muss man vermuten, dass *S. pombe* möglicherweise ein wesentlich geeigneteres System für derartige Untersuchungen ist. Außerdem kann man vermuten, dass phCYP11B1 eine stärkere Interaktion mit seinem Redoxpartner aufweist, der in diesem Fall *etp1_{fd}* und nicht Adx ist. Um diese Vermutung zu bestätigen, sind allerdings weiterführende Experimente erforderlich, die im direkten Vergleich mit einem Adx koexprimierenden Stamm durchgeführt werden müssten. Die Sequenz von phCYP11B1 weist einen hohen Grad der Homologie mit hsCYP11B1 und hsCYP11B2 auf (Tab. 3.9). Im Bereich der Aminosäuren 107-

280 befinden sich die meisten Unterschiede zwischen dem Affenzym und den beiden humanen Enzymen. Dieser Abschnitt der Primärstruktur erstreckt sich räumlich von der C- bis zu G-Helix. Von besonderem Interesse sind die Positionen 173, 182, 184, 188 und 222, weil sie sich nach dem hsCYP11B1 Modell von Belkina et al. (Belkina *et al.*, 2001) gegenüber des Substrateintrittskanals befinden. Es kann spekuliert werden, dass insbesondere die genannten Positionen für die Lage und den Winkel der Schleife zwischen den D-, E- und F-Helices wichtig sind. Die Abb. 4.4 zeigt in der hsCYP11B1 Struktur die Punkte, an denen sich die Aminosäuren befinden. Die Tab. 4.3 zeigt, an welchen dieser Positionen und wie sich das humane von Affenzym unterscheidet.

Tab. 4.3: Liste der Aminosäure in humanem und Affen Enzym an der Positionen 173, 182, 184, 188 und 222

Position	hsCYP11B1	phCYP11B1
173	Lys	Arg
182	Gly	Asp
184	Leu	Val
188	Val	Ile
222	Asn	Ser

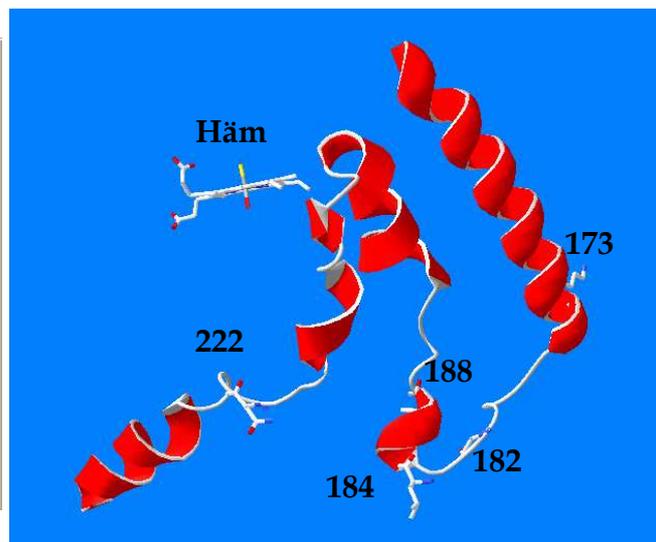


Abb. 4.4: Region des hsCYP11B1 Modells, das die Positionen 173, 182, 184, 188 und 222 und das Häm beinhaltet. Als Schleifen werden die D, E und F Helices dargestellt

In Position 182 befindet sich bei phCYP11B1 ein Asp, während bei allen anderen Organismen an dieser Position ein Gly vorhanden ist. Diese beiden Aminosäuren weisen starke Unterschiede auf. So unterscheiden sie sich beispielsweise erheblich in Größe und Ladung. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Asp182 in der Lage ist, mit Arg500 eine Salzbrücke zu bilden (Swart *et al.*, 2005), die wahrscheinlich sehr wichtig hinsichtlich Stabilität und Konformation des Enzyms ist. Die Anwesenheit eines Ile in Position 188 an Stelle von Val

scheint eine Verschiebung der I-Helix zur Folge zu haben. Aus dem zuvor Geschriebenen kann man ableiten, dass auch an der Oberfläche lokalisierte Aminosäuren trotz ihrer peripheren Lage einen Einfluss auf die Topologie der Substratbindungstasche haben können und somit in der Lage sind, Einfluss auf die Affinität und den Umsatz des Substrates zu nehmen. Wenn die hier nachgewiesene hohe Aktivität auch *in vivo* vorhanden ist, so stellt sich die Frage nach der physiologischen Bedeutung. Bisher wurden in *Papio ursinus* 3 Gene identifiziert, die für 3 Cytochrome P450 der 11B Familie kodieren (Hampf *et al.*, 1996), (Swart *et al.*, 2000), (Brown *et al.*, 2002). Jedes dieser Enzyme scheint in einem spezifischen Bereich der Nebennieren exprimiert zu werden, und verfügt über eine klar definierte katalytische Aktivität (nämlich die Synthese von Cortisol, Corticosteron und Aldosteron). Die Anwesenheit von drei Enzymen mit jeweils spezifischen Substraten und verschiedenen katalysierten Reaktionen bedingt eine größere Diversifizierung der Produktionswege und ist möglicherweise Ausdruck einer stärkeren Kontrolle der Steroidsynthese. Eventuell handelt es sich hier um eine „Verfeinerung“ des Systems.

4.3 Wissen wir jetzt mehr über CYP11B1?

Ein wichtiger Punkt für die Beantwortung dieser Frage ist die Feststellung, dass selbst ein Enzym in einem gebundenen Zustand -wie das bei der Bindung an die innere Mitochondrienmembran der Fall ist- eine enorme Bandbreite hinsichtlich seiner katalytischen Fähigkeit besitzt. Diese Feststellung wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt; innerhalb derselben Reaktion (Umsetzung von RSS zu Cortisol) bei verschiedenen Varianten werden enorme Aktivitätsunterschiede belegt. Die Variabilität reicht dabei von einem vollständigen Aktivitätsverlust bis hin zu einer Versechsfachung in Bezug auf den humanen Referenzstamm. Innerhalb der Struktur eines Enzyms können verschiedene Regionen definiert werden, denen eine besondere funktionelle Rolle bei der Realisierung des katalytischen Prozesses zukommt. Auch innerhalb des Modells von hsCYP11B1 kann eine solche Klassifizierung diverser Regionen vorgenommen werden. Seine Tertiärstruktur spiegelt die charakteristische Konformation aller Cytochrome P450 wider (Denisov *et al.*, 2005), (Li und Poulos, 2004). Das wichtigste Charakteristikum ist **das aktive Zentrum** bzw. **der Kern**. Dieser zeichnet sich durch die Anwesenheit des Häms als Kofaktor aus. Das Häm ist von einem Bündel, bestehend aus 4 Helices, der D-, E-, I- und L-Helix, umgeben. Die K-Helix und der Loop (auch als Mäander bezeichnet) gehören ebenfalls zum aktiven Zentrum. In diesem aktiven Zentrum spielt sich die Hydroxylierungsreaktion ab. Ein weiterer Bereich ist neben dem aktiven Zentrum, für die Funktionalität des Enzyms von größter Wichtigkeit: die **Region der Interaktion mit dem Redoxpartner**. Im Fall des hsCYP11B1 stammen die für die Hydroxylierung benötigten Elektronen vom Adx, welches reversibel an das Enzym gebunden wird. Zu dieser Bindungsregion gehören sowohl oberflächlich gelegene Abschnitte als auch Bereiche, die sich mehr im Inneren des Proteins befinden. Die oberflächlichen Bereiche umfassen den Abschnitt zwischen C- und E-Helix, den Abschnitt zwischen G- und H-Helix sowie das Faltblatt β 1-4. Der Mäander sowie die I- und H-Helices bilden die weiter zentral gelegenen Bereiche. Sehr wahrscheinlich sind diese Strukturen nicht an der direkten Interaktion mit dem Redoxpartner beteiligt, sondern übernehmen den Transport der Elektronen vom Redoxpartner zum aktiven Zentrum. Schließlich gibt es auch Abschnitte, die für die **Erkennung und Bindung des Substrates** zuständig sind (SRS) (Gotoh, 1992). Diese SRS zeichnen sich durch eine große Variabilität hinsichtlich der Sequenz und der Struktur aus. Sie sind meist in räumlicher Nähe zum aktiven Zentrum gelegen und bilden den so genannten Substrateintrittskanal. Bei den im Rahmen dieser Arbeit analysierten Varianten des CYP11B1 zeigte sich ein großer Einfluss dieser Bereiche auf die enzymatische Aktivität.

Beispiele hierfür sind die Schleifen Strukturen zwischen der B- und B'-Helix sowie die Schleifen zwischen D-Helix, E-Helix und F-Helix.

Die untersuchten Varianten, die eine Modifikation im **aktiven Zentrum** aufwiesen, haben in keinem einzigen Fall zu einer Aktivitätserhöhung geführt. Sowohl die Mutanten aus der gerichteten Mutagenese (Ser315Gly und Pro322Ser) als auch die natürlichen Modifikationen in rnCYP11B1 und cpCYP11B1, die alle in der I-Helix lokalisiert sind, haben die Bedeutung dieser Struktur für die katalytische Aktivität klar gezeigt. Die vorliegenden Befunde lassen darauf schließen, dass es in einem für die Funktion des Enzyms zentralen Abschnitt, wie dem katalytischen Zentrum, ausgesprochen schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, ist, durch Modifikationen aktivitätssteigernde Effekte zu erzielen. Es wurde gezeigt, dass Mutationen im aktiven Zentrum sowohl von hsCYP11B1 als auch von hsCYP11B2 einen Effekt auf die Regioselektivität dieser beiden Enzymen (Bottner *et al.*, 1996), (Bottner *et al.*, 1998) haben. Wahrscheinlich hat hier die Evolution schon maßgeblich dazu beigetragen, dem Optimum des jeweiligen Enzyms sehr nahe zu kommen. In der Tat konnte bereits gezeigt werden, dass die I-Helix nicht nur in der CYP11B Familie, sondern in allen Cytochromen P450, ein hoch konserviertes Motiv darstellt. Die Aufgabe der I-Helix besteht in der korrekten Ausrichtung des Häms, damit der Elektronentransfer und die Hydroxylierungsreaktion möglichst effizient ablaufen können. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann darüber hinaus auch noch auf eine weitere Funktion sowohl für die I-Helix als auch für andere am aktiven Zentrum beteiligte Strukturelemente, wie die K-Helix und den Mäander, geschlossen werden. Die An- und Abwesenheit von positiv geladenen Aminosäuren in diesen Strukturen (z.B. rnCYP11B1 und cpCYP11B1) lassen vermuten, dass diese Elemente neben ihrer direkten Beteiligung an der katalytischen Reaktion auch noch eine Rolle bei der Interaktion mit dem Redoxpartner spielen, in dem sie an der Regulation des Elektronentransfers beteiligt sind.

Modifikationen im Bereich der **Interaktionsstelle mit dem Redoxpartner** führten zu unterschiedlichen Effekten, allerdings nie zu einer signifikanten Erhöhung der Cortisolproduktion. Die Faktoren, die diese Interaktion zwischen Enzym und Redoxpartner regulieren, sind vielfältig (Hlavica *et al.*, 2003). Ein Faktor ist das Vorhandensein von positiv geladenen Aminosäuren, die an der durch Salzbrückenbildung gelenkten Annäherung der verschiedenen Strukturelemente beteiligt sind. Die untersuchten Varianten mit einer positiven Ladung in den besagten Bereichen (z.B. Asp430Arg, Ile431Lys und Asn152Lys) zeigten ein breites Aktivitätsspektrum, das von einem kompletten Verlust der Aktivität über eine Reduktion bis zu einer tendenziellen Erhöhung reichte. Um die gewünschten Effekte hinsichtlich der Enzymaktivität zu erzielen, ist es deshalb wichtig, an die richtigen Stellen

die richtige Aminosäure einzufügen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen aber auch die Wichtigkeit anderer Strukturelemente für die Funktion des Moleküls.

Neben den an der proximalen Oberfläche lokalisierten Strukturen, die für den Kontakt mit dem Redoxpartner zuständig sind, existieren aber auch noch andere sehr variable Strukturen an der Oberfläche, die ebenfalls am Elektronentransfer beteiligt sind. Während elektrostatische Kräfte hauptsächlich für die Ausrichtung der beiden Redoxpartner und die Bildung des ersten Vorkomplexes verantwortlich sind, begünstigen hydrophobe Kräfte den Elektronentransfer durch die Ausbildung von echten Bindungen und die Überlappung von Π -Orbitalen der beiden Reaktanten. Die untersuchten Varianten mit Modifikationen in diesen Bereichen, wie z.B. rnCYP11B1 und die Mutationen Pro135Ala sowie Phe445Trp, hatten allerdings keinen aktivitätssteigernden Effekt. Überraschenderweise zeigten einige der untersuchten Varianten eine 11β -Hydroxylierungsaktivität, die sich nicht vom entsprechenden Referenzstamm unterschied, aber höher als erwartet ausfiel. Beispiele hierfür sind hsCYP11B2 und cpCYP11B2, die sich im direkten Vergleich nicht voneinander unterschieden (Abb. 3.19). Betrachtet man aber die Relationen zwischen CYP11B1 und CYP11B2 in Zellkulturversuchen (Hampf, 2001) mit denen in der vorliegenden Studie, dann fällt auf, dass die Cortisolproduktion von CYP11B2 in den Zellkulturen deutlich niedriger ausfällt als die von CYP11B1. In *S. pombe* hingegen dreht sich dieses Verhältnis um. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die aldosteronsynthetisierenden Enzyme eine größere Flexibilität bezüglich der umgesetzten Substrate als auch bezüglich des Redoxpartners aufweisen (in dieser Studie wurde *etp1_{fd}* anstatt Adx verwendet). Die Anwesenheit des Elektronentransporters *etp1_{fd}* in *S. pombe* ermöglicht einen Einblick in die Interaktion des Cytochroms mit diesem Redoxpartnern. Wahrscheinlich würde die Anwesenheit von Adx eine größere Diversifizierung der Varianten hinsichtlich der enzymatischen Aktivität ermöglichen. Für ein möglichst korrektes Abbild der Vorgänge in einem derart komplexen System wie den Cytochromen P450 wäre es allerdings am besten, das System in seiner Gesamtheit und seinem natürlichen Ambiente zu analysieren.

Die größten Effekte hinsichtlich des Umsatzes von RSS in Cortisol wurden bei Mutationen im Bereich der **Substraterkennungs- und Substratbindungsstellen** registriert. Dabei scheinen hydrophobe Kräfte eine fundamentale Rolle zu spielen, wie z.B. im Fall der V78Ile Mutation oder der Substitution von Val durch Ile in Position 188 bei phCYB11B1. Bei phCYP11B1 kann man außerdem sehen, dass die Orientierung diverser Strukturen eine wichtige Rolle spielt.

Alle anderen untersuchten Varianten mit Modifikationen, die nicht im Bereich der Substraterkennungs- und -bindungsstellen liegen, erbrachten nicht die erhoffte Erhöhung

der enzymatischen Aktivität. Dies trifft ganz besonders für die Mutationen im Bereich der Bindungsstelle mit dem Redoxpartner zu. Sehr wahrscheinlich sind diese Bereiche rigider und in ihrer Struktur genauer definiert. Die katalytische Reaktion kann nicht ablaufen, wenn der Elektronentransfer nicht korrekt vonstatten geht. Der Zugang des Substrates zum katalytischen Zentrum und seine Bindung sind wahrscheinlich deutlich flexibler. Da ein Enzym nicht, wie durch die Röntgenstrukturanalyse suggeriert wird, starr sondern elastisch ist, versucht es sich an sein Substrat anzupassen. Diese Hypothese wird durch die Tatsache untermauert, dass Enzyme häufig die gleiche Reaktion mit verschiedenen Substraten katalysieren können (z.B.: 11 β -Hydroxylierung von RSS und DOC).

Das Ziel, die enzymatische Cortisolproduktion durch die Entwicklung einer oder mehrerer gentechnisch veränderter Varianten des CYP11B1 mit einer erhöhten enzymatischen Aktivität zu optimieren, wurde erreicht. Es wurden zwei Varianten (CYP11B1^{V78I} und hsCYP11B1^{M52LV78I}) in der gerichteten Mutagenese erzeugt, die jeweils eine 3- und 3,5fache Erhöhung der Cortisolproduktion im Vergleich zu Referenzenzym gezeigt haben. Dazu wurde eine Variante zwischen den Proteinen aus verschiedenen Organismen entdeckt, die eine 6,2fache Erhöhung erreicht hat. Es wurden *S. pombe* Stämme generiert, die Cortisol im größeren Maßstab produzieren (Dragan *et al.*, 2005) als bisher gemacht wurde (Bureik *et al.*, 2002b), (Szczebara *et al.*, 2003). Ein weiterer Vorteil dieser Stämme liegt darin, dass sie ein einfacheres Expressionssystem darstellen, weil keine Koexpression von AdR und Adx nötig ist. Außerdem haben viele der in dieser Arbeit gesammelten Informationen über CYP11B1 einen tieferen Einblick in die Beziehung zwischen Struktur und Funktion dieses Enzyms erbracht. Es ist aber auch klar, dass diese Arbeit aufgrund der Vielfalt von Aspekten und offenen Punkten keinen Anspruch auf Vollständigkeit haben kann. Sie ist viel mehr als Basis für zukünftige tiefergehende Studien zu sehen. Viele der hier vorgestellten Experimente und die daraus resultierenden Hypothesen müssen in gezielteren Versuchen und möglicherweise auch in spezifischeren Systemen überprüft werden. Für die Untersuchung des Einflusses von Mutationen auf die enzymatische Aktivität und die Stabilität des Enzyms mittels spektroskopischer Verfahren wäre ein *in vitro* System wahrscheinlich am geeignetsten. Leider ist die Realisierung eines solchen Systems schwierig, da die Isolierung und Reinigung von CYP11B1 äußerst komplex ist. Es muss deshalb eine Alternative gefunden werden, die trotz allem schlüssig und präzise ist. Mit Hilfe eines geeigneten Screening-Systems für die Erfassung der enzymatischen Aktivität und molekularbiologischen Methoden der molekularen Evolution könnte beispielsweise eine größere Vielfalt von Varianten mit einem

breiten Spektrum der enzymatischen Aktivität geschaffen werden. Techniken, wie das Shuffling zwischen Sequenzen verschiedener Organismen, die einen hohen Grad an Homologie aufweisen, oder die "Error Prone PCR" an strategisch wichtigen Punkten, eröffnen möglicherweise neue Wege für die Generierung neuer Varianten mit einer höheren Aktivität oder einem modifizierten Muster der erzeugten Produkte. Darüber hinaus könnte die Generierung von *S. pombe* Stämmen, die Adx und AdR koexprimieren, dazu beitragen, die in dieser Arbeit erstandenen Fragestellungen bzgl. *etp1_{fd}* und Adx zu beantworten.

Literaturverzeichnis

Addison T (1855). On the constitutional and local Effects of disease of the suprarenal capsules London: Samuel Highly.

Andreadis A, Hsu YP, Hermodson M, Kohlhaw G, Schimmel P (1984). Yeast LEU2. Repression of mRNA levels by leucine and primary structure of the gene product. *J Biol Chem* 259(13):8059-62.

Arai H, Escobedo JA (1996). Angiotensin II type 1 receptor signals through Raf-1 by a protein kinase C-dependent, Ras-independent mechanism. *Mol Pharmacol* 50(3):522-8.

Azeva TN, Gilep AA, Lepesheva GI, Strushkevich NV, Usanov SA (2001). Site-directed mutagenesis of cytochrome P450_{scc}. II. Effect of replacement of the Arg425 and Arg426 residues on the structural and functional properties of the cytochrome P450_{scc}. *Biochemistry (Mosc)* 66(5):564-75.

Bartolomeo E (1563). *Tabulae anatomicae clarissimi viri bartholomaei Eustachii quas.*

Basi G, Schmid E, Maundrell K (1993). TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* 123(1):131-6.

Bassett MH, Zhang Y, Clyne C, White PC, Rainey WE (2002). Differential regulation of aldosterone synthase and 11 β -hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol* 28(2):125-35.

Beato M, Truss M, Chavez S (1996). Control of transcription by steroid hormones. *Ann N Y Acad Sci* 784:93-123.

Beato M, Klug J (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6(3):225-36.

Bechtel S, Belkina N, Bernhardt R (2002). The effect of amino-acid substitutions I112P, D147E and K152N in CYP11B2 on the catalytic activities of the enzyme. *Eur J Biochem* 269(4):1118-27.

Beckert V, Bernhardt R (1997). Specific aspects of electron transfer from adrenodoxin to cytochromes p450_{scc} and p45011 β . *J Biol Chem* 272(8):4883-8.

Beilke D, Weiß R, Löhr F, Pristovsek P, Hannemann F, Bernhardt R, Rüterjans H (2002). A new electron transport mechanism in mitochondrial steroid hydroxylase systems based on structural changes upon the reduction of Adrenodoxin. *Biochemistry* 41(25):7969-7978.

Belkina NV, Lisurek M, Ivanov AS, Bernhardt R (2001). Modelling of three-dimensional structures of cytochromes P450 11B1 and 11B2. *J Inorg Biochem* 87(4):197-207.

Beratan D, Skourtis S (1998). Electron transfer mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 2(2):235-43.

Bernhardt R (1996). Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* 127:137-221.

Böhmer S, Carapito C, Wilzewski B, Leize E, Van Dorsselaer A, Bernhardt R (2006). Analysis of aldosterone-induced differential receptorindependent protein patterns using 2D-electrophoresis and mass spectrometry. *Biol. Chem.* 387:917-929.

Boon WC, Roche PJ, Hammond VE, Jeyaseelan K, Crawford RJ, Coghlan JP (1995). Cloning and expression analysis of a cytochrome P-450(11 beta) cDNA in sheep. *Biochim Biophys Acta* 1260(1):109-12.

Boon WC, Roche PJ, Butkus A, McDougall JG, Jeyaseelan K, Coghlan JP (1997). Functional and expression analysis of ovine steroid 11 beta-hydroxylase (cytochrome P450 11 beta). *Endocr Res* 23(4):325-47.

Bottner B, Schrauber H, Bernhardt R (1996). Engineering a mineralocorticoid- to a glucocorticoid-synthesizing cytochrome P450. *J Biol Chem* 271(14):8028-8033.

Bottner B, Denner K, Bernhardt R (1998). Conferring aldosterone synthesis to human CYP11B1 by replacing key amino acid residues with CYP11B2-specific ones. *Eur J Biochem* 252(3):458-66.

Brown N, Swart P, Fenhalls G, Stevens L, Kolar NW, Swart AC (2002). Baboon CYP11B1: the localization and catalytic activity in baboon adrenal tissue. *Endocr Res* 28(4):477-84.

Bulow HE, Mobius K, Bahr V, Bernhardt R (1996). Molecular cloning and functional expression of the cytochrome P450 11B-hydroxylase of the guinea pig. *Biochem Biophys Res Commun* 221(2):304-12.

Bulow HE, Bernhardt R (2002). Analyses of the CYP11B gene family in the guinea pig suggest the existence of a primordial CYP11B gene with aldosterone synthase activity. *Eur J Biochem* 269(15):3838-46.

Bureik M, Lisurek M, Bernhardt R (2002a). The human steroid hydroxylases CYP1B1 and CYP11B2. *Biol Chem* 383(10):1537-51.

Bureik M, Schiffler B, Hiraoka Y, Vogel F, Bernhardt R (2002b). Functional expression of human mitochondrial CYP11B2 in fission yeast and identification of a new internal electron transfer protein, etp1. *Biochemistry* 41(7):2311-21.

Bureik M, Hubel K, Dragan CA, Scher J, Becker H, Lenz N, Bernhardt R (2004). Development of test systems for the discovery of selective human aldosterone synthase (CYP11B2) and 11beta-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.

Chua SC, Szabo P, Vitek A, Grzeschik KH, John M, White PC (1987). Cloning of cDNA encoding steroid 11 beta-hydroxylase (P450c11). *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(20):7193-7197.

Clyne CD, Zhang Y, Slutsker L, Mathis JM, White PC, Rainey WE (1997). Angiotensin II and potassium regulate human CYP11B2 transcription through common cis-elements. *Mol Endocrinol* 11(5):638-49.

Coghlan VM, Vickery LE (1991). Site-specific mutations in human ferredoxin that affect binding to ferredoxin reductase and cytochrome P450_{sc}. *J.Biol.Chem.* 266:18606-18612.

Coghlan VM, Vickery LE (1992). Electrostatic interactions stabilizing ferredoxin electron transfer complexes. Disruption by "conservative" mutations. *J Biol Chem* 267(13):8932-8935.

Craven RA, Griffiths DJ, Sheldrick KS, Randall RE, Hagan IM, Carr AM (1998). Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 221(1):59-68.

Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, Natarajan R, Gu JL, Nadler JL, White PC (1991). The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol* 5(10):1513-22.

Curnow KM, Mulatero P, Emeric-Blanchouin N, Aupetit-Faisant B, Corvol P, Pascoe L (1997). The amino acid substitutions Ser288Gly and Val320Ala convert the cortisol producing enzyme, CYP11B1, into an aldosterone producing enzyme. *Nat Struct Biol* 4(1):32-35.

Daiber A, Shoun H, Ullrich V (2005). Nitric oxide reductase (P450_{nor}) from *Fusarium oxysporum*. *J Inorg Biochem* 99(1):185-93.

de Boland AR, Norman AW (1990). Influx of extracellular calcium mediates 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent transcaltachia (the rapid stimulation of duodenal Ca²⁺ transport). *Endocrinology* 127(5):2475-80.

Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I (2005). Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev* 105(6):2253-2277.

Denner K, Doehmer J, Bernhardt R (1995a). 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):443-8.

Denner K, Vogel R, Schmalix W, Doehmer J, Bernhardt R (1995b). Cloning and stable expression of the human mitochondrial cytochrome P450_{11B1} cDNA in V79 Chinese hamster cells and their application for testing of potential inhibitors. *Pharmacogenetics* 5(2):89-96.

Domalik LJ, Chaplin DD, Kirkman MS, Wu RC, Liu WW, Howard TA, Seldin MF, Parker KL (1991). Different isozymes of mouse 11 beta-hydroxylase produce mineralocorticoids and glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 5(12):1853-61.

Dragan CA, 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.

Dumas B, Cauet G, Lacour T, Degryse E, Laruelle L, Ledoux C, Spagnoli R, Achstetter T (1996). 11 beta-hydroxylase activity in recombinant yeast mitochondria. In vivo conversion of 11-deoxycortisol to hydrocortisone. *Eur J Biochem* 238(2):495-504.

Ehmer PB, Bureik M, Bernhardt R, Müller U, Hartmann RW (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 Mol Biol* 81(2):173-179.

Erdmann B, Gerst H, Lippoldt A, Bulow H, Ganten D, Fuxe K, Bernhardt R (1996). Expression of cytochrome P45011B1 mRNA in the brain of normal and hypertensive transgenic rats. *Brain Res* 733(1):73-82.

Forsburg SL (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res* 21(12):2955-6.

Funder JW (2005). Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. *Heart Fail Rev* 10(1):15-22.

Gakh O, Cavadini P, Isaya G (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* 1592(1):63-77.

Gamielien K, Maritz GS (2004). Postnatal expression of cytochrome P450 1A1, 2A3, and 2B1 mRNA in neonatal rat lung: influence of maternal nicotine exposure. *Exp Lung Res* 30(2):121-33.

Garfinkel D (1958). Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* 77:493.

Gotoh O (1992). Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* 267(1):83-90.

Graham SE, Peterson JA (1999). How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch Biochem Biophys* 369(1):24-9.

Grinberg AV, Hannemann F, Schiffler B, Muller J, Heinemann U, Bernhardt R (2000). Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins* 40(4):590-612.

Guex N, Peitsch MC (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18(15):2714-23.

Hampf M, Swart AC, Swart P (1996). Sequence of the 11 beta-hydroxylase gene from the Cape baboon (*Papio ursinus*). *Endocr Res* 22(4):495-9.

Hampf M (2001). Untersuchung von künstlichen und natürlichen Mutationen in den Genen der humanen 11-Hydroxylase und Aldosteronsynthese. Berlin, Humboldt-Universität.

Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, Bernhardt R (2006). Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *BBA* (in press).

Hartl FU, Schmidt B, Wachter E, Weiss H, Neupert W (1986). Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase. *Cell* 47(6):939-51.

Hawkes DB, Adams GW, Burlingame AL, Ortiz de Montellano PR, De Voss JJ (2002). Cytochrome P450(cin) (CYP176A), isolation, expression, and characterization. *J Biol Chem* 277(31):27725-32.

Hayaishi O, Nozaki M (1969). Nature and mechanisms of oxygenases. *Science* 164(878):389-96.

Heckman DS, Geiser DM, Eidell BR, Stauffer RL, Kardos NL, Hedges SB (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293(5532):1129-33.

Hench PS (1950). The reversibility of certain rheumatic and nonrheumatic conditions by the use of cortisone or of the pituitary adrenocorticotrophic hormone. *Nobel Lectures, Physiology or Medicine*.

Herold G (2002). Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). In: *Innere Medizin*. k Verlag editor, pp. 637-646.

Herrmann JM, Neupert W (2000). Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol* 3(2):210-214.

Hlavica P, Schulze J, Lewis DF (2003). Functional interaction of cytochrome P450 with its redox partners: a critical assessment and update of the topology of predicted contact regions. *J Inorg Biochem* 96(2-3):279-97.

Humphrey T, Pearce A (2005). Cell cycle molecules and mechanisms of the budding and fission yeasts. *Methods Mol Biol* 296:3-29.

Imai M, Shimada H, Watanabe Y, Matsushima Hibiya Y, Makino R, Koga H, Horiuchi T, Ishimura Y (1989). Uncoupling of the cytochrome P-450cam monooxygenase reaction by a single mutation, threonine-252 to alanine or valine: possible role of the hydroxy amino acid in oxygen activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86(20):7823-7827.

Jackson CJ, Lamb DC, Marczylo TH, Warrilow AG, Manning NJ, Lowe DJ, Kelly DE, Kelly SL (2002). A novel sterol 14alpha-demethylase/ferredoxin fusion protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* represents a new class of the cytochrome P450 superfamily. *J Biol Chem* 277(49):46959-65.

Jugert FK, Agarwal R, Kuhn A, Bickers DR, Merk HF, Mukhtar H (1994). Multiple cytochrome P450 isozymes in murine skin: induction of P450 1A, 2B, 2E, and 3A by dexamethasone. *J Invest Dermatol* 102(6):970-5.

Kaiser H, Kley, H.K. (2002). *Cortisontherapie* Stuttgart.

Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Ohnishi T, Ichikawa Y, Yokoyama Y, Sumimoto H, Toda K, Miyahara K, Kuribayashi I, Nakao K, et al. (1990a). Cloning and expression of a cDNA for human cytochrome P-450aldo as related to primary aldosteronism. *Biochem Biophys Res Commun* 173(1):309-16.

Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Toda K, Miyahara K, Yokoyama Y, Nakao K, Hosoda K, Yamamoto Y, Imura H, Shizuta Y (1990b). Cloning of cDNA and genomic DNA for human cytochrome P-45011 beta. *FEBS Lett* 269(2):345-9.

Kendall EC (1950). The development of cortisone as a therapeutic agent. *Nobel Lecture, Physiology or Medicine*.

Kimata Y, Shimada H, Hirose T, Ishimura Y (1995). Role of Thr-252 in cytochrome P450cam: a study with unnatural amino acid mutagenesis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 208(1):96-102.

Kimura T (1968). Biochemical Aspects of Iron-Sulfur Linkage in Non-Heme Iron Protein, with Special Reference to Adrenodoxin. In: Structure and Bonding. CK Jorgensen, JB Neilands, RS Nyholm, D Reinen and RJP Williams editors. Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-40.

Kirita S, Morohashi K, Hashimoto T, Yoshioka H, Fujii-Kuriyama Y, Omura T (1988). Expression of two kinds of cytochrome P-450(11 beta) mRNA in bovine adrenal cortex. *J Biochem (Tokyo)* 104(5):683-6.

Klingenberg M (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75:376-86.

Kojima K, Yamasaki E, Kitada S, Ogishima T, Ito A (2001). Recognition of mitochondrial protein precursor lacking arginine at position -2 by mitochondrial processing peptidase: processing of bovine cytochrome P450(SCC) precursor. *J Biochem (Tokyo)* 130(4):497-502.

Kölliker A (1852). Handbuch der Gewebelehre des Menschen Leipzig: W Engelmann.

Krone N, Grischuk Y, Muller M, Volk RE, Grotzinger J, Holterhus PM, Sippell WG, Riepe FG (2006). Analyzing the functional and structural consequences of two point mutations (P94L, A368D) in the CYP11B1 gene causing congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 11-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2:2.

Kumamoto T, Ito A, Omura T (1989). Critical region in the extension peptide for the import of cytochrome P- 450(SCC) precursor into mitochondria. *J Biochem (Tokyo)* 105(1):72-8.

Kuribayashi I, Nomoto S, Massa G, Oostdijk W, Wit JM, Wolffenbuttel BH, Shizuta Y, Honke K (2005). Steroid 11-beta-hydroxylase deficiency caused by compound heterozygosity for a novel mutation, p.G314R, in one CYP11B1 allele, and a chimeric CYP11B2/CYP11B1 in the other allele. *Horm Res* 63(6):284-293.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259):680-5.

Lambeth JD, McCaslin DR, Kamin H (1976). Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex. *J Biol Chem* 251(23):7545-50.

Lambeth JD, Seybert DW, Kamin H (1979). Ionic effects on adrenal steroidogenic electron transport. The role of adrenodoxin as an electron shuttle. *J Biol Chem* 254(15):7255-7264.

Lambeth JD, Seybert DW, Kamin H (1980). Adrenodoxin reductase . adrenodoxin complex. Rapid formation and breakdown of the complex and a slow conformational change in the flavoprotein. *J Biol Chem* 255(10):4667-72.

Lepesheva GI, Azeva TN, Strushkevich NV, Gilep AA, Usanov SA (2000). Site-directed mutagenesis of cytochrome P450scc (CYP11A1). Effect of lysine residue substitution on its structural and functional properties. *Biochemistry (Mosc)* 65(12):1409-1418.

Leys D, Mowat CG, McLean KJ, Richmond A, Chapman SK, Walkinshaw MD, Munro AW (2003). Atomic structure of Mycobacterium tuberculosis CYP121 to 1.06 Å reveals novel features of cytochrome P450. *J Biol Chem* 278(7):5141-7.

Li H, Poulos TL (2004). Crystallization of cytochromes P450 and substrate-enzyme interactions. *Curr Top Med Chem* 4(16):1789-802.

Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, Lalouel JM (1992). A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 355(6357):262-5.

Lindner P (1893). *Schizosaccharomyces pombe* n. sp., ein neuer Gahrungserreger. *Wochenschrift für Brauerei* pp. 1298-1300.

Lisurek M, Bernhardt R (2004). Modulation of aldosterone and cortisol synthesis on the molecular level. *Mol Cell Endocrinol* 215(1-2):149-159.

Lisurek M (2005). Homologie-Modellierung und Protein-Engineering der Steroid-15 β -Hdroxylase (CYP106A2) aus *Bacillus megaterium* ATCC13368. Saarbrücken, Universität des Saarlandes.

Losel R, Schultz A, Wehling M (2004). A quick glance at rapid aldosterone action. *Mol Cell Endocrinol* 217(1-2):137-141.

MacKenzie SM, Clark CJ, Fraser R, Gomez-Sanchez CE, Connell JM, Davies E (2000). Expression of 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase genes in the rat brain. *J Mol Endocrinol* 24(3):321-8.

Matsukawa N, Nonaka Y, Ying Z, Higaki J, Ogihara T, Okamoto M (1990). Molecular cloning and expression of cDNAs encoding rat aldosterone synthase: variants of cytochrome P-450(11 beta). *Biochem Biophys Res Commun* 169(1):245-52.

Matsukawa N, Nonaka Y, Higaki J, Nagano M, Mikami H, Ogihara T, Okamoto M (1993). Dahl's salt-resistant normotensive rat has mutations in cytochrome P450(11 beta), but the salt-sensitive hypertensive rat does not. *J Biol Chem* 268(12):9117-21.

Maundrell K (1990). nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* 265(19):10857-64.

Maundrell K (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* 123(1):127-30.

McLean KJ, Sabri M, Marshall KR, Lawson RJ, Lewis DG, Clift D, Balding PR, Dunford AJ, Warman AJ, McVey JP, Quinn AM, Sutcliffe MJ, Scrutton NS, Munro AW (2005). Biodiversity of cytochrome P450 redox systems. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 4):796-801.

Meharena YT, Li H, Hawkes DB, Pearson AG, De Voss J, Poulos TL (2004). Crystal structure of P450cin in a complex with its substrate, 1,8-cineole, a close structural homologue to D-camphor, the substrate for P450cam. *Biochemistry* 43(29):9487-94.

Miller WL, Tyrell JB (1995). The adrenal cortex. In: *Endocrinology and Metabolism*. P Felig, J Baxter and L Frohman editors. New York, USA: McGraw-Hill Press, pp. 555-711.

Mornet E, Dupont J, Vitek A, White PC (1989). Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta- hydroxylase (P-450(11) beta). *J Biol Chem* 264(35):20961-7.

Morohashi K, Yoshioka H, Gotoh O, Okada Y, Yamamoto K, Miyata T, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y, Omura T (1987). Molecular cloning and nucleotide sequence of DNA of mitochondrial cytochrome P-450(11 beta) of bovine adrenal cortex. *J Biochem (Tokyo)* 102(3):559-68.

Mühl H, Pfeilschifter J (2003). Geschichte der Glucocorticoide: Ein kurzer Abriss. Pharmazie in unserer Zeit, pp. 284 - 287.

Muller JJ, Muller A, Rottmann M, Bernhardt R, Heinemann U (1999). Vertebrate-type and plant-type ferredoxins: crystal structure comparison and electron transfer pathway modelling. *J Mol Biol* 294(2):501-513.

Muller JJ, Lapko A, Bourenkov G, Ruckpaul K, Heinemann U (2001). Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis. *J Biol Chem* 276(4):2786-2789.

Nakahara K, Tanimoto T, Hatano K, Usuda K, Shoun H (1993). Cytochrome P-450 55A1 (P-450dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor. *J Biol Chem* 268(11):8350-5.

Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, et al. (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 6:1-11.

Nebert DW, Nelson DR, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, et al. (1989). The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA* 8(1):1-13.

Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, et al. (1991). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* 10(1):1-14.

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, et al. (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12(1):1-51.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6(1):1-42.

Nelson DR (2006). Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods Mol Biol* 320:1-10.

Nett JH, Schagger H, Trumpower BL (1998). Processing of the presequence of the Schizosaccharomyces pombe Rieske iron-sulfur protein occurs in a single step and can be converted to two-step processing by mutation of a single proline to serine in the presequence. *J Biol Chem* 273(15):8652-8658.

Neumann F, Schenck B (1990). Endokrinopathologie - Pharmakotherapie mit Hormonen. In: Pharmakologie und Toxikologie. BI-Wissenschaftsverlag editor. Mannheim, Wien, Zürich: Hrsg. Forth W, Henschler D, Rummel W, pp. 396-447.

Nishida H, Sugiyama J (1993). Phylogenetic relationships among Taphrina, Saitoella, and other higher fungi. *Mol Biol Evol* 10(2):431-6.

Nonaka Y, Takemori H, Halder SK, Sun T, Ohta M, Hatano O, Takakusu A, Okamoto M (1995). Frog cytochrome P-450 (11 beta,aldo), a single enzyme involved in the final steps of glucocorticoid and mineralocorticoid biosynthesis. *Eur J Biochem* 229(1):249-56.

Nonaka Y, Fujii T, Kagawa N, Waterman MR, 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):869-78.

Okamoto M, Nonaka Y, Ohta M, Takemori H, Halder SK, Wang ZN, Sun T, Hatano O, Takakusu A, Murakami T (1995). Cytochrome P450(11 beta): structure-function relationship of the enzyme and its involvement in blood pressure regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53(1-6):89-94.

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):6485-9.

Omura T, Sato R (1964). The carbon monoxid-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239:2370-2378.

Omura T (1966). Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphospho pyridine nucleotid-cytochrom P450 reductase. *Arch Biochem Biophys* 117.

Omura T (1998). Mitochondria-targeting sequence, a multi-role sorting sequence recognized at all steps of protein import into mitochondria. *J Biochem (Tokyo)* 123(6):1010-1016.

Omura T (1999). Forty years of cytochrome P450.

Ozaki HS, Iwahashi K, Tsubaki M, Fukui Y, Ichikawa Y, Takeuchi Y (1991). Cytochrome P-45011 beta in rat brain. *J Neurosci Res* 28(4):518-24.

Park SY, Shimizu H, Adachi S, Shiro Y, Iizuka T, Nakagawa A, Tanaka I, Shoun H, Hori H (1997). Crystallization, preliminary diffraction and electron paramagnetic resonance studies of a single crystal of cytochrome P450nor. *FEBS Lett* 412(2):346-50.

Peter M, Bunger K, Solyom J, Sippell WG (1998). Mutation THR-185 ILE is associated with corticosterone methyl oxidase deficiency type II. *Eur J Pediatr* 157(5):378-81.

Petrides P (1990). Hypothalamus-HypophysenNebennierenrinden-(Zona fasciculata)-Achse. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. S Verlag editor. Berlin, Heidelberg, New York: Hrsg. Löffler G, Petrides PE, pp. 827-35.

Pikuleva IA, Cao C, Waterman MR (1999). An additional electrostatic interaction between adrenodoxin and P450c27 (CYP27A1) results in tighter binding than between adrenodoxin and p450scc (CYP11A1). *J Biol Chem* 274(4):2045-52.

Podust LM, Poulos TL, Waterman MR (2001). Crystal structure of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6):3068-73.

Poulos TL, Finzel BC, Gunsalus IC, Wagner GC, Kraut J (1985). The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J Biol Chem* 260(30):16122-30.

Presnell SR, Cohen FE (1989). Topological distribution of four- α -helix bundles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(17):6592-6.

Pylypenko O, Schlichting I (2004). Structural aspects of ligand binding to and electron transfer in bacterial and fungal P450s. *Annu Rev Biochem* 73:991-1018.

Quinn SJ, Williams GH (1988). Regulation of aldosterone secretion. *Annu Rev Physiol* 50:409-26.

Reichstein T (1950). Chemistry of the adrenal cortex hormones. *Nobel Lectures, Physiology or Medicine*.

Ruckpaul K (1993). [Cytochrome p-450 dependent enzymes--target enzymes for drug action? (published erratum appears in *Pharm Unserer Zeit* 1994 Feb; 23(1):following table of contents)] Cytochrom P450 abhängige Enzyme--Targetenzyme für die Arzneistoffentwicklung? *Pharm.Unserer.Zeit.* 22(5-6):296-304.

Russell P, Nurse P (1986). *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*: a look at yeasts divided. *Cell* 45(6):781-2.

Russell PR (1983). Evolutionary divergence of the mRNA transcription initiation mechanism in yeast. *Nature* 301(5896):167-9.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edn. ed.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12):5463-7.

Schiffler B, Bureik M, Reinle W, Müller EC, Hannemann F, Bernhardt R (2004). The adrenodoxin-like ferredoxin of *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria. *J Inorg Biochem* 98(7):1229-1237.

Schleiff E (2000). Signals and receptors--the translocation machinery on the mitochondrial surface. *J Bioenerg Biomembr* 32(1):55-66.

Seth-Smith HM, Rosser SJ, Basran A, Travis ER, Dabbs ER, Nicklin S, Bruce NC (2002). Cloning, sequencing, and characterization of the hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-triazine degradation gene cluster from *Rhodococcus rhodochrous*. *Appl Environ Microbiol* 68(10):4764-71.

Shuman S (1991). Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(22):10104-8.

Shuman S (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269(51):32678-84.

Siegenthaler W, Werning C, Vetter W (2006). Nebennierenrinde. In: *Klinische Pathophysiologie*. TV Stuttgart editor. New York Hrsg. Siegenthaler W., pp. 344-9; 637-649.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1):76-85.

Stojanovski D, Johnston AJ, Streimann I, Hoogenraad NJ, Ryan MT (2003). Import of nuclear-encoded proteins into mitochondria. *Exp Physiol* 88(1):57-64.

Sugano S, Miura R, Morishima N (1996). Identification of intermediates in the conversion of cholesterol to pregnenolone with a reconstituted cytochrome p-450_{scc} system: accumulation of the intermediate modulated by the adrenodoxin level. *J.Biochem.(Tokyo)* 120:780-787.

Sulistyaningdyah WT, Ogawa J, Li QS, Maeda C, Yano Y, Schmid RD, Shimizu S (2005). Hydroxylation activity of P450 BM-3 mutant F87V towards aromatic compounds and its application to the synthesis of hydroquinone derivatives from phenolic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 67(4):556-562.

Swart AC, Brown N, Kolar N, Swart P (2000). Baboon cytochrome P450c11 is encoded by more than one gene. *Endocr Res* 26(4):1011-8.

Swart AC, Storbeck KH, Brown N, Graham SE, Swart P (2005). Modeling Cytochrome P45011A1 and 11B1: Applying Theory to Reality. 14th International Conference on Cytochromes P450: Biochemistry, Biophysics and Bioinformatics. Hyatt Regency Hotel, Dallas, Texas, USA.

Sylvia VL, Schwartz Z, Schuman L, Morgan RT, Mackey S, Gomez R, Boyan BD (1993). Maturation-dependent regulation of protein kinase C activity by vitamin D3 metabolites in chondrocyte cultures. *J Cell Physiol* 157(2):271-8.

Szczebara FM, Chandelier C, Villeret C, Masurel A, Bourot S, Duport C, Blanchard S, Groisillier A, Testet E, Costaglioli P, Cauet G, Degryse E, Balbuena D, Winter J, Achstetter T, Spagnoli R, Pompon D, Dumas B (2003). Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat Biotechnol* 21(2):143-9.

Tatusova TA, Madden TL (1999). BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* 174(2):247-50.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22):4673-80.

Uhlmann H, Bernhardt R (1995). Structure-function studies on mutants of adrenal ferredoxin. *Endocr Res* 21(1-2):307-12.

Ulmschneider S, Muller-Vieira U, Mitrenga M, Hartmann RW, Oberwinkler-Marchais S, Klein CD, Bureik M, Bernhardt R, Antes I, Lengauer T (2005). Synthesis and evaluation of imidazolylmethylenetetrahydronaphthalenes and imidazolylmethyleneindanes: potent inhibitors of aldosterone synthase. *J Med Chem* 48(6):1796-1805.

Wackett LP (1994). Dehalogenation in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 5(3):260-5.

Wang LH, Kulmacz RJ (2002). Thromboxane synthase: structure and function of protein and gene. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:409-22.

Watanuki M, Tilley BE, Hall PF (1978). Cytochrome P-450 for 11beta- and 18-hydroxylase activities of bovine adrenocortical mitochondria: one enzyme or two? *Biochemistry* 17(1):127-30.

Waterman MR, Mason JI, Zuber MX, John ME, Rodgers RJ, Simpson ER (1986). Control of gene expression of adrenal steroid hydroxylases and related enzymes. *Endocr Res* 12(4):393-408.

Waterman MR, Simpson ER (1989). Regulation of steroid hydroxylase gene expression is multifactorial in nature. *Recent Prog Horm Res* 45:533-63; discussion 563-6.

Wehling M, Kasmayr J, Theisen K (1990). Aldosterone influences free intracellular calcium in human mononuclear leukocytes in vitro. *Cell Calcium* 11(9):565-71.

Werck-Reichhart D, Feyereisen R (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 1(6).

White PC (2001). Steroid 11 beta-hydroxylase deficiency and related disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30(1):61-79, vi.

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(12):4576-9.

Wolfe KH, Shields DC (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387(6634):708-13.

Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, 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 EJ, 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 MA, 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 RG, Tivey A, Walsh S, Warren T, Whitehead S, Woodward J, Volckaert G, Aert R, Robben J, Grymonprez B, Weltjens I, Vanstreels E, Rieger M, Schafer M, Muller-Auer S, Gabel C, Fuchs M, Dusterhoft A, Fritzc C, Holzer E, Moestl D, Hilbert H, Borzym K, Langer I, Beck A, Lehrach H, Reinhardt R, Pohl TM, Eger P, Zimmermann W, Wedler H, Wambutt R, Purnelle B, Goffeau A, Cadieu E, Dreano S, Gloux S, Lelaure V, Mottier S, Galibert F, Aves SJ, Xiang Z, Hunt C, Moore K, Hurst SM, Lucas M, Rochet M, Gaillardin C, Tallada VA, Garzon A, Thode G, Daga RR, Cruzado L, Jimenez J, Sanchez M, del Rey F, Benito J, Dominguez A, Revuelta JL, Moreno S, Armstrong J, Forsburg SL, Cerutti L, Lowe T, McCombie WR, Paulsen I, Potashkin J, Shpakovski GV, Ussery D, Barrell BG, Nurse P (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415(6874):871-80.

Yabusaki Y (1995). Artificial P450/reductase fusion enzymes: what can we learn from their structures?. *Biochimie* 77(7-8): 594-603.

Yanagibashi K, Haniu M, Shively JE, Shen WH, Hall P (1986). The synthesis of aldosterone by the adrenal cortex. Two zones (fasciculata and glomerulosa) possess one enzyme for 11 beta-, 18- hydroxylation, and aldehyde synthesis. *J Biol Chem* 261(8):3556-62.

Yokoyama C, Miyata A, Ihara H, Ullrich V, Tanabe T (1991). Molecular cloning of human platelet thromboxane A synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 178(3):1479-84.

Zhou YH, Zheng QC, Li ZS, Zhang Y, Sun M, Sun CC, Si D, Cai L, Guo Y, Zhou H (2006). On the human CYP2C9*13 variant activity reduction: a molecular dynamics simulation and docking study. *Biochimie* 26:26.

Ziegler GA, Vorrhein C, Hanukoglu I, Schulz GE (1999). The structure of adrenodoxin reductase of mitochondrial P450 systems: electron transfer for steroid biosynthesis. *J Mol Biol* 289(4):981-90.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Darstellung der Steroidhormonsynthese inklusive der Verteilung der einzelnen Schritte auf die diversen steroidogenen Zellkompartimente	- 10 -
Abb. 1.2: Darstellung der zwei Hauptklassen der Cytochrom P450 Systeme.....	- 15 -
Abb. 1.3: Übersicht der Reaktionen, die von humanen CYP11B1 und CYP11B2 katalysiert werden.	- 17 -
Abb.1.4: Phylogenetik der wichtigsten Hefespezies	- 24 -
Abb. 2.1: Karte des Plasmides pNMT1-TOPO mit den verschiedenen Eigenschaften	- 30 -
Abb. 2.2: Karte des Plasmides pCAD1.....	- 31 -
Abb. 2.3: Schema der Vorwärts- und Rückwärtsprimer, die für die Klonierung in pNMT1-TOPO Vektor benutzt worden sind.....	- 32 -
Abb. 2.4: Die Reaktion der Topoisomerase in der TOPO Klonierung.....	- 36 -
Abb. 2.5: Schematische Darstellung der BCA Reaktion	- 41 -
Abb. 2.6: Chromatogramme von Cortisol RSS und DOC mit ihren Retentionszeiten.....	- 46 -
Abb. 2.7: Ausschnitt einer Autoradiographie	- 49 -
Abb. 3.1: Schematische Darstellung der I-Helix, des Häms und des Hämbinding Loop mit den potentiellen Positionen für Mutationen	- 52 -
Abb. 3.2: Schematische Darstellung des hsCYP11B1 Modells von Belkina et al. mit einigen potentiell interessanten Positionen im Bereich der „Bindungsdomäne“ Gruppe	- 53 -

- Abb. 3.3:** Schematische Darstellung des hsCYP11B1 Modells von Belkina et al. mit einigen potentiell interessanten Positionen aus der „Bindungsdomäne“ Gruppe.....- 54 -
- Abb. 3.4:** Schematische Darstellung des hsCYP11B1 Modells von Belkina et al. mit den entsprechenden Mutationen aus der Gruppe der „genetische Varianten“- 55 -
- Abb. 3.5:** Beispiel eines Verdau direkt im Anschluss an die gerichtete Mutagenese (T185I) ...- 55 -
- Abb. 3.6:** Schema der amplifizierten CYP11B Sequenzen aus verschiedenen Organismen- 57 -
- Abb. 3.7:** Beispiel einer Amplifikation von cDNA aus Affe, Mensch und Meerschweinchen.- 58 -
- Abb. 3.8:** Beispiel eines HPLC Chromatogramms (A) und eines Autoradiogrammes (B) aus verschiedenen Stämmen- 65 -
- Abb. 3.9:** Mittelwerte der verschiedenen Cortisolmengen in der Standardgerade und ihre Standardabweichungen.....- 67 -
- Abb. 3.10:** Cortisol Produktion des CAD1 Stammes in verschiedenen Aktivitätstests unter Standard Bedingungen.....- 68 -
- Abb. 3.11:** Überlagerung zweier Chromatogramme in denen jeweils ein Mix aus F, RSS und DOC mit verschiedenen Fließmitteln aufgetrennt wurde.....- 69 -
- Abb. 3.12:** Chromatogramme von drei Proben (Stamm PHB1, Stamm HSB1 und Stamm MB175) aus einem Aktivitätstest. A) Fließmittel; ACN:H₂O=40:60, B) Fließmittel; MetOH:H₂O=60:40- 70 -
- Abb. 3.13:** A) Überlagerte Chromatogramme von reinem F bei 45°C und 25°C. B) Gegenüberstellung zweier Chromatogramme, die aus der gleichen Probe (PHB1) bei unterschiedlichen Temperaturen (45°C und 25°C) erzeugt wurden.....- 77 -

- Abb. 3.14:** Beispiel von einer Membran nach der Detektion über den Pk-Tag und Chlornaphtol Färbung. Hefeextrakte aus einigen pCAD1 transformierten Stämmen (SZ185, SZ315, SZ322, CAD1 und MB163)- 72 -
- Abb. 3.15:** Darstellung der Abhängigkeit der CYP11B1 Expression vom *nmt1* Promotor in einer Western Blot Analyse (10%iges SDS Gel) aus Extrakten verschiedener CYP11B1 exprimierender Hefen (pCAD1 Stämme).....- 73 -
- Abb. 3.16:** Nachweis der verschiedenen pCAD1 Mutanten im Western Blot und Chlornaphtol Färbung.....- 74 -
- Abb. 3.17:** Darstellung der Abhängigkeit der CYP11B Proteinexpression (pNMT1-TOPO Stämme) vom *nmt1* Promotor in einer Western Blot Analyse (10%ige SDS Gele)- 76 -
- Abb. 3.18:** Nachweis der verschiedenen CYP11B Proteine in Zelllysaten von transformierten MB175 Hefezellen mittels Western Blot und Chlornaphtol Färbung (in 15%igen SDS Gelen- 77 -
- Abb. 3.19:** Aktivitätstest der Mutanten der „I-Helix“ (S315G, P322S) und „Substrateintrittskanal“ (S112P) Gruppen.- 80 -
- Abb. 3.20:** Aktivitätstest der Mutanten aus der „Bindungsdomäne“ (P135A, L144K, N152K, A279K, A386F, D430R, I431K, F445W) Gruppe- 81 -
- Abb. 3.21:** Aktivitätstest der Mutanten der „Genetische Varianten“ (M52L, V78I, M52LV78I, T185I) Gruppe.....- 83 -
- Abb. 3.22:** Darstellung der enzymatischen Aktivität von *S. pombe* Stämmen, die die CYP11B Proteine aus verschiedenen Organismen (Mensch, Affe, Ratte und Meerschweinchen) exprimieren.....- 86 -
- Abb. 3.23:** Aktivitäten der Stämme SZ1A und SZ1B.....- 87 -
- Abb. 3.24:** Alignment der Aminosäuresequenzen aus verschiedenen Organismen- 90 -

- Abb. 4.1:** Modell von humanem CYP11B1- 103 -
- Abb. 4.2:** Ausschnitte des Sequenzvergleichs verschiedener CYP11B Enzyme aus verschiedenen Spezies- 108 -
- Abb. 4.3:** Struktur der Aminosäuren Val und Ile mit besonderem Augenmerk auf die Seitenketten.....- 112 -
- Abb. 4.4:** Region des hsCYP11B1 Modells, das die Positionen 173, 182, 184, 188 und 222 und das Häm beinhaltet.....- 114-

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Spezielle Zusätze zum Medium für die verschiedenen verwendeten Stämme	- 29 -
Tab. 2.2: Liste und Eigenschaften der Primer für die ortsgerichtete Mutagenese	- 32 -
Tab. 2.3: Die Zusammensetzung des PCR Ansatzes für die gerichtete Mutagenese	- 37 -
Tab. 2.4: Das PCR Programm für die gerichtete Mutagenese.....	- 37 -
Tab. 3.1: Liste der Mutanten mit den jeweiligen Restriktionsenzymen	- 56 -
Tab. 3.2: Liste der verwendeten cDNAs und ihren Ursprungsplasmide.....	- 58 -
Tab. 3.3: Vergleich der verschiedenen CYP11B1 DNA-Sequenzen, die in den pNMT1-TOPO Vektor kloniert wurden, mit den entsprechenden Referenzsequenzen (CDS) aus der Literatur	- 59 -
Tab. 3.4: Liste der in pCAD1 Vektor erzeugten Mutationen und der dazugehörigen MB163 Stämme	- 62 -
Tab. 3.5: Liste der durch Transformation des Hefestammes MB175 mit diversen CYP11B-Sequenzen erzeugten neuen Stämme inklusive der darin enthaltenen cDNA	- 63 -
Tab. 3.6: Steigungswerte und R^2 der Eichgeraden von verschiedenen Experimenten	- 64 -
Tab. 3.7: Mittelwerte \pm Standardabweichung der Enzymaktivitäten der pCAD1 mutierten Stämme.	- 84 -
Tab. 3.8: Mittelwerte \pm Standardabweichung der absolute Aktivitäten der verschiedenen pNMT1-TOPO Stämme.....	- 88 -

- Tab. 3.9:** Ergebnisse des paarweisen Alignments der Aminosäuresequenzen aus verschiedenen Organismen- 91 -
- Tab. 3.10:** Alignment der Aminosäuresequenzen von hsB1, phB1 und hsB2m.- 93 -
- Tab. 4.1:** Liste der erzeugten CYP11B Variante im pNMT1-TOPO Vektor und den dazugehörigen Stämme.....- 95 -
- Tab. 4.2:** Liste der erzeugten CYP11B Varianten im pCAD1 Vektor und den dazugehörigen Stämme- 96 -
- Tab. 4.3:** Liste der Aminosäure im humanem und Affen Enzym an der Positionen 173, 182, 184, 188 und 222- 114 -

Anhang

Nukleotidsequenzen der CYP11B aus verschiedenen Organismen

>hsCYP11B1

```
ATGGCACTCAGGGCAAAGGCAGAGGTGTGCATGGCAGTGCCCTGGCTGTCCCTGCAAAGGGCACAGGCAC
TGGGCACGAGAGCCCGCCGGGTCCCCAGGACAGTGCTGCCCTTTGAAGCCATGCCCCGGCGTCCAGGCCAA
CAGGTGGCTGAGGATGCTGCAGATCTGGAGGGAGCAGGGTTATGAGGACCTGCACCTGGAAGTACACCAG
ACCTTCCAGGAACTAGGGCCCGTTTTTCAGGTACGACTTGGGAGGAGCAGGCATGGTGTGTGTGATGCTGC
CGGAGGACGTGGAGAAGCTGCAACAGGTGGACAGCCTGCATCCCCACAGGATGAGCCTGGAGCCCTGGGT
GGCCTACAGACAACATCGTGGGCACAAATGTGGCGTGTTCCTTGTGAATGGGCCTGAATGGCGCTTCAAC
CGATTGCGGCTGAATCCAGAAGTGCTGTGCGCCAAACGCTGTGCAGAGGTTCTCCCGATGGTGGATGCAG
TGGCCAGGGACTTCTCCCAGGCCCTGAAGAAGAAGGTGCTGCAGAACGCCCCGGGGGAGCCTGACCCTGGA
CGTCCAGCCCAGCATCTTCCACTACACCATAGAAGCCAGCAACTTGGCTCTTTTTGGAGAGCGGCTGGGC
CTGGTTGGCCACAGCCCCAGTTCTGCCAGCCTGAACTTCTCCATGCCCTGGAGGTCATGTTCAAATCCA
CTGTCCAGCTCATGTTTCATGCCCAGGAGCCTGTCTCGCTGGACCAGCCCCAAGGTGTGGAAGGAGCACTT
TGAGGCCTGGGACTGCATCTTCCAGTACGGCGACAACCTGTATCCAGAAAATCTATCAGGAACTGGCCTTC
AGCCGCCCTCAACAGTACACCAGCATCGTGGCGGAGCTCCTGTTGAACCGGAACTGTGCGCCAGATGCCA
TCAAGGCCAACTCTATGGAACACTACTGCAGGGAGCGTGGACACGACGGTGTTCCTTGTGATGACGCT
CTTTGAGCTGGCTCGGAACCCCCAAGTGCAGCAGGCCCTGCGCCAGGAGAGCCTGGCCGCCGACGCCAGC
ATCAGTGAACATCCCCAGAAGGCAACCACCGAGCTGCCCTTGTGCGTGGCCCTCAAGGAGACCTTGC
GGCTCTACCCTGTGGGTCTGTTTTCTGGAGCGAGTGGCGAGCTCAGACTTGGTGTTCAGAACTACCACAT
CCCAGCTGGGACATTGGTGCAGCGTGTTCCTCTACTCTCTGGGTGCAACCCCCGCTTGTTCCTGAGGCCT
GAGCGCTATAACCCCCAGCGCTGGCTAGACATCAGGGGCTCCGGCAGGAACTTCTACCACGTGCCCTTTG
GCTTTGGCATGCGCCAGTGCCTTGGGCGGCGCCTGGCAGAGGCAGAGATGCTGCTGCTGCTGCACCATGT
GCTGAAACACCTCCAGGTGGAGACACTAACCCAAGAGGACATAAAGATGGTCTACAGCTTCATATTGAGG
CCCAGCATGTTCCCCCTCCTCACCTTCAGAGCCATCAACTAA
```

In pCAD1 T 702 ist ein C.

>hsCYP11B2

```
ATGGCACTCAGGGCAAAGGCAGAGGTGTGCGTGGCAGCGCCCTGGCTGTCCCTGCAAAGGGCACGGGCAC
TGGGCACTAGAGCCGCTCGGGCCCCCTAGGACGGTGTGCGCTTTGAAGCCATGCCCCAGCATCCAGGCCAA
CAGGTGGCTGAGGCTGCTGCAGATCTGGAGGGAGCAGGGTTATGAGCACCTGCACCTGGAGATGCACCAG
ACCTTCCAGGAGCTGGGGCCCATTTTTTCAGGTACAACCTTGGGAGGACCACGCATGGTGTGTGTGATGCTGC
CGGAGGATGTGGAGAAGCTGCAACAGGTGGACAGCCTGCATCCCTGCAGGATGATCCTGGAGCCCTGGGT
GGCCTACAGACAACATCGTGGGCACAAATGTGGCGTGTTCCTTGTGAATGGGCCTGAATGGCGCTTCAAC
CGATTGCGGCTGAACCCAGATGTGCTGTGCGCCAAAGCCGTCAGAGGTTCTCCCGATGGTGGATGCAG
TGGCCAGGGACTTCTCCCAGGCCCTGAAGAAGAAGGTGCTGCAGAACGCCCCGGGGGAGCCTGACCCTGGA
CGTCCAGCCCAGCATCTTCCACTACACCATAGAAGCCAGCAACTTAGCTCTTTTTGGAGAGCGGCTGGGC
CTGGTTGGCCACAGCCCCAGTTCTGCCAGCCTGAACTTCTCCATGCCCTGGAGGTCATGTTCAAATCCA
CCGTCCAGCTCATGTTTCATGCCCAGGAGCCTGTCTCGCTGGATCAGCCCCAAGGTGTGGAAGGAGCACTT
TGAGGCCTGGGACTGCATCTTCCAGTACGGTGACAACCTGTATCCAGAAAATCTACCAGGAACTGGCCTTC
AACCGCCCTCAACACTACACAGGCATCGTGGCAGAGCTCCTGTTGAAGGCGGAACTGTCACTAGAAGCCA
TCAAGGCCAACTCTATGGAACACTACTGCAGGGAGCGTGGACACGACAGCGTTTCCCTTGTGATGACGCT
CTTTGAGCTGGCTCGGAACCCCCGACGTGCAGCAGATCCTGCGCCAGGAGAGCCTGGCCGCCGACGCCAGC
ATCAGTGAACATCCCCAGAAGGCAACCACCGAGCTGCCCTTGTGCGGGCGGCCCTCAAGGAGACCTTGC
GGCTCTACCCTGTGGGTCTGTTTTTGGAGCGAGTGGTGAGCTCAGACTTGGTGTTCAGAACTACCACAT
CCCAGCTGGGACATTGGTACAGGTTTTTCTCTACTCGCTGGGTGCAATGCCGCTTGTTCCTGAGGCCT
GAGCGGTATAATCCCCAGCGCTGGCTAGACATCAGGGGCTCCGGCAGGAACTTCCACCACGTGCCCTTTG
GCTTTGGCATGCGCCAGTGCCTCGGGCGGCGCCTGGCAGAGGCAGAGATGCTGCTGCTGCTGCACCACGT
GCTGAAGCACTTCTGGTGGAGACACTAACTCAAGAGGACATAAAGATGGTCTACAGCTTCATATTGAGG
CCTGGCACGTCCCCCTCCTCACCTTCAGAGCGATTAACTAG
```

>hsCYP11B2^{P112IE147D}

ATGGCACTCAGGGCAAAGGCAGAGGTGTGCGTGGCAGCGCCCTGGCTGTCCCTGCAAAGGGCACGGGCAC
 TGGGCACTAGAGCCGCTCGGGCCCCCTAGGACGGTGTGCGCTTTGAAGCCATGCCCCAGCATCCAGGCAA
 CAGGTGGCTGAGGCTGCTGCAGATCTGGAGGGAGCAGGGTTATGAGCACCTGCACCTGGAGATGCACCAG
 ACCTTCCAGGAGCTGGGGCCATTTTTCAGGTACAACCTGGGAGGACCACGCATGGTGTGTGTGATGCTGC
 CGGAGGATGTGGAGAAGCTGCAACAGGTGGACAGCCTGCATCCCTGCAGGATGCCCTGGAGCCCTGGGT
 GGCCTACAGACAACATCGTGGGCACAAATGTGGCGTGTTCCTTGTGAATGGGCCTGAATGGCGCTTCAAC
 CGATTGCGGCTGAACCCAGAAGTGCTGTGCGCCAAGGCCGTGCAGAGGTTCTCCCGATGGTGGATGCAG
 TGGCCAGGGACTTCTCCAGGCCCTGAAGAAGAAGGTGCTGCAGAACGCCGGGGGAGCCTGACCCTGGA
 CGTCCAGCCCAGCATCTTCCACTACACCATAGAAGCCAGCAACTTAGCTCTTTTTGGAGAGCGGCTGGGC
 CTGGTTGGCCACAGCCCCAGTTCTGCCAGCCTGAACTTCTCCATGCCCTGGAGGTCATGTTCAAATCCA
 CCGTCCAGCTCATGTTTATGCCAGGAGCCTGTCTCGCTGGATCAGCCCCAAGGTGTGGAAGGAGCACTT
 TGAGGCCTGGGACTGCATCTTCCAGTACGGTGACAACCTGTATCCAGAAAATCTACCAGGAACTGGCCTTC
 AACCGCCCTCAACACTACACAGGCATCGTGGCAGAGCTCCTGTTGAAGGCCGAACCTGTCACTAGAAGCCA
 TCAAGGCCAACTCTATGGAACCTCACTGCAGGGAGCGTGGACACGACAGCGTTTCCCTTGCTGATGACGCT
 CTTTGAGCTGGCTCGGAACCCCGACGTGCAGCAGATCCTGCGCCAGGAGAGCCTGGCCGCCGACCCAGC
 ATCAGTGAACATCCCCAGAAGGCAACCACCGAGCTGCCCTTGCTGCGGGCGGCCCTCAAGGAGACCTTGC
 GGCTCTACCCTGTGGGTCTGTTTTTGGAGCGAGTGGTGAGCTCAGACTTGGTGCTTTCAGAACTACCACAT
 CCCAGCTGGGACATTGGTACAGGTTTTCTCTACTCGCTGGGTGCAATGCCGCTTGTTCGAGGCCT
 GAGCGGTATAATCCCCAGCGCTGGCTAGACATCAGGGGCTCCGGCAGGAACTTCCACCACGTGCCCTTTG
 GCTTTGGCATGCGCCAGTGCCTCGGGCGGCGCCTGGCAGAGGCAGAGATGCTGCTGCTGCTGCACCACGT
 GCTGAAGCACTTCTGGTGGAGACACTAACTCAAGAGGACATAAAGATGGTCTACAGCTTCATATTGAGG
 CCTGGCACGTCCCCCTCCTCACTTTCAGAGCGATTAAGTAA

>phCYP11B1

ATGGCACTGAGAGCAAAGGCAGAGGTGTGCATGGCAGTGCCCTGGCTGGCCCTACAAAGGGCACGGGCAC
 TGGGCACCAGAGCCACCCGGGTCCCAGGACAGTGTGCGCTTTGAAGCCATGCCCCGGCGTCCAGGCAA
 CAGGTGGCTGAGGCTGCTGCAGATCTGGAGGGAGCAGGGTTATGAGCACCTGCACCTGGAGGTGCACCAG
 ACCTTCCAGGAACTGGGGCCATTTTTCAGGTATGACTTGGGAGGAGCAGGCATGGTGTGTGTGATGCTGC
 CAGAGGACGTGGAGAAGCTGCAGCAGGTGGACAGCCTGAACCCACGCCGGATGAGCCTGGAGCCCTGGGT
 GGCCTACAGACAACATCGTGGGCACAAATGTGGCGTGTTCCTTGTGAACGGGCCTGAATGGCGCTTCAAT
 CGATTGCGGCTGAACCCAGATGTGCTGTGCGCCAAGGCTGTGCAGAGGTTTCTCCCGATGGTGGATGCGG
 TGGCCAGGGACTTCTCCAGGCCCTGAGGAAGAAGGTGCTGCAGAACGCCGGGACAGCGTGACCCTGGA
 CATCCAGCCCAGCATCTTCCACTACACCATAGAAGCCAGCAACTTAGCTCTTTTTGGAGAGCGGCTGGGC
 CTGGTTGGTACAGATCTGCCCCAGCCTGCCCCAGCCTGAGCTTCTCCATGCCCTGGAGGTCATGTTCAAATCCA
 CCGTCCAGCTCATGTTTATGCCAGGAGCCTGTCTCGCTGGACCAGCCCCAAGGTGTGGAAGGAGCACTT
 TGAGGCCTGGGACTGCATCTTCCAGTATGGTGACAACCTGTATCCAGAAAATCTATCAGGAACTGGCCTTG
 AGCCGCCCTCAGCAGTACACCAGCATCGTGGCGGAACTCCTGTTGAATGCGGAACTGTGCGCCAGATGCCA
 TCAAGGCCAACTCTATGGAACCTCACTGCAGGGAGCGTGGACACGACTGTGTTTTCCCTTGTTGATGACACT
 CTTTGAGCTGGCTCGGAACCCCAACGTGCAGCAGGCCCTGCGCCAGGAGAGCCTGGCCGCCGCCGACCCAGC
 ATCAGTGAACATCCCCAGAAGGCAACCACCGAGCTGCCCTTGCTGCGGGCGGCCCTCAAGGAGACCTTGA
 GGCTCTACCCTGTGGGTCTGTTTTTGGAGCGAGTGGTGAGCTCAGACTTGGTGCTTTCAGAACTACCACAT
 CCCAGCTGGGACACTGGTGCAGCTGTTTCTCTACTCGCTGGGTGCAACCCCGCCTTATTTCCGAGGCCT
 GAGCGCTATAACCCCGAGCGCTGGCTAGACATCAGGGGCTCCGGCAGGAACTTCTACCATGTGCCCTTTG
 GCTTTGGCATGCGCCAGTGCCTGGGGCGGCGCCTGGCAGAAGCGGAGATGCTGCTGCTGCTGCACCATGT
 GCTGAAACACCTCCAGGTGGAGACACTAAACCAAGAGGATATAAAGATGGTCTACAGCTTCATATTGAGG
 CCCAGCACGTTCCCCCTCCTCACTTTCAGGTCCATCAACTAA

>rnCYP11B1

ATGGCTCTCAGGGTGACAGCAGATGTGTGGCTGGCAAGACCCTGGCAGTGCCCTGCACAGGACGAGGGCAC
 TGGGCACTACGGCAAAGTGGCCCCCAAGACACTGAAGCCCTTTGAAGCCATAACCACAATACTCCAGGAA
 CAAGTGGCTGAAGATGATACAGATCCTGAGAGAGCAGGGCCAAGAGAACCTACACCTGGAGATGCACCAG
 GCCTTCCAAGAGCTGGGGCCATTTTTCAGGCACAGTGCAGGGGGAGCACAGATTGTGTCTGTGATGCTGC
 CTGAGGACGCTGAGAAGCTGCACCAGGTGGAGAGTATCCTCCCGCATCGGATGCCCTGGAGCCGTGGGT
 GGCCACAGAGAACTCCGTGGCCTGAGACGTGGTGTGTTCTTGCTAAAATGGGGCAGACTGGCGCTTCAAC
 CGACTGCAGCTGAATCCAAATATGCTGTACCCAAAAGCCATTCAATCTTTTGTCCCCTTTGTGGATGTGG
 TAGCAAGGGACTTTGTGGAACCTGAAGAAGAGAATGCTGGAGAATGTTTATGGAAGCATGTTTATAAA
 CATTGAGTCCAATATGTTCAACTATACCATGGAAGCCAGCCATTTTGTATTTCGAGAGCGTCTGGGC
 CTCACAGGCCATGACCTGAAACCTGAGAGCGTGACATTCACTCATGCTCTGCACTCAATGTTCAAGTCCA

CCACACAGCTCATGTTCTTACCCAAGAGCTTGACTCGTTGGACAAGCACCCGGGTGTGGAAAGAACA
 TGATTCCCTGGGATATCATCTCTGAGTATGTACAAAATGTATCAAGAATGTGTATCGCGAACTGGCAGAG
 GGTCCGCAACAGTCCTGGAGTGTATATCCGAGATGGTAGCACAGAGTACTCTGTCAATGGATGCCATCC
 ATGCCAACTCAATGGAACCTTATTGCTGGAAGTGTGACACGACAGCAATCTCCTTGGTAATGACCCTTTT
 TGAGCTGGCTCGGAACCCAGATGTTTACGAGGCTGCGGCAGGAGAGCCTAGCAGCTGAGGCCAGCATC
 GTTGCTAATCCCCAGAAGGCCATGTACAGACCTGCCCTTGTGCGGGCTGCCCTTAAAGAGACCTTGAGGC
 TCTACCCTGTTGGTAGCTTTGTAGAGAGAATCGTACACTCAGACCTGGTGCTTACAGAACTATCATGTCCC
 TGCTGGGACATTCGTACATAATTTATCTGTACTCCATGGGCCGAAACCCCTGCAGTGTCCCAAGGCCCTGAG
 CGCTACATGCCTCAGCGCTGGCTGGAGAGGAAAAGGAGTTTCCAGCATCTGGCCTTCGGCTTTGGGGTGC
 GCCAGTGCCTGGGGCGCGCTGGCAGAGGTGGAGATGCTGCTCCTGCTTACCATATGCTGAAAACCTT
 CCAAGTGGAGACACTGAGACAAGAGGATATGCAGATGGTTTTTCGCTTTCTTTTGATGCCAGCTCTAGT
 CCTTTCCTTACTTTCCGGCCTGTGAGCTAG

>cpCYP11B1

ATGGCATTAGGTTGAAGTCAGATGTGCGGCTGGCAGGTTCTTGGCTGTGCCTGCGTGGGGCCAGGGCAC
 TGGGCACCAGAGCAGTCACGGCCTCCAAAGCCTCAGTGCTGCCCTTTGAAAGTCATACCCCAACACCAGGG
 CAACAAGAGGCAGAGGGTGTGTCAGTTCGGAAGGAGCAGAACCATGATGACTTGCACCTGGAGATGCAC
 CAGACCTTCCAGGAGCTGGGGCCGATTTTACAGGTGTGATGTGGGAAGTACACGGATAGTGCCTGTGATGC
 TGCCAGAGGACTGTGCGAGGCTGCACCAGGCAGAGAGCCCCTATCCCATCGCATGCACCTGGAGCCCTG
 GATGGCCTACAGAGAGCACCCGACGGCAGAACCTTGGCGTGTTTTTGCTGAATGGGCCTGAATGGCTCTCC
 AACCGACGGTGGCTGAACCCAAATGTGCTGTCCCCAAAGGCAGTGCAAAACCTCCTCCCCATGGTAGACA
 CAGTGGCAAGAGACTTCTCAGAGGCTCTGAAGCAGAAGTACTTACAGAGTCCCAGGGGAGCCTGACCAT
 GGACATGCAGCCCGACATCCATAAGTATACTGTGGAAGTCAGCAATTTTGCACATTTGGTGAAAGACTG
 GGCCTTTTTGCTGTAAACCCAGCTCTCAAAGCCTGAAATTCATCCATGCCCTGGAGGCCGTATTTAAAA
 CGACCACACAGTTAATGTTTTCTGCCAAGAAGTCTATCCCGCTGGATGAGAAGTCAAGCATGGAAGGAGCA
 CTTTGAGGCCTGGGACTACATTTCTGAGTATGCTGAAAATCGCATCCAGAAGAAAATATGAGGAGCTTGCT
 CGAGGTTGCTCTCAGTACAACAGCATTGTGGCAAATCTGATGCTGCAGGGGAATTTACCACTACGTGCCA
 TGAAAGCAAACATTATGGACCTCGTGGCAGGGAGTGTGGACACGACAGCCTTACCATTGATGATGACACT
 CTTTGAGTTGGCCAGGAATCCTACCGTGCAGCAGGCCCTGCGGCAGGAGAGCATGGCTACTGAACCCAAT
 ATTTATGAGAATCCCCAGAGACTCAGAATGGAGCTCCCCCTTCTGTGGGCAGCCATCAAGGAAACCTGA
 GGATGTACCCTGTTGGTCTTTTTCTGGAGAGATTCTGACCTCACCTTGGTGCTTCAGAACTACCACAT
 CCCAGCAGGGACTTTGGTGCATTTAAATCTGTACTCCATGGGCCGAAACCCCTGAGGTGTTCTGAGTCCA
 GAGCATTACAACCCCGAGCGGTGGCTGGAGAACAAGGAGACCTATAAGCATCTGGCCTTTGGATTTGGGG
 TTCGCCAGTGTATTGGACGGCGCCTAGCAGAAGTGGAGATGCTGCTGTTTCTCCATCATGTGCTGAAGTC
 CTTCTGTGTGGAGACAGCATTCCAAGAGGATGTGAAGTTTCGCCTACCGCTTTCGTTATGATGCCACCTCT
 GCACCCCTCCTCACTTTACAGGCCTGTGAGCTAA

>cpCYP11B2

ATGGCATTAGGTTGAAGTCAGATGTGCGGCTGGCAGGTTCTTGGCTGTGCCTGCGTGGGGCCAGGGCAC
 TGGGCACCAGAGCAGTTATGGGGCCCAAGGCCACAGTGTGCTGCCCTTTGAAAGTCATACCCCAACACCAGGG
 CAATAAGTGGCTGAGAGTACTGCAGATCTGGAAGGATCAGGGCATTGAGGACATTCACCTGGAGATGCAC
 CGGACCTTCCAGGAATTGGGACCTATTTTTAGGTATGATGTGGGAAGAAGACAGATGGTCTGTGTGATGC
 TGCCAGAGGATGCTGAGCGACTGCACAGGGCTGAGAGCCTGTATCCCTGCCGATGCACCTGGAGCCCTG
 GATGGCCTACAGGGAGCACCCGAGGGCAGAAGCCTGGCGTGTCTTGTGCTGAATGGGCCTGAATGGCGCTAC
 AATCGACTGAGGCTGAACCCAAATGTGCTGTCCCCAAAAGCAGTGCAAAAGTTCTCCTCCCCATGGTGGACA
 CAGTGGCAAGAGACTTCTCAGATGCTCTGAAGGAGAAGGTGCTACAGAGTGGCCAGGGGAGCCTGACCCCT
 AGACATCCAGCCCAGCATCTTTAACTATAACCATAGAAGCCAGCAACTTTTGCACCTTTTTGGAGAGCGACTG
 GGCCTCTTTGGTCAACCCCAAGCACAGACAGCCTGGACTTACCCCGTGCCTACATGCCATGCTCAAAT
 CTACTGGGAAGCTCATGTTTCTGCCAGGAGTCTGTCCCGCTGGATGAGCAGCCAGGTGTGGAAGGAGCA
 CTTTGAGGCCTGGGACTACATTTTTGACTATGCTGACAGTTGGATCCAGAAGACCTATCAGAAGCTTGT
 TGCAGTTACCCTCAGTACTACAGTGGCATCATGGCAGATCTGCTGTTGCAGGGGGACTTGTGAGTAAATG
 CCATCAAGGCCAACAGTATTGAACCTCACAGCAGGGAGCGTGGACACGACCGCCTTCCCCTGATGATGAC
 ACTCTTTGAGTTAGCCAGAACTCCACCATGCAGCAGGCTCTGCACCAGGAAAGCGTGGCTGTGAGCCC
 ATCATCTCTGTGGATCCACAGAGGGCCACCACAGAATTACCTTGTGCGGGCAGCCCTCAAGGAGACCC
 TGAGGCTGTACCCAGTTGGTCTTTTTTTGGAGAGAATACTGAGCTCAGACTTGGTGCTTACAGAAATATCA
 CATCCCAGCTGGGACGTTGGTCCATTTGTATCTATACTCAATGGGTGCAAAACCCCTGCAATGTTCTGAGT
 CCAGAGCTCTACAATCCTCAACGCTGGTTGGACAATAGACAGACCTTCCACCACCTGGCTTTTTGGCTTTG
 GGGTGCACAGTGTCTGGGGAGGCGTCTGGCAGAGGTGGAGATGCTGCTGCTTCTGCATCACATTTTGAA
 ATCTTTCCACGTGGAGGCACCACTCCAAGAAGATGTGAAGTTTTCTACCATTTTGTCTGATGCCACC
 TCCTTTCCCTCCTTACTTTCCGGCCTGTCTTCTAG

Liste alle erzeugten Plasmiden

Name	cDNA von:	Ausgangsplasmid	Stamm
pNMT1-hs11B1	hsCYP11B1	pNMT1-TOPO® (Invitrogen)	HSB1
pNMT1-hs11B2	hsCYP11B2	pNMT1-TOPO® (Invitrogen)	HSB2
pNMT1-hs11B2m	hsCYP11B2 ^{P112IE147D} (hsCYP11B2m)	pNMT1-TOPO® (Invitrogen)	HSB2M
pNMT1-ph11B1	phCYP11B1	pNMT1-TOPO® (Invitrogen)	PHB1
pNMT1-rn11B1	rnCYP11B1	pNMT1-TOPO® (Invitrogen)	RNB1
pNMT1-cp11B1	cpCYP11B1	pNMT1-TOPO® (Invitrogen)	CPB1
pNMT1-cp11B2	cpCYP11B2	pNMT1-TOPO® (Invitrogen)	CPB2
pNMT1-wt11B1A	hsCYP11B1 ^{M52LV78I} (Präsequenz von hsCYP11B2)	pNMT1-TOPO® (Invitrogen)	SZ1A
pNMT1-wt11B1B	hsCYP11B1 ^{M52LV78I} (Präsequenz von hsCYP11B1)	pNMT1-TOPO® (Invitrogen)	SZ1B

Name	Mutation	Ausgangsplasmid	Stamm
pM52L	Met52Leu	pCAD1	SZ52
pV78I	Val78Ile	pCAD1	SZ78
p11B1wt	Met52Leu, Val78Ile	pCAD1	SZ1
pS112P	Ser112Pro	pCAD1	SZ112
pP135A	Pro135Ala	pCAD1	SZ135
pL144K	Leu144Lys	pCAD1	SZ144
pN152K	Asn152Lys	pCAD1	SZ152

Name	Mutation	Ausgangsplasmid	Stamm
pT185I	Thr185Ile	pCAD1	SZ185
pA279K	Ala279Lys	pCAD1	SZ279
pS315G	Ser315Gly	pCAD1	SZ315
pP322S	Pro322Ser	pCAD1	SZ322
pA386F	Ala386Phe	pCAD1	SZ386
pD430K	Asp430Arg	pCAD1	SZ430
pI431K	Ile431Lys	pCAD1	SZ431
pF445W	Phe445Trp	pCAD1	SZ445

Eigene Veröffentlichungen

Dragan CA, Zearo S, Hannemann F, Bernhardt R, Bureik M. „Efficient conversion of 11-deoxycortisol to cortisol (hydrocortisone) by recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*“. FEMS Yeast Res 2005; 5(6-7):621-625

Posterbeiträge

Zearo S, Hannemann F, Bernhardt R. “Activities of CYP11B isoforms from different species“. Gemeinsame Herbsttagung der GBM (Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V) und der DGPT (Gesellschaft f. Pharmakologie & Toxikologie). 7.-10. September 2002 Halle (Saale)

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Rita Bernhardt für die Möglichkeit zur Promotion an ihrem Institut sowie für die gewährte Unterstützung bedanken.

Besonderer Dank gilt Dr. Frank Hannemann für seine geduldige und umsichtige Betreuung meiner Arbeit in all den Jahren, dafür dass er Ordnung in mein Chaos gebracht hat und für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Bei Dr. Matthias Bureik möchte ich mich besonders für die vielen spannenden Diskussionen und Fußballpartien bedanken.

Herrn Dr. Burkhard Schiffler danke ich für die ausführliche Einweisung in die Geheimnisse der HPLC-Analytik und die zahlreichen Diskussionen bei einer Tasse Espresso.

Besonders verbunden fühle ich mich dem „Mädchenzimmer“ (Susanne Böhmer, Britta Wilzewski, Anne-Claire Maucourt) und Cornelia Virus für die wissenschaftliche und insbesondere die moralische Unterstützung. Das breite Spektrum unserer Diskussionen (vom neuesten Küchenrezept über politische Themen bis zum Sinn des Lebens.) war mir immer eine willkommene Abwechslung zum manchmal recht monotonen Laboralltag. Ganz besonders zu Dank verpflichtet bin ich Euch aber für die logistische Unterstützung beim Babysitten.

Mein ausdrücklicher Dank gilt außerdem Dr. Andy Zöllner für seine methodische Unterstützung bei den bioinformatischen Problemen, seiner Hilfe bei der Erarbeitung der Diskussion und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön auch an meine Laborkollegen Michael Lisurek und Andreas Bichet, die mit mir alle Freuden (gelungene Experimente und positive Ergebnisse) und Leiden (missglückte Experimente, unplausible Ergebnisse, die Reinigung der Zentrifugenrotoren und den Müll zum Autoklavieren) geteilt haben. Danke für Eure gute Laune, die freundliche Aufnahme in Euer Labor und die zahlreichen Buffy-Abende.

Ich danke allen Technikern (Katharina Bompais, Walter Klose, Wolfgang Reinle, Natalie Lenz) für die große technische Unterstützung und die Hilfe bei der Durchführung der Experimente. Besonders danke ich Katharina, die mir bei meinen ersten Schritten im Labor eine große Stütze war.

Natalia Umanskaya danke ich für die unschätzbare Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Experimente. Ohne Dich wäre meine Arbeit nie fertig geworden.

Calin A. Dragan und Tarek Hakki danke ich für den kontinuierlichen Austausch von Wissen und Erfahrungen bezüglich *S. pombe*.

Johannes A. Schmitt danke ich für sein immer freundliches Wesen, die interessanten und lehrreichen Ausflüge sowie die unvergesslichen Pilzsammlungen mit anschließendem Gaumenschmaus.

Ich möchte auch nicht Martin Wörner vergessen, der mir geholfen hat, das Plasmid für den Stamm SZ1 zu generieren.

Ein ganz spezielles Dankeschön geht an alle Mitarbeiter dieser Arbeitsgruppe (auch jene, die ich vergessen habe namentlich zu nennen) dafür, dass sie mich jederzeit unterstützt und entlastet haben.

Bei meinem Mann Markus möchte ich mich von ganzem Herzen dafür bedanken, dass er sich viel Zeit für meine Arbeit genommen und sie mit Geduld und Mühe gelesen und korrigiert hat.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, den 12.09.2006