

**AKR1C1-abhängige Ganzzell-Biotransformation
mit rekombinanten Spalthefern**

Dissertation

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

von

Dipl.-Biol. Julia Maria Naumann

Saarbrücken

2009

Tag des Kolloquiums: 01. April 2010

Dekan: Prof. Dr. Stefan Diebels

Berichterstatter: PD Dr. Matthias Bureik (1. Gutachter)
Prof. Dr. Elmar Heinzle (2. Gutachter)

Vorsitz: Prof. Dr. Alexandra Kiemer

Akad. Mitarbeiter: Dr. Britta Diesel

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Steroide und Steroidhormone.....	3
1.2 Chemische und biotechnologische Steroidsynthese	5
1.3 Aldo-Keto-Reduktasen	8
1.4 AKR1C1.....	11
1.5 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> als biotechnologisches Modellsystem	13
1.6 Zielsetzung.....	14
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Material	16
2.1.1 Enzyme.....	16
2.1.2 Kits	16
2.1.3 Steroide	16
2.1.4 Sonstige Reagenzien.....	17
2.1.5 Vektoren und Plasmide	17
2.1.6 Mikroorganismen	19
2.1.7 Sequenzierprimer	19
2.1.8 Molekulargewichtsmarker	20
2.2 Methoden	20
2.2.1 Hefemethoden	20
2.2.1.1 Nährmedien für <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	20
2.2.1.2 Kultivierung von <i>S. pombe</i>	22
2.2.1.3 Spalthegeglycerolkulturen.....	22
2.2.1.4 Herstellung chemisch kompetenter <i>S. pombe</i> -Zellen.....	22
2.2.1.5 Hefetransformation	23

2.2.1.6	Wachstumsversuche.....	23
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.2.1	Nährmedien für <i>E. coli</i>	25
2.2.2.2	Kultivierung von <i>E. coli</i>	25
2.2.2.3	DNA-Verdau mittels Restriktionsendonucleasen	25
2.2.2.4	Agarosegel-Elektrophorese.....	26
2.2.2.5	Isolierung von DNA aus einem Agarosegel.....	27
2.2.2.6	Ligation von DNA-Molekülen.....	27
2.2.2.7	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	27
2.2.2.8	Bakterientransformation	28
2.2.2.9	Plasmidisolierung aus Bakterien.....	29
2.2.2.10	Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von DNA	29
2.2.2.11	DNA-Sequenzierung.....	30
2.2.3	Ganzzell-Biotransformation	30
2.2.3.1	Klonselektion.....	30
2.2.3.2	Ganzzell-Biotransformation in Schüttelkolben.....	31
2.2.3.3	Ganzzell-Biotransformation in MTPs.....	31
2.2.3.4	Ganzzell-Biotransformation im 1 l-Bioreaktor	31
2.2.3.5	Ganzzell-Biotransformation im 10 l-Bioreaktor	32
2.2.3.6	Ganzzell-Biotransformation im 70 l-Bioreaktor	32
2.2.4	Bioreaktor- <i>feeding</i>	33
2.2.4.1	Manuelle, punktuelle Glucosezugabe	34
2.2.4.2	Automatisch geregeltes, wachstumsratenangepasstes <i>feeding</i>	34
2.2.4.3	Konstantes <i>feeding</i>	35
2.2.5	Analytische Methoden.....	35
2.2.5.1	<i>High performance liquid chromatography</i> (HPLC)-Analyse	35
2.2.5.2	<i>Nuclear magnetic resonance</i> (NMR)-Spektroskopie	36
2.2.6	Produktaufreinigung.....	36
2.2.6.1	Dünnschichtchromatografie.....	36
2.2.6.2	Säulenchromatografie zur 20 α -DHP-Aufreinigung.....	37
2.2.6.3	Niederdruck-Flüssigkeits-Chromatografie zur 20 α -DHP-Aufreinigung.....	37
3	ERGEBNISSE.....	39
3.1	Funktionelle Expression von AKR1C1 in Spalthefen.....	39
3.1.1	Klonierung der Expressionsplasmide	39
3.1.2	Klonierung der Expressionsstämme JMN7 und JMN8	40
3.1.3	Biotransformation von Progesteron.....	41
3.1.4	Optimierung der Produktextraktion.....	42
3.1.5	Bestimmung der Substratlöslichkeit.....	44
3.1.6	Klonselektion	45
3.1.7	Wachstumskinetik	46

3.1.8	Expressionsregulierung	47
3.1.9	Zelldichteabhängige Umsatzrate	48
3.1.10	Umsatzkinetiken	49
3.1.10.1	Temperaturabhängige Umsatzkinetik	49
3.1.10.2	Substratabhängige Umsatzkinetik	49
3.1.10.3	Glucoseabhängige Umsatzkinetik	51
3.1.11	Versuche zur Etablierung eines Inhibitortestsystems	53
3.1.12	Biotransformation von Dihydrogesteron	54
3.1.13	Untersuchung der Substratspezifität	56
3.2	Prozessentwicklung mit dem Stamm JMN8	57
3.2.1	Substratabhängige Wachstumskinetik	58
3.2.2	Substratabhängige Umsatzkinetik	59
3.2.3	<i>Fed-batch</i> -Produktion von 20 α -DHD im 1 l-Bioreaktor – Prozessführung A	60
3.2.4	<i>Fed-batch</i> -Produktion von 20 α -DHD im 10 l-Bioreaktor – Prozessführung B	62
3.2.5	<i>Fed-batch</i> -Produktion von 20 α -DHP im 1 l-Bioreaktor – Prozessführung F	64
3.3	Stammoptimierung	67
3.3.1	Klonierung der Expressionsstämme JMN9, CAD300 und CAD302	67
3.3.2	Klonselektion und Stammvergleich	68
3.4	Prozessentwicklung mit dem Stamm CAD302	69
3.4.1	Wachstumskinetiken	69
3.4.1.1	Substratabhängige Wachstumskinetiken	70
3.4.1.2	Glucoseabhängige Wachstumskinetik	71
3.4.2	Verbesserung der Produktionsrate durch β -Cyclodextrin-Zugabe	72
3.4.2.1	Einfluss auf die Substratlöslichkeit	73
3.4.2.2	Einfluss auf die Umsatzgeschwindigkeit	73
3.4.3	Umsatzkinetiken	74
3.4.3.1	Substratabhängige Umsatzkinetik	74
3.4.3.2	Glucoseabhängige Umsatzkinetik	75
3.4.3.3	Produktabhängige Umsatzkinetik	76
3.4.4	<i>Fed-batch</i> -Produktion von 20 α -DHD im 1 l-Bioreaktor	77
3.4.4.1	20 α -DHD-Produktion mit einmaliger Glucosezugabe – Prozessführung C	77
3.4.4.2	20 α -DHD-Produktion mit automatisiertem <i>feeding</i> – Prozessführung D	79
3.4.4.3	20 α -DHD-Produktion mit verbessertem Medium und β -Cyclodextrin-Zusatz – Prozessführung E	81
3.4.5	<i>Fed-batch</i> -Produktion von 20 α -DHD im 70 l-Bioreaktor	83
3.4.5.1	20 α -DHD-Produktion – Prozessführung G	83
3.4.5.2	Verbesserung der 20 α -DHD-Produktion – Prozessführung H	85
3.4.5.3	20 α -DHD-Produktionsprozess – Prozessführung I	87
3.4.6	<i>Fed-batch</i> -Produktion von 20 α -DHP im 70 l-Bioreaktor – Prozessführung J	90

4	DISKUSSION UND AUSBLICK.....	93
4.1	Funktionelle Expression von AKR1C1 in Spaltheffen.....	95
4.2	Prozessentwicklung mit dem Stamm JMN8.....	104
4.3	Stammoptimierung.....	108
4.4	Prozessentwicklung mit dem Stamm CAD302.....	109
4.5	20 α -DHP-Produktion.....	123
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	124
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	126
	ANHANG.....	137
	DANKSAGUNG.....	145

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Deletion
μ	mikro (10^{-6})
μ	Wachstumsratenkonstante [h^{-1}]
μ_{max}	maximale Wachstumsratenkonstante [h^{-1}]
AKR	Aldo-Keto-Reduktase
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillinresistenzgen (β -Lactamase)
ars	autonom replizierende Sequenz
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
CYP	Cytochrom P450
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatografie
DD	Dihydrodiol-Dehydrogenase
dH ₂ O	destilliertes, autoklaviertes Wasser
DHD	Dihydrodydrogesteron
DHP	Dihydroprogesteron
DM1	Danielas Medium 1
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotid
EMM	Edinburgh Minimal Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>F</i>	<i>feeding-Rate</i> [l/h]
FM1	<i>feed</i> -Medium 1
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GRAS	<i>generally regarded as safe</i>
h	Stunde
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, die 50 % Inhibierung verursacht
k	kilo (tausend-)
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	<i>Luria Bertani Broth</i>
LiAc	Lithiumacetat

m	milli (10^{-6})
<i>M</i>	<i>maintenance factor</i> [$\text{g}_{\text{Glucose}}/(\text{g}_{\text{Biomasse}} \cdot \text{h})$]
Mb	Megabasenpaare
NADH	Nikotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nikotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
min	Minute
n	nano (10^{-9})
NCYC	<i>National Collection of Yeast Cultures</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
nmt	<i>no message in thiamine</i>
q_g	spezifische Glucoseverbrauchsrate [g/h]
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S_g	Glucosekonzentration [g/l]
SDR	<i>Short chain Dehydrogenase/Reduktase</i>
t	<i>time</i> (Zeit) [h]
TIM	Triosephosphat-Isomerase
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V_0	Initialvolumen [l]
X	Trockenbiomasse [g/l]
X_0	initiale Trockenbiomasse [g/l]
YEA	<i>yeast extract</i> mit Additiven
Y_{Xg}	Biomassertragskoeffizient für Glucose [$\text{g}_{\text{Biomasse}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$]

Abkürzungen für Aminosäuren

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

Zusammenfassung

Steroide und Steroidhormone stellen gegenwärtig einen der größten Bereiche der pharmazeutischen Industrie dar. Aufgrund der überwältigenden Nachfrage nach diesen Substanzen müssen neue Synthesewege entwickelt werden. Auch Steroidbiotransformationen, die von rekombinanten Mikroorganismen katalysiert werden, sind von immer größerem Interesse. Unter den verschiedenen Enzymen, die bekanntermaßen spezifische Veränderungen am Steroidrückgrat ermöglichen, befinden sich auch Mitglieder der Enzymfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen (AKRs). Letztere werden bisher noch nicht im industriellen Maßstab biotechnologisch eingesetzt. Um die generelle Möglichkeit der biotechnologischen Nutzung von AKRs, die heterolog in der Spaltheife *S. pombe* exprimiert werden, zur Steroidmodifizierung zu untersuchen, wurde die humane 20 α -HSD AKR1C1 als Modellenzym ausgewählt. Dieses Enzym katalysiert die regio- und stereospezifische Reduktion von Progesteron zu 20 α -DHP.

Mit diesem Enzym konnte erstmals die funktionelle Expression einer heterologen AKR in *S. pombe* nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass sowohl Progesteron als auch Dydrogesteron Substrate für dieses System darstellen. Nach der molekularbiologischen Verbesserung des Produktionsstamms und einer umfangreichen verfahrenstechnischen Optimierung entstand ein innovatives Spaltheife-basiertes Ganzzell-Biotransformationsverfahren. Dieses ermöglicht die effiziente Produktion von 20 α -DHP und 20 α -DHD im technischen Maßstab und ist gegenüber den gegenwärtig angewandten Verfahren umweltgerechter, ressourcenschonender und rentabler.

Summary

Steroids and steroid hormones represent currently one of the largest sectors in the pharmaceutical industry. Due to the overwhelming demand for these substances new synthesis routes have to be developed. In this context biotransformations of steroids catalyzed by recombinant microorganisms are of steadily increasing interest. Among the different types of enzymes that are known to allow specific modifications of the steroid backbone are also members of the aldo-keto reductases (AKRs). The latter are not biotechnologically used at industrial scale so far. To investigate the general feasibility of a biotechnological use of AKRs heterologously expressed in the fission yeast *S. pombe* for steroid modification, the human 20 α -HSD AKR1C1 was chosen as model enzyme. This enzyme catalyzes the regio- and stereospecific reduction of progesterone to 20 α -DHP.

Using this enzyme the functional expression of a heterologous AKR in *S. pombe* could be demonstrated for the first time. It was shown that progesterone as well as dydrogesterone are substrates for this system. After molecular biological improvement of the production strain and an extensive procedural optimization an innovative fission yeast based whole-cell biotransformation process has been created. This allows the efficient production of 20 α -DHP und 20 α -DHD, respectively, at technical scale; and in comparison with the currently applied procedures it is more environmental protective, resource-efficient and profitable.

1 Einleitung

1.1 Steroide und Steroidhormone

Steroide sind tetrazyklische, starre Moleküle, die sich vom Steran ableiten. Sie zählen zur Stoffklasse der Lipide und weisen daher stark hydrophobe Eigenschaften auf. Natürliche Steroide kommen in Tieren, Pflanzen und Pilzen vor und erfüllen dort unterschiedlichste biochemische Aufgaben. Im tierischen und menschlichen Organismus stellt Cholesterin das wichtigste Steroid dar. Zur Gruppe der Steroide zählen neben den Steroidhormonen auch die Sterine, Gallensäuren, herzwirksamen Steroide, Sapogenine und Steroidalkaloide. Im Rahmen dieser Arbeit werden allerdings nur die Steroidhormone näher betrachtet. Die Steroidhormone der Säugetiere werden entsprechend des Steroidrezeptors, an den sie binden, weiter in Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Androgene, Estrogene und Gestagene unterteilt. Bei den letzten Dreien handelt es sich um die Sexualhormone. Die Steroidhormone werden in den Gonaden und Nebennieren aus Cholesterin aufgebaut. Ausgehend vom Cholesterin entsteht Pregnenolon, das die zentrale Ausgangsverbindung der Steroidhormonbiosynthese darstellt. Der Abbau der Steroidhormone erfolgt beim Menschen in der Leber durch Hydroxylierung (Phase I-Reaktion) und anschließende Konjugation mit Glucuronsäure, Glycin oder Taurin (Phase II-Reaktion), wodurch sie wasserlöslicher gemacht werden. Sie werden dann als Gallensäuren über die Galle in den Zwölffingerdarm ausgeschieden.

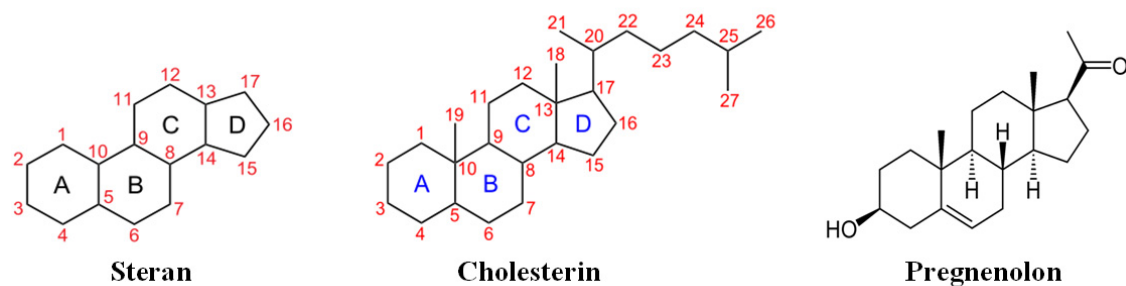


Abbildung 1: Grundlegende Strukturen der Steroide mit Benennung der Kohlenstoffatome und Ringe. Steran ist das Grundgerüst aller Steroide, Cholesterin ist das wichtigste Steroid, Pregnenolon stellt die zentrale Ausgangsverbindung der Steroidhormonbiosynthese dar.

Steroidhormone regulieren in Menschen und Tieren grundlegende biologische Funktionen. Diese kleinen, relativ gleichförmigen Moleküle können dabei vollkommen unterschiedliche Wirkungen haben, da ihre leichten strukturellen Unterschiede häufig nur die Wechselwirkung mit bestimmten spezifischen Steroidrezeptoren ermöglichen. Nach der Rezeptoraktivierung besteht deren Wirkung dann in einer unmittelbaren

Transkriptionsregulation. Die biologische Aktivität von Steroidhormonen ist durch verschiedene Hydroxy- und Ketogruppen, Doppelbindungen an variierenden Positionen und die An- oder Abwesenheit einer Seitenkette an der 17 β -Position bestimmt. Andere Steroidklassen unterscheiden sich von den Steroidhormonen noch zusätzlich unter anderem in der Ringverknüpfung. Von diesen Basisstrukturen leiten sich viele synthetische Analoga mit einer durch die Einführung zusätzlicher Doppelbindungen oder Substituenten veränderten oder verstärkten biologischen Wirksamkeit ab. Viele Steroidhormon-Derivate weisen anabole, antihormonelle, antiinflammatorische, antirheumatische, kontrazeptive oder sedative Wirkungen auf. Ihr Einsatz als Arzneistoffe (Beispiele dafür sind die Antibabypille und Cortisonpräparate) hat daher seit 1949, als Merck erstmals Cortison einführte, ungemein zugenommen.

Ein Beispiel für ein wichtiges therapeutisches Ziel ist die Regulation des Progesteronhaushalts. Progesteron gehört zur Gruppe der Sexualhormone, es wird überwiegend im weiblichen Organismus im Gelbkörper hergestellt und heißt deshalb auch Gelbkörperhormon. Während einer Schwangerschaft wird es zusätzlich in der Plazenta produziert. In geringer Menge wird Progesteron auch in den Nebennieren gebildet. Dieses Hormon spielt bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse eine zentrale und komplexe Rolle. So reguliert Progesteron den weiblichen Zyklus und die Initiation und Aufrechterhaltung der Schwangerschaft. Weiterhin wirkt Progesteron auf viele andere endogene Systeme. Es ist beispielsweise entzündungshemmend, verringert das Volumen der extrazellulären Flüssigkeit, wirkt neuroprotektiv (über die Regulation apoptotischer Gene) und vermindert die Aktivität der Gallenblase (Landau, *et al.*, 1955, Hould, *et al.*, 1988, Schumacher, *et al.*, 2004). Zusätzlich wirkt es als Antagonist von Mineralocorticoiden (Rupprecht, *et al.*, 1993). Progesteron stellt auch die Ausgangsverbindung für viele andere Steroidhormone, z.B. Androgene, Cortisol und Aldosteron dar. Es wird therapeutisch vorrangig für die Behandlung von Schwangerschaftsstörungen, intermenstruellen Blutungen und Unfruchtbarkeit eingesetzt. Weiterhin wird Progesteron als Medikament bei künstlicher Befruchtung sowie in der Hormontherapie transsexueller Frauen angewendet. Es gibt zudem Hinweise darauf, dass dieses Hormon Frühgeburten vorbeugen kann und als neuroprotektiver Stoff Schäden nach Hirntraumata relativieren kann (da Fonseca, *et al.*, 2003, Gibson, *et al.*, 2008). Mangelnde Wirksamkeit, Stabilität und Bioverfügbarkeit stellen jedoch Hindernisse bei der Verabreichung von Progesteron dar. Daher wurden einige synthetische Progesteron-Derivate erzeugt, die ähnliche Wirkungen aufweisen, aber die Nachteile des natürlichen Hormons umgehen.

Ein Vertreter solcher Gestagene ist Dydrogesteron. Es wird unter dem Namen „Duphaston“ durch Solvay Pharmaceuticals hergestellt und vertrieben. Dydrogesteron dient der Behandlung von Zyklusstörungen und -beschwerden, die auf Progesteronmangel aufgrund einer Schwäche des Gelbkörpers (*Corpus-luteum*-Insuffizienz) zurückzuführen sind. Der Wirkstoff soll den Menstruationszyklus normalisieren, Zyklusbeschwerden wie prämenstruellem Syndrom (PMS) oder Regelschmerzen

entgegenwirken und die Voraussetzungen für eine Schwangerschaft schaffen, indem er die Progesteron-Wirkung nachahmt. Duphaston ist das einzige zugelassene Medikament gegen durch Gelbkörperschwäche bedingte Unfruchtbarkeit. Es soll die Einnistung der Zygote ermöglichen und Frühgeburten vorbeugen. Zudem gibt es Hinweise auf die Behandelbarkeit von wiederholten Aborten durch Dydrogesteron (Gruber & Huber, 2005). Weiterhin wird Dydrogesteron bei der Behandlung von Wechseljahresbeschwerden eingesetzt. Die Wirkung von Dydrogesteron entspricht dabei der von Progesteron (Chetrite, *et al.*, 2004), jedoch soll die Wirksamkeit nach oraler Applikation 20-fach höher sein. Dydrogesteron ist also bereits in geringen Dosen hoch aktiv. Zudem wird es leicht resorbiert, ist stabil und zeigt im Gegensatz zu Progesteron keine antiinflammatorische Wirkung oder Glucocorticoid-Aktivität (Backer, 1962). Somit hat es also geringere Nebenwirkungen als Progesteron. Auch der 20-Hydroxymetabolit von Dydrogesteron, 20 α -Dihydrodydrogesteron (20 α -DHD), weist weitreichende pharmakologische Wirkungen auf (Chetrite, *et al.*, 2004) und könnte daher gegebenenfalls selbst als therapeutischer Wirkstoff dienen.

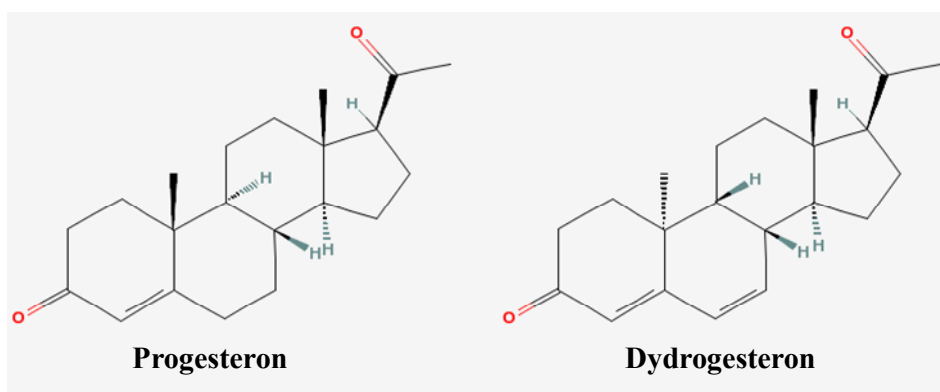


Abbildung 2: Molekülstruktur von Progesteron und Dydrogesteron

1.2 Chemische und biotechnologische Steroidsynthese

Obwohl die chemische Totalsynthese von Steroiden (Woodward, *et al.*, 1952) einen außerordentlichen wissenschaftlichen Erfolg darstellte ist sie ökonomisch nicht wettbewerbsfähig. Heutzutage erfolgt die Steroidproduktion meist ausgehend vom β -Sitosterol, Diosgenin oder anderen Phytosterolen durch partielle Synthese, also eine Kombination aus chemischen und biotechnologischen Reaktionsschritten. Die Biotransformationsschritte basieren hierbei immer noch hauptsächlich auf natürlichen Mikroorganismen, welche die gewünschten Aktivitäten aufweisen. Seit ihrer ersten Beschreibung am Ende des 19. Jahrhunderts wurde die mikrobielle Steroidsynthese mit einer Vielzahl unterschiedlicher natürlicher Mikroorganismen wie Eubakterien, Actinomyceten, imperfekten Pilzen und anderen durchgeführt (Bernhardt, 2006). 1937 begann die Entwicklung von technisch nutzbaren mikrobiellen Prozessen bei der Steroidproduktion mit der Herstellung von Testosteron bei Schering. Nachdem die

pharmakologischen Auswirkungen von Cortisol und Progesteron bekannt wurden entwickelte sich die Forschung auf diesem Feld in den 1950er Jahren schnell und führte zur Identifizierung einer Reihe von verschiedenen Mikroorganismen, die Steroid-Hydroxylierungen, -Hydrogenierungen, -Dehydrogenierungen, sowie die Spaltung von Kohlestoff-Kohlenstoff-Bindungen katalysieren (Megges, *et al.*, 1990). Allerdings müssen die mikrobiellen Steroidbiotransformationen auf Kostenbasis mit den alternativen chemischen Reaktionen konkurrieren. Aufgrund der großen Auswahl an ökonomisch sinnvollen chemischen Reaktionen wurden deshalb nur wenige der vielen mikrobiellen Transformationen, die wissenschaftlich beschrieben wurden, tatsächlich technisch angewandt. Wenn die chemische Synthese von Steroiden mit speziellen Veränderungen am Steroidgerüst jedoch besonders aufwändig oder sogar unmöglich ist wird der Einsatz mikrobieller Schritte häufig wirtschaftlich vertretbar. Die industriell angewandten Steroidbiotransformationen beinhalten Seitenketten-Abbaureaktionen, $\Delta 1,2$ -, $\Delta 1,4$ - und 17β -Dehydrogenierung und verschiedene Hydroxylierungsreaktionen. Unter letzteren sind die 11α -Hydroxylierung, 11β -Hydroxylierung und 16α -Hydroxylierung die aus kommerzieller Sicht bedeutsamsten. Andere Hydroxylierungsstellen scheinen jedoch ebenfalls das Potential zur industriellen Nutzung zu besitzen. Die Steroidhydroxylierung durch Biotransformationen mit natürlichen Mikroorganismen ist also in der Steroid-Industrie weit verbreitet (z.B. bei Schering und Pfizer) und wird seit Jahrzehnten in einem sehr großen Maßstab (hunderte Tonnen pro Jahr) angewandt. In vielen Fällen wurden die mikrobiellen Enzymsysteme, die diese Reaktionen katalysieren, gereinigt und charakterisiert. Soweit heute bekannt ist sind sie alle Cytochrom P450-abhängig (Bureik & Bernhardt, 2007).

Aufgrund des riesigen und weltweit stetig weiter wachsenden Markts für Steroide sind auch Steroidbiotransformationen, die von rekombinanten Mikroorganismen katalysiert werden, von immer größerem Interesse. Biotech-Unternehmen sowie große Pharmakonzerne (wie Roussel Uclaf, Sanofi-Aventis und Schering) treiben die Forschung auf diesem Gebiet schnell voran. Im vergangenen Jahrzehnt wurden bereits riesige wissenschaftliche Fortschritte beispielsweise bei der 11β -Hydroxylierung und der Biosynthese von Steroiden aus Zuckern erzielt (Müller, 1994).

Ganz allgemein lässt sich sagen, dass rekombinante Expressionssysteme eine sinnvolle und wirtschaftliche Alternative darstellen können, wenn für die Steroidsynthese keine entsprechenden natürlichen Mikroorganismen zur Verfügung stehen. Für die Biotransformation eignen sich dabei entweder (teilweise) isolierte Enzyme oder Ganzzell-Systeme. Mühsame Reinigungsschritte, mangelnde langfristige Stabilität der Aktivität und die Verwendung von teurem NADPH oder die fehlende längerfristige Funktion von NADPH-regenerierenden Systemen stellen die größten Probleme der *in vitro*-Anwendungen dar. Der klare Vorteil von Ganzzell-Biotransformationen ist dementsprechend die einfachere Handhabung, da sowohl die Enzymexpression als auch die Kofaktorregenerierung vom Organismus selbst übernommen werden. Daher sind

generell bei technischen Biotransformationen zur Produktion von Feinchemikalien Ganzzell-Anwendungen verbreiteter (Straathof, *et al.*, 2002).

Die technisch relevanten Expressionssysteme für steroidverändernde Enzyme umfassen lediglich genetisch veränderte Bakterien und Hefen. Obwohl Insekten- oder Säugerzellen für wissenschaftliche Untersuchungen von Enzymeigenschaften und für die Inhibitorsuche sehr wertvolle Werkzeuge sind (Sakaki & Inouye, 2000, Bureik, *et al.*, 2002, Hakki & Bernhardt, 2006) können diese Systeme aufgrund ihrer hohen Kosten bei der Kultivierung im Bereich von Biotransformationen im technischen Maßstab nicht mit Mikroorganismen konkurrieren. Die unumstrittenen Vorteile von rekombinanten Bakterien wie *Escherichia coli* sind das schnelle Zellwachstum und die (zumindest prinzipiell) hohen Expressionslevel, was sie zu den am häufigsten in der Industrie verwendeten genetisch veränderten Organismen gemacht hat. Die funktionelle Expression von bestimmten Proteinen, insbesondere membranständiger Proteine, mit *E. coli* kann jedoch auch mit einer Reihe von Schwierigkeiten verbunden sein. In solchen Fällen erwiesen sich Hefen als alternative Expressionssysteme oftmals als sehr erfolgreich. Neben ihren wesentlichen Vorteilen weisen die mikrobiellen Reaktionen jedoch auch Mängel auf. Dazu gehören die Bildung von Nebenprodukten und unbeständige Ausbeuten, die durch biologische Schwankungen aufgrund verschiedener Chargen von Zellen verursacht werden. Dementsprechend könnten ihre Anwendungsmöglichkeiten durch eine Weiterentwicklung der rekombinanten Expressionssysteme und durch neue Ansätze zur Problemlösung noch deutlich erweitert werden.

Vor einigen Jahren wurde die totale Biosynthese von Steroidhormonen wie Progesteron oder Cortisol aus einfachen Kohlenstoffquellen mit genetisch veränderten *S. cerevisiae*-Stämmen erreicht (Duport, *et al.*, 1998, Szczebara, *et al.*, 2003). Dieser Erfolg stellt den gegenwärtigen Höhepunkt der Anwendung von rekombinanten Mikroorganismen in der biotechnologischen Steroidproduktion dar. Die Wissenschaft ist damit nicht länger darauf beschränkt, chemische Reaktionsschritte durch Biotransformationen zu ersetzen, es können auch ganze neue Synthesewege entworfen werden. Die Verwendung von sogenannten Designer-Mikroorganismen zur chemiefreien Steroidproduktion entspricht nicht nur dem neusten Stand der Technik, sondern erfüllt auch die heutigen Anforderungen bezüglich Umweltfreundlichkeit, Ressourcenschonung und Nachhaltigkeit. Daher ist davon auszugehen, dass in den nächsten Jahren genetisch veränderte Mikroorganismen die langjährige Vorherrschaft natürlicher Mikroben in der Steroidindustrie beenden werden.

Die überwältigende Nachfrage der pharmazeutischen Industrie nach Steroiden hat die Verfügbarkeit dieser Substanzen aus natürlichen Quellen seit Jahrzehnten bei weitem überstiegen. Heutzutage stellen Steroide mit einem Weltmarkt von 10 Milliarden US-Dollar einen großen Bereich der pharmazeutischen Industrie dar (Bureik & Bernhardt, 2007). Dementsprechend besteht ein erheblicher Bedarf an chemischen und enzymatischen Prozessen, die regio- und stereospezifische Veränderungen des

Steroidrückgrats ermöglichen. Unter den Enzymen, die bekanntermaßen solche Reaktionen katalysieren, befinden sich einige Mitglieder der Cytochrom-P450 (CYP)- und der Aldo-Keto-Reduktase (AKR)-Enzymfamilien.

1.3 Aldo-Keto-Reduktasen

Steroidhormone liegen entweder in aktiven oder inaktiven Formen vor, wobei diese enzymatisch ineinander umgewandelt werden können (Nobel, *et al.*, 2001). Die aktiven Formen besitzen hohe Affinität gegenüber ihren entsprechenden Rezeptoren, während die inaktiven Formen nur sehr geringe Affinitäten aufweisen. Die Enzyme, welche die verschiedenen Formen ineinander umwandeln, wirken dementsprechend als molekulare Schalter (Nobel, *et al.*, 2001, Penning, 2003). Die an dieser Regulation auf dem prä-Rezeptor-Level beteiligten Enzyme umfassen eine Reihe von konjugierenden Phase II-Enzymen, CYP-Enzyme und Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (Nobel, *et al.*, 2001). Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDs) sind NAD(P)(H)-abhängige Oxidoreduktasen, die regio- und stereospezifisch Ketosteroide zu den entsprechenden sekundären Alkoholen umsetzen. HSDs gehören entweder der *short-chain*-Dehydrogenase/Reduktase (SDR)-Superfamilie oder der Aldo-Keto-Reduktase (AKR)-Superfamilie an (Penning, 2003), wobei die Mehrheit der HSDs zur SDR-Familie gehört (Peltoketo, *et al.*, 1999, Adamski & Jakob, 2001, Mindnich, *et al.*, 2004). SDR-Proteine sind Monomere von 25-35 kDa, die normalerweise als Dimere oder Tetramere wirken und häufig membrangebunden vorliegen (Adamski & Jakob, 2001, Mindnich, *et al.*, 2004). Dagegen sind die AKRs überwiegend monomere, lösliche, cytosolische Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 34 und 37 kDa (Penning, *et al.*, 2000). Die charakteristische Faltung der AKR-Superfamilie ist eine $(\alpha/\beta)_8$ -TIM¹-*barrel*-Struktur mit drei großen angelagerten Schleifen (Abbildung 3). In den ternären Komplexen der AKR-Enzyme binden der Kofaktor und das Substrat/der Inhibitor in zwei verschiedenen Regionen des Proteins und nähern sich im aktiven Zentrum einander an. Die Kofaktor-Bindungsstelle und das aktive Zentrum sind innerhalb der Superfamilie hoch konserviert. Im Gegensatz dazu ist die Struktur der Substrat-Bindungsstelle sehr variabel und wird weitestgehend von den Resten der Schleifen bestimmt.

¹ Triosephosphat-Isomerase. Dieses Enzym gab dem Protein-Sekundärstrukturmotiv TIM-*barrel* seinen Namen.



Abbildung 3: AKR-Struktur. Struktur des ternären Komplexes aus AKR1C2, NADP⁺ und Ursodeoxycholat. Der Kofaktor ist gelb, die Gallensäure rot und die verschiedenen Strukturelemente des Proteins blau, grün, türkis bzw. pink dargestellt (aus Jin & Penning, 2007).

Die AKR-Superfamilie ist von Bakterien bis zum Menschen evolutionär konserviert (Jez, *et al.*, 1997, Hyndman, *et al.*, 2003). Die vorrangige Aufgabe der AKRs ist die Reduktion von Aldehyden und Ketonen zu primären und sekundären Alkoholen (Flynn, 1982, Penning, 2004). Da diese Reaktion zu einer Funktionalisierung führt, die anschließende Konjugationsreaktionen (beispielsweise Sulfatierung oder Glucuronidierung) ermöglicht, können AKRs zu den wirkstoffmetabolisierenden Phase I-Enzymen gezählt werden.

Von der AKR-Superfamilie kennt man bis heute mehr als 150 Mitglieder, die in 15 Familien untergliedert werden (Stand September 2008) (Bohren, *et al.*, 1989, Hyndman, *et al.*, 2003, Penning, 2004). Die Mitglieder der einzelnen Familien besitzen weniger als 40 % Sequenzidentität mit den Mitgliedern anderer Familien, während Proteine mit mehr als 60 % Sequenzübereinstimmung weiter zu einer Unterfamilie zusammengefasst werden. Für die AKRs gibt es dabei eine Standardnomenklatur: nach der Abkürzung AKR steht eine Zahl, welche die Familie bezeichnet, dann ein Buchstabe, der die Unterfamilie benennt und schließlich eine weitere Zahl, die das einzelne Protein innerhalb dieser Unterfamilie kennzeichnet (Jez, *et al.*, 1997, Hyndman, *et al.*, 2003). Die Säuger-AKR gehören zu den AKR1-, AKR6- und AKR7-Familien, wobei die AKR1-Familie die größte der 15 AKR-Familien darstellt. Das *human genome* Projekt (HUGO) identifizierte 13 menschliche AKRs, die in Tabelle 1 aufgeführt werden. Acht der humanen AKRs gehören zur AKR1-Familie, welche die menschlichen Homologe der Aldehyd-Reduktase (AKR1A1), Aldose-Reduktasen (AKR1B1 und AKR1B10), HSDs (AKR1C1-AKR1C4) und Steroid-5 β -Reduktase (AKR1D1) enthält. Andere humane AKRs stellen die menschlichen Homologe der Aflatoxin-Aldehyd-Reduktasen dar (AKR7A2 und AKR7A3). Die humanen β -Untereinheiten der spannungsabhängigen

Kalium-Kanäle der AKR6-Familie gehören zwar ebenfalls zu den menschlichen AKRs, sind jedoch nicht am Fremdstoffmetabolismus beteiligt (Jin & Penning, 2007).

Tabelle 1: Menschliche AKRs, die durch HUGO identifiziert wurden (nach: Jin & Penning, 2007)

Gen	Protein (Synonyme)	Natürliche Substrate und physiologische Funktion
AKR1A1	Aldehyd-Reduktase L-Hexonat-Dehydrogenase	Reduktion vom Aldehyd zum Alkohol (z.B. Glycerinaldehyd zu Glycerin)
AKR1B1	Aldose-Reduktase	Reduktion vom Aldehyd zum Alkohol (z.B. Glucose zu Sorbitol im Polyol-Stoffwechsel)
AKR1B10	(Dünndarm) Aldose-Reduktase	Reduktion vom Aldehyd zum Alkohol (z.B. Retinal zu Retinol)
AKR1C1	20 α -HSD, DD1	Reduktion vom 20-Ketosteroid zum 20 α -Hydroxysteroid (z.B. Progesteronabbau)
AKR1C2	Typ 3 3 α -HSD, DD2, Gallensäure-bindendes Protein	Reduktion vom 3-Ketosteroid zum 3 α -Hydroxysteroid (z.B. 5 α -Dihydrotestosteron-Abbau)
AKR1C3	Typ 2 3 α -HSD, Typ 5 17 β -HSD, Prostaglandin F-Synthase, DDx	Reduktion vom 17-Ketosteroid zum 17 β -Hydroxysteroid (z.B. Bildung von Testosteron und 17 β -Estradiol) Prostaglandin F-Synthase (z.B. Reduktion von PGH ₂ zu PGF _{2α})
AKR1C4	Typ 1 3 α -HSD, DD4, Chlordecon-Reduktase	Reduktion vom 3-Ketosteroid zum 3 α -Hydroxysteroid, hepatischer Steroidabbau, Gallensäuresynthese
AKR1D1	5 β -Reduktase	Reduktion von Δ^4 -3-Ketosteroiden zu 5 β -Dihydrosteroiden, Gallensäuresynthese
AKR6A3	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal, β -Untereinheit 1	Redox-Regulation der <i>Shaker</i> -Kaliumkanal-Inaktivierung
AKR6A5	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal, β -Untereinheit 1	Redox-Regulation der <i>Shaker</i> -Kaliumkanal-Inaktivierung
AKR6A9	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal, β -Untereinheit 1	Redox-Regulation der <i>Shaker</i> -Kaliumkanal-Inaktivierung
AKR7A2	Aflatoxin-Aldehyd-Reduktase	Reduktion vom Aldehyd zum Alkohol
AKR7A3	Aflatoxin-Aldehyd-Reduktase	Reduktion vom Aldehyd zum Alkohol

AKRs katalysieren Reaktionen an einem breiten und überlappenden Substratspektrum. Daher ist es oftmals schwierig, die natürlichen Substrate und physiologischen Funktionen dieser Enzyme zu bestimmen. Die menschlichen AKRs sind in der Lage, verschiedenste Substrate, darunter Medikamente oder deren Metabolite, Karzinogene und reaktive Aldehyde, umzusetzen, wobei sie sowohl für deren Bioaktivierung als auch Entgiftung verantwortlich sein können. Endogene Substrate der menschlichen Enzyme umfassen neben Steroidhormonen unter anderem Zucker- und Lipidaldehyde, Retinale, Prostaglandine und Gallensäurevorstufen (Tabelle 1).

Alle menschlichen AKRs wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und stehen für *in-vitro*-Reaktionen zur Verfügung (Bohren, *et al.*, 1989, Bohren, *et al.*, 1992, Stolz, *et al.*, 1993, Flynn, *et al.*, 1995, McCormack, *et al.*, 1995, Burczynski, *et al.*, 1998, Ireland, *et al.*, 1998, Knight, *et al.*, 1999, Crosas, *et al.*, 2003). Die einzige Ausnahme ist die 5 β -Reduktase AKR1D1, die bislang nur in Säugerzell-Transfektions-Experimenten untersucht wurde (Kondo, *et al.*, 1994).

1.4 AKR1C1

Die vier humanen HSDs, AKR1C1-AKR1C4 weisen trotz ihrer hohen Sequenzidentität (> 84 %) eine weite Substratspezifität auf und sind an einer Vielzahl physiologischer Funktionen beteiligt. Sie wirken *in vitro* in verschiedenem Maße als 3-, 17- und 20-Ketosteroid-Reduktasen sowie als 3 α -, 3 β -, 17 β - und 20 α -Hydroxysteroid-Oxidasen (Penning, *et al.*, 2000, Steckelbroeck, *et al.*, 2004) und katalysieren damit also wie alle AKRs prinzipiell Gleichgewichtsreaktionen. Die AKR1C4 wird als einzige leberspezifisch exprimiert, während AKR1C1-AKR1C3 in unterschiedlicher Menge in Leber, Lunge, Prostata, Milchdrüse, Gebärmutter, Hirn, Dünndarm, Hoden und weiteren Geweben nachgewiesen wurden (Penning, *et al.*, 2000). In intakten Zellen wirken alle AKR1C-Isozyme vorwiegend als Reduktasen, wobei die Oxidationsreaktion durch niedrige Konzentrationen des Kofaktors NAD(P)H eingeschränkt wird (Penning, *et al.*, 2000, Steckelbroeck, *et al.*, 2004). Sie regulieren die Belegung und *trans*-Aktivierung von Androgen-, Estrogen- und Progesteronrezeptoren (Penning, 2003, Bauman, *et al.*, 2004, Steckelbroeck, *et al.*, 2004) und spielen auch bei der Bildung und Inaktivierung von neuroaktivem Allopregnanolon (3 α ,5 α -Tetrahydroprogesteron) eine wichtige Rolle. Letzteres moduliert allosterisch die Aktivität des γ -Aminobuttersäure Typ A (GABA)_A-Rezeptors und hat daher anästhetische, analgetische, anxiolytische und antikonvulsive Effekte (Griffin & Mellon, 1999, Penning, *et al.*, 2000, Nobel, *et al.*, 2001).

Unter den vier humanen 3 α -HSD-Isoformen der AKR1C-Unterfamilie wirkt AKR1C1 überwiegend als 20 α -HSD (Penning, *et al.*, 2000). Es handelt sich um ein cytosolisches Enzym von 323 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 36,7 kDa, das vorwiegend in der Leber exprimiert wird. Bei der AKR1C1-abhängigen Reduktion von Ketosteroiden kann sowohl NADPH als auch NADH als Kofaktor dienen, wobei NADPH anscheinend als Reduktionsäquivalent bevorzugt wird (Zhang, *et al.*, 2000). Obwohl es sich bei HSD-Wirkungen theoretisch um Gleichgewichtsreaktionen handelt ist die Oxidase-Wirkung der humanen 20 α -HSD *in vivo* offenbar vernachlässigbar (Zhang, *et al.*, 2000). Die physiologische Funktion der AKR1C1 besteht überwiegend in der Regulation des Progesteronspiegels, indem sie die regio- und stereoselektive Reduktion von Progesteron zum inaktiven Progestin 20 α -Dihydroprogesteron (20 α -DHP, auch 20 α -Hydroxyprogesteron genannt) katalysiert (Zhang, *et al.*, 2000). Diese

Reaktion ist in Abbildung 4 gezeigt. Die AKR1C1 reduziert aber auch neuroaktive Steroide ($3\alpha,5\alpha$ -Tetrahydroprogesteron und 5α -Tetrahydrodeoxycorticosteron) zu den entsprechenden 20α -Hydroxysteroiden, die eine niedrige Affinität zum GABA_A-Rezeptor aufweisen und entfernt sie so aus dem Signalweg (Lambert, *et al.*, 1995, Nobel, *et al.*, 2001). Damit spielt AKR1C1 auch im Gehirn eine wichtige Rolle.

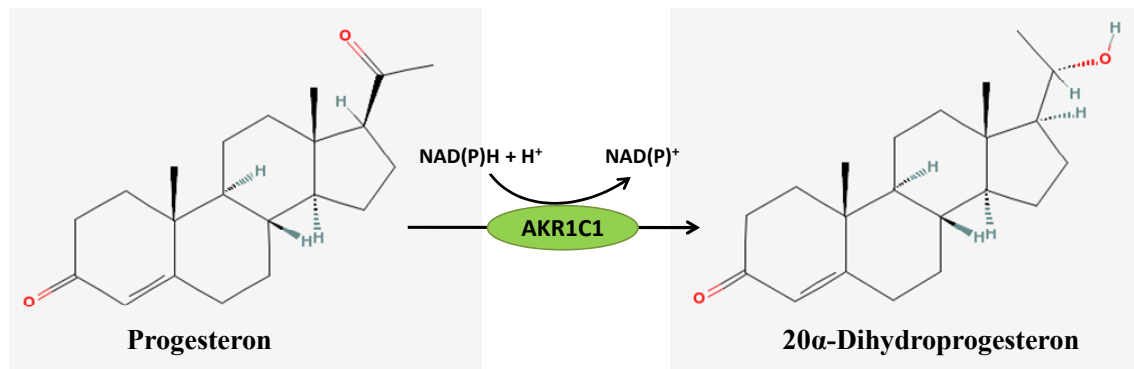


Abbildung 4: Umsatz von Progesteron zu 20α-Dihydroprogesteron.

Der physiologische Progesteronabbau durch AKR1C1 bewirkt im Laufe des weiblichen Zyklus den Abbau der Gebärmutter Schleimhaut (Menstruation). Wenn eine Befruchtung stattgefunden hat ist Progesteron für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft unerlässlich. Die AKR1C1-abhängige Senkung des Progesteronspiegels am Ende der Schwangerschaft steht im Zusammenhang mit der Einleitung der Wehentätigkeit und der Geburt. Daher ist eine pathophysiologisch erhöhte AKR1C1-Aktivität und der dadurch verstärkte Umsatz von Progesteron zum inaktiven Metaboliten 20α-DHP verbunden mit Frühgeburten, die Kindsmorbidität und -sterblichkeit zur Folge haben können (Lewis, *et al.*, 2004, Piekorz, *et al.*, 2005). Außerdem führt eine erhöhte Aktivität der AKR1C1 im Endometrium und im Brustgewebe zur Bildung von tumorfördernden Metaboliten und zur Entwicklung von Endometriose, Endometrialkrebs und Brustkrebs (Wiebe, 2005, Wiebe, *et al.*, 2005, Rizner, *et al.*, 2006). Die Eliminierung der neuroaktiven Steroide durch die AKR1C1 ist verbunden mit Symptomen des prämenstruellen Syndroms (PMS) und anderen neurologischen und psychischen Funktionsstörungen, wie katamenialen Epilepsien oder Depressionen (Lambert, *et al.*, 1995, Griffin, *et al.*, 2001, Nobel, *et al.*, 2001). Dementsprechend stellt dieses Enzym auch ein wichtiges Medikationsziel dar und es ist von enormem Interesse, selektive und wirkungsvolle Inhibitoren der AKR1C1 zu identifizieren, die dazu beitragen könnten, einem überhöhten Progesteronmetabolismus vorzubeugen bzw. entgegenzuwirken (Penning, 1997, Penning, 2003, Penning, *et al.*, 2004).

Aufgrund ihres großen Substratspektrums und ihrer hohen Regio- und Stereospezifität bieten sich HSDs generell als Enzymgruppe bei der Entwicklung neuer biotechnologischer Synthesewege für die Steroidproduktion an. Bisher stand in diesem Feld hauptsächlich die Steroidhydroxylierung durch CYPs im Mittelpunkt des Interesses und

ist dementsprechend weit entwickelt. Obwohl auch HSDs eine sehr erfolgversprechende Enzymgruppe zur Ausführung spezifischer Veränderungen am Steroidrückgrat darstellen, werden diese gegenwärtig noch nicht im industriellen Maßstab biotechnologisch eingesetzt. Die humane 20α -HSD AKR1C1 katalysiert im Gegensatz zu anderen humanen HSDs bevorzugt die Reduktion von 20-Ketosteroiden zum entsprechenden 20α -Hydroxysteroid und bildet dabei nur wenige Nebenprodukte wie 3α -, 3β -, 17β -Hydroxysteroid. Diese Eigenschaften machen sie zum Enzym der Wahl für die gezielte Reduktion der 20-Ketogruppe von Progesteron oder Progesteron-Derivaten.

1.5 *Schizosaccharomyces pombe* als biotechnologisches Modellsystem

Obwohl der gegenwärtige Stand der Hefe-Expressionstechnologie weitreichende Möglichkeiten zur Produktion pharmakologischer Proteine und einer Vielzahl industriell relevanter Enzyme eröffnet und genetisch veränderte Hefen in zunehmendem Maße zur industriellen Produktion von Steroiden eingesetzt werden, ist die Verwendung von *S. pombe* zu diesem Zweck bisher nur sehr selten beschrieben. Dabei weist diese Hefe eine Reihe von Eigenschaften auf, die sie als Expressionssystem äußerst interessant machen.

Im wissenschaftlichen Bereich ist *S. pombe* ein bewährtes Modell zur Untersuchung der Genfunktion und -regulation höherer Eukaryoten. Aufgrund der jahrzehntelangen Grundlagenforschung stehen umfangreiche molekularbiologische und genetische Instrumente für diesen Organismus zur Verfügung (Moreno, *et al.*, 1991, Alfa, *et al.*, 1993). Das Genom von *S. pombe* ist komplett sequenziert (Wood, *et al.*, 2002) und DNA-Mikroarray-, Proteom- und Transkriptomanalysen wurden durchgeführt (Takegawa, *et al.*, 2009). Unter den Hefen wird *S. pombe* in verschiedenen Eigenschaften, wie Zellzyklusregulation, Transkriptionsregulation, chromosomaler Organisation und RNA-*Splicing* im Vergleich zu anderen Hefen, als näher verwandt zu höheren Eukaryoten angesehen (Kaufer, *et al.*, 1985, Russell & Nurse, 1986, Jones, *et al.*, 1988, Remacle, *et al.*, 1997, Brys, *et al.*, 1998). Posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, Phosphorylierung und Acetylierung von in *S. pombe* hergestellten Proteinen sind offensichtlich denen in Säugerzellen ähnlich (Russell & Nurse, 1986, Chappell & Warren, 1989, Moreno, *et al.*, 1990, Giga-Hama, *et al.*, 1994). Die Spaltheefe wird daher zunehmend als verlässlicher Modellorganismus zur Expression und funktionellen Charakterisierung von Säugerproteinen verwendet und hat sich dabei bereits als sehr erfolgreich erwiesen (Giga-Hama & Kumagai, 1997). Auch industriell relevante Fremdproteine und solche, die mit anderen Mikroorganismen nicht funktionell exprimiert werden können, wurden erfolgreich exprimiert (Takegawa, *et al.*, 2009). Diese Fähigkeit ist ein entscheidender Vorteil gegenüber den weit verbreiteten prokaryotischen Expressionssystemen, bei denen rekombinante Proteine aufgrund von

Fehlfaltungen oder fehlender eukaryotischer posttranslationaler Modifikationen häufig keine Funktion zeigen. Expressionsvektoren, mit denen hohe Expressionsraten rekombinanter Proteine erreicht werden, sind für die Spaltheefe entwickelt (Maundrell, 1993, Giga-Hama, *et al.*, 1994). Außerdem besitzt *S. pombe* den GRAS-Status (*generally regarded as safe*).

Rekombinante Spaltheefe-Systeme sind hervorragend zur Biotransformation von Steroiden (Bernhardt, 2006) geeignet. Es wurde bereits eine Reihe von steroidverändernden Ganzzell-Biotransformationsreaktionen unter Verwendung von Spaltheferstämmen beschrieben, die humane CYPs, darunter CYP11B1 (Bureik, *et al.*, 2004, Dragan, *et al.*, 2005), CYP11B2 (Bureik, *et al.*, 2002), CYP17 (Dragan, *et al.*, 2006) sowie CYP21 (Dragan, *et al.*, 2006), rekombinant exprimieren. Außerdem wurde diese Hefe bereits mehrfach zur biotechnologischen Produktion von Wirkstoffmetaboliten eingesetzt (Peters, *et al.*, 2007, Peters, *et al.*, 2009, Peters, *et al.*, 2009). Zudem sind spezielle Hoch-Zelldichte-Fermentationen bereits etabliert (Jansen, *et al.*, 2006, Zhang, *et al.*, 2007). Darüberhinaus können rekombinante *S. pombe*-Zellen zur Inhibitor-Testung eingesetzt werden (Ehmer, *et al.*, 2002, Bureik, *et al.*, 2004, Dragan, *et al.*, 2006). Aus patentrechtlicher Sicht ist *S. pombe* zum Aufbau neuer biotechnologischer Prozesse oftmals anderen industriell relevanten Hefen wie *S. cerevisiae* oder *Pichia pastoris* durch ihre weitreichende technologische Patentfreiheit überlegen. Damit stellt *S. pombe* eine wertvolle Alternative zu den gängigen rekombinanten Expressionssystemen dar. Die Verwendung von *S. pombe* in technologisch wichtigen Prozessen hat noch lange nicht ihre Grenzen erreicht und könnte mittelfristig dazu beitragen, Abhilfe bei der Überwindung des Engpasses in der Herstellung von Steroidhormonen zu schaffen.

1.6 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Möglichkeit der biotechnologischen Nutzung von heterolog in der Spaltheefe *S. pombe* exprimierten AKRs zur Steroidsynthese und -modifizierung zu untersuchen. Damit könnte einerseits das Repertoire an steroidverändernden Enzymen, die potentiell für die industrielle Anwendung relevant sind, erweitert werden. Andererseits könnte ein weiteres Einsatzgebiet von rekombinanten *S. pombe*-Zellen über die bereits etablierte Proteinherstellung und CYP-abhängige (Steroid-)Metabolitenproduktion hinaus erschlossen werden. Dazu sollte ein Spaltheefe-basierter Ganzzell-Biotransformationsprozess aufgebaut werden, der den effizienten Umsatz von Progesteron und Dydrogesteron zu den jeweiligen 20 α -Hydroxysteroiden ermöglicht. Dieser sollte im technischen Maßstab und mit einer Raum-Zeit-Ausbeute, die einen ökonomisch sinnvollen Betrieb erlaubt, anwendbar sein. Als Enzym für diese Reaktion wurde die humane 20 α -HSD AKR1C1 ausgewählt, da sie vorwiegend die regio- und stereoselektive Reduktion von Progesteron zu 20 α -DHP katalysiert.

Um das genannte Ziel zu erreichen sollten Expressionsplasmide für die Expression der AKR1C1 in *S. pombe* konstruiert werden. Diese Expressionskonstrukte sollten in Spalthezellen transformiert werden, worauf der entsprechende Expressions- und Funktionsnachweis anhand der Progesteron-Reduktion folgen sollte. Danach sollte das Substratspektrum des Expressionssystems näher untersucht und festgestellt werden, ob auch Dihydrogesteron ein Substrat für die heterolog in *S. pombe* exprimierte AKR1C1 darstellt. Weiterhin sollte unter verschiedenen molekularbiologisch optimierten Produktionsstämmen derjenige identifiziert werden, der die gewünschte Reaktion möglichst effizient ausführt. Abschließend sollte der biotechnologische Produktionsprozess für 20 α -DHP und 20 α -DHD aufgebaut und hinsichtlich hoher Produktausbeute optimiert und beide Substanzen im Gramm-Maßstab hergestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden sind die wichtigsten der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Arbeitsmaterialien aufgeführt. Die verwendete cDNA der humanen AKR1C1 wurde von der Entelechon GmbH (Regensburg) synthetisiert und lag im pCR4-TOPO-Vektor vor (siehe auch Anhang A). Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Labormaterialien und Geräte befindet sich im Anhang.

2.1.1 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonucleasen *Bam*HI, *Nde*I und *Not*I sowie die T4-DNA-Ligase wurden von der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen.

2.1.2 Kits

Plasmidpräparation NucleoBond® AX 100-Kit	Macherey-Nagel (Düren; Best.-Nr. 740573.100)
Plasmidpräparation NucleoSpin® Plasmid-Kit	Macherey-Nagel (Best.-Nr. 7405882450)

2.1.3 Steroide

Progesteron	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Pregnenolon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
17 α -Hydroxyprogesteron	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
11-Deoxycorticosteron	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Aldosteron	Acros Organics (Geel, Belgien)
Corticosteron	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Cortisol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
11-Deoxycortisol	Acros Organics (Geel, Belgien)
Dydrogesteron	wurde von Solvay Pharmaceuticals (Hannover) zur Verfügung gestellt

2.1.4 Sonstige Reagenzien

β -Cyclodextrin

BioChemica (Melbourne, USA)

2.1.5 Vektoren und Plasmide

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Spalthefe-Expressionsvektoren handelt es sich um *Shuttle*-Vektoren. Hefe-*Shuttle*-Vektoren enthalten Komponenten, die das Replizieren und die Selektion sowohl in *E. coli*-Zellen als auch in Hefezellen ermöglichen. Die *E. coli*-Komponente der Hefe-*Shuttle*-Vektoren beinhaltet einen Replikationsursprung und eine cDNA für β -Lactamase (AmpR). Die Hefekomponente dieser *Shuttle*-Vektoren weist außer im Falle von pCAD1 eine autonom replizierende Sequenz (*ars1*) und einen Hefe-Selektionsmarker auf. Alle verwendeten Vektoren ermöglichen eine starke Proteinexpression unter der Kontrolle des thiaminregulierbaren *nmt1*-Promotors (*nmt* steht für *no message in thiamine*) (Maundrell, 1990).

Der Integrationsvektor **pCAD1** (Dragan, *et al.*, 2005) ist ein Derivat des pINT5-Vektors (Bureik, *et al.*, 1997). Er enthält Genfragmente des *leu1*-Gens, das im Chromosom II der Spalthefe als Integrationszielsequenz dient, sowie das *ura4*-Gen, das die Mutation *ura4.d118* in *S. pombe* komplementiert. Für die Transformation von Spalthefe wird pCAD1 mit *NotI* verdaut, um das Integrationskonstrukt mit flankierenden *leu1*-Sequenzen zu erzeugen. Bei der Restriktion entsteht neben dem Integrationsfragment, welches die Expressionskassette und den *ura4*-Marker enthält, ein 2,0-kb-Fragment, das die pUC-abgeleiteten Sequenzen (*E. coli*-Komponente) beinhaltet. Darüberhinaus kann durch die Verwendung von pCAD1 ein beliebiges Protein mit zwei carboxyterminalen Epitopen, und zwar einem Hexahistidin- beziehungsweise einem Pk-Epitop exprimiert werden (Craven, *et al.*, 1998).

Der Spalthefe-Expressionsvektor **pREP1** (Maundrell, 1993) enthält als Selektionsmarker das *LEU2*-Gen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, ein Gen, das für ein an der Leucin-Synthese beteiligtes Enzym codiert und den *leu1.32* Gendefekt in der Spalthefe komplementiert.

Ein weiterer im Rahmen dieser Arbeit verwendeter Spalthefe-Expressionsvektor ist **pREP1ura**. Er leitet sich von pREP42GFP-C (Craven, *et al.*, 1998) ab. Die gesamte Expressionskassette inklusive Promotor und Terminator wurde jedoch durch die entsprechenden Sequenzen aus pREP1 ersetzt, die anstelle des mittelstarken *nmt41*-Promotors den starken *nmt1*-Promotor beinhalten. pREP1ura enthält außerdem anstelle des *LEU2*-Gens der Bäckerhefe das *S. pombe*-eigene *ura4*-Gen für die Orotidinmonophosphatdecarboxylase, welches zur positiven Selektion eingesetzt werden kann, da es den Gendefekt *ura4.d118* in der Spalthefe komplementiert.

Der vierte hier verwendete Spalthefe-Expressionsvektor **pMWIK2** (Drăgan *et al.*, unveröffentlicht) enthält das *his3*-Gen von *S. pombe* als Selektionsmarker und

komplementiert damit den *his3.Δ1*-Gendefekt in der Spalthefe. Er leitet sich ursprünglich von pBG1 (Burke & Gould, 1994) ab, welcher seinerseits auf pTZ19R (Mead, *et al.*, 1986) zurückgeht. Mittels *NdeI/BamHI*-Klonierung kann ein beliebiges Gen eingesetzt werden, welches dann unter der Kontrolle des *nmt1*-Promotors exprimiert wird.

Die Expressionsplasmide, die aus der Klonierung der humanen AKR1C1 in jeden der oben beschriebenen Expressionsvektoren resultierten, sind in Abbildung 5 grafisch dargestellt.

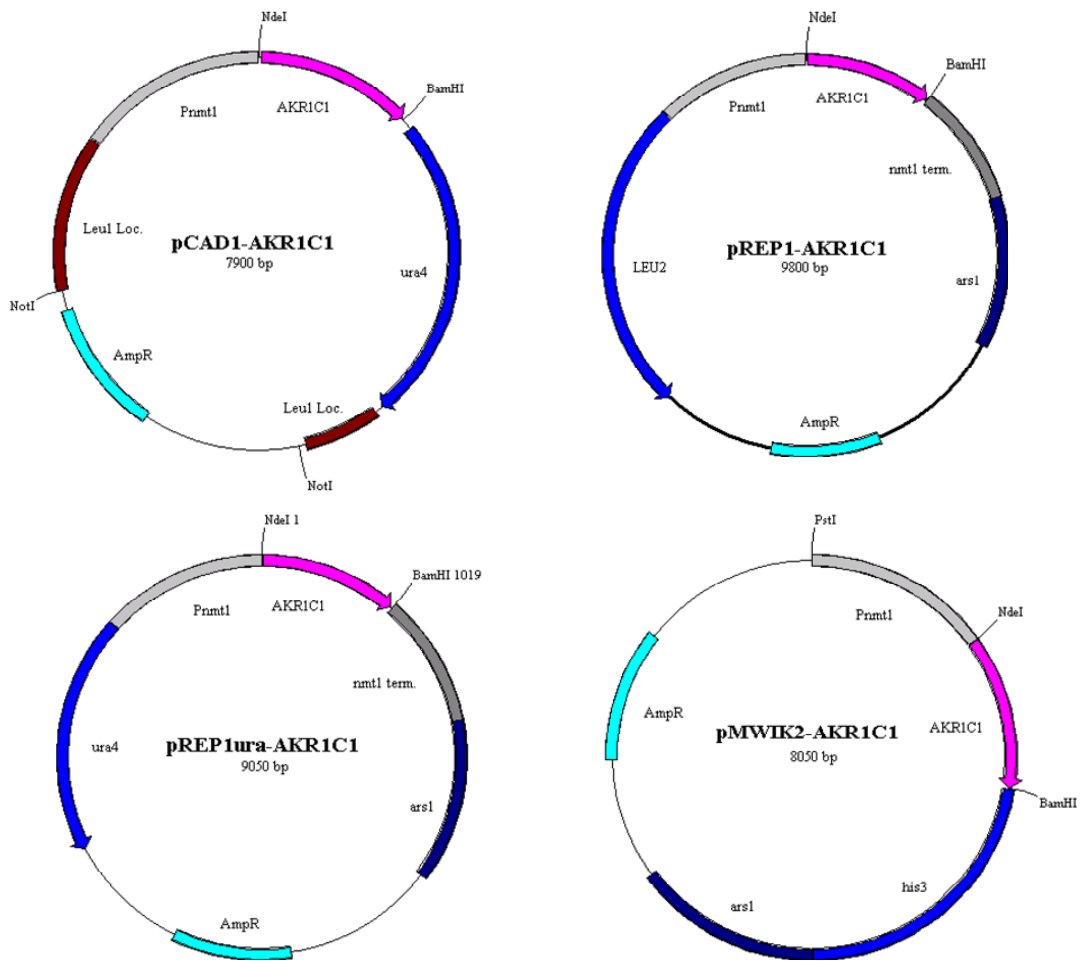


Abbildung 5: Plasmidkarten von pCAD1-AKR1C1, pREP1-AKR1C1, pREP1ura-AKR1C1 und pMWIK2-AKR1C1. Referenz für pCAD1-AKR1C1 und pREP1-AKR1C1 ist diese Arbeit, für pREP1ura-AKR1C1 und pMWIK2-AKR1C1 Drăgan, *et al.*, unveröffentlicht. Pnmt1 = *nmt1*-Promotor; nmt1 term. = *nmt1*-Terminator; ars1 = autonom replizierende Sequenz; ura4, his3 bzw. LEU2 = Selektionsmarkergene; Leu1 Loc. = Genfragmente des *leu1*-Gens; AmpR = Ampicillinresistenzgen.

2.1.6 Mikroorganismen

Die heterologe Expression der humanen AKR1C1 wurde in den in Tabelle 2 aufgeführten Hefe-Stämmen durchgeführt.

Tabelle 2: Verwendete *Schizosaccharomyces pombe*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
NCYC2036	<i>h⁻ ura4.dl18</i>	Losson & Lacroute, 1983
NCYC1913	<i>h⁻ leu1.32</i>	Kohli, <i>et al.</i> , 1977
ATCC96115	<i>h⁻ ade6.M210 leu1.32 ura4.dl18 his3.Δ1</i>	Burke & Gould, 1994
JMN7	<i>h⁻ ura4.dl18 leu1::pCAD1-AKR1C1</i>	diese Arbeit
JMN8	<i>h⁻ leu1.32/pREP1-AKR1C1</i>	diese Arbeit
JMN9	<i>h⁻ ura4.dl18 leu1::pCAD1-AKR1C1/pREP1-AKR1C1</i>	diese Arbeit
CAD300	<i>h⁻ ade6.M210 his3.Δ1/pREP1-AKR1C1 pREP1ura-AKR1C1</i>	Drăgan, <i>et al.</i> , unveröffentlicht
CAD302	<i>h⁻ ade6.M210/pREP1-AKR1C1 pREP1ura-AKR1C1 pMWIK2-AKR1C1</i>	Drăgan, <i>et al.</i> , unveröffentlicht

Für Standard-Klonierungsarbeiten wurde in der vorliegenden Arbeit der *E. coli*-Stamm TOP10F' One Shot[®] (Genotyp F' {*lacI^q* Tn10 (Tet^R)} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*) der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Best.-Nr. C4040-10) verwendet.

2.1.7 Sequenzierprimer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer für die Sequenzierung von Expressionskonstrukten wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert und sind in der nachstehenden Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Eingesetzte Sequenzierprimer

Bezeichnung	Orientierung	Nucleotidsequenz
pNMT fwd	vorwärts	5'-ttt caa tct cat tct cac ttt ctg a-3'
pINT5ura4 rev	rückwärts	5'-aga tta aat aat cta tac-3'
NMTT1 rev	rückwärts	5'-agt act cgt tgt cgg aga tca-3'

2.1.8 Molekulargewichtsmarker

Der Molekulargewichtsmarker „Smart Ladder“ der Eurogentec Deutschland GmbH (Köln; Best.-Nr. MW-1700-10) dient zur Kontrolle der Größe von DNA-Fragmenten. Außerdem können mit diesem Standard halbquantitative Aussagen über die aufgetragene DNA-Menge getroffen werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Hefemethoden

2.2.1.1 Nährmedien für *Schizosaccharomyces pombe*

Edinburgh Minimal Medium (EMM):	NH ₄ Cl	5 g
	Kaliumhydrogenphthalat	3 g
	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	2,2 g
	Glucose · H ₂ O	22 g
	Salzstammlösung	20 ml
	Vitaminstammlösung	1 ml
	Mineralstammlösung	0,1 ml
	dH ₂ O	ad 1 l
Danielas Medium 1 (DM1):	NH ₄ Cl	5 g
	KH ₂ PO ₄	6 g
	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	2,2 g
	Salzstammlösung	20 ml
	Vitaminstammlösung	1 ml
	Mineralstammlösung	0,1 ml
	dH ₂ O	ad 1 l
<i>feed</i> -Medium 1 (FM1):	Glucose · H ₂ O	165 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
	KH ₂ PO ₄	5 g
	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1 g
	MgSO ₄	4 g
	Salzstammlösung	20 ml
	Vitaminstammlösung	1 ml
	Mineralstammlösung	0,1 ml
dH ₂ O	ad 1 l	

Die Glucose wird getrennt autoklaviert und nachträglich zugegeben.

Salzstammlösung (50 x):	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	52,5 g
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,74 g
	KCl	50 g
	Na ₂ SO ₄	2 g
	dH ₂ O	ad 1 l
Mineralstammlösung (10 000 x):	H ₃ BO ₃	5 g
	MnSO ₄	4 g
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	4 g
	FeCl ₃ · 6 H ₂ O	2 g
	MoO ₄ · 2 H ₂ O	1,6 g
	KI	1 g
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,4 g
	Zitronensäure	10 g
	dH ₂ O	ad 1 l
Vitaminstammlösung (1000 x):	Nikotinat	10 g
	Inositol	10 g
	Biotin	10 mg
	Pantothenat	1 g
	dH ₂ O	ad 1 l

Die Nährmedien und Lösungen werden durch Autoklavieren sterilisiert. Die Lagerung der Flüssigmedien erfolgt bei Raumtemperatur.

Für Selektionsmedien werden je nach verwendetem Spalthefestamm nachträglich folgende Zusatzlösungen hinzugefügt:

- Leucin (leu)
- Uracil (ura)
- Histidin (his)
- Adenin (ade)

Die Arbeitskonzentration dieser Zusätze beträgt jeweils 0,1 g/l. Für diese sogenannten Auxotrophiemarkerlösungen werden wässrige Stammlösungen der Konzentration 10 g/l angesetzt. Nach Bedarf wird die Löslichkeit mit konzentrierter HCl oder NaOH verbessert. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

Zum Zubereiten von Kulturplatten wird EMM mit 2 % Agar im Mikrowellenherd aufgekocht. Dann werden die entsprechenden Zusätze zur Selektion sowie gegebenenfalls 5 µM Thiamin nach dem Abkühlen auf etwa 55 °C zugegeben. Die

frisch gegossenen Platten erkalten unter der Sterilbank und werden dann bei 4 °C gelagert.

Bei Versuchen, in denen die Expression der AKR1C1 unterdrückt werden soll, kann durch Zugabe von Thiamin zum Kulturmedium in einer Endkonzentration von 5 µM der *nmt1*-Promotor abgeschaltet werden.

Thiamin-Stammlösung: Thiamin-HCl 5 mM in dH₂O

2.2.1.2 Kultivierung von *S. pombe*

Das Animpfen von Kulturplatten mit Zellmaterial erfolgt mittels einer Impföse. Die beimpften Platten werden bei einer Temperatur von 30 °C über einen Zeitraum von 3 Tagen im Brutschrank inkubiert.

Um eine Vorkultur eines Hefestamms zu erhalten werden 10 ml EMM mit den jeweils nötigen Auxotrophiemarkerlösungen versehen und mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte beimpft. Diese Kultur wird dann über Nacht bei 30 °C im Rotationsschüttler inkubiert, so dass die Zellen die stationäre Wachstumsphase erreichen.

Für eine Hauptkultur wird die benötigte Menge EMM (üblicherweise 100 - 400 ml) mit allen nötigen Zusätzen versehen und mit 1/10 Volumenteil der eingesetzten EMM-Menge einer Vorkultur beimpft. Diese Kultur wird so lange bei 30 °C und 150 Upm im Rotationsschüttler inkubiert, wie es das jeweilige Experiment verlangt. Die Zellzählung erfolgt mittels eines Hämocytometers.

2.2.1.3 Spalthegeglycerolkulturen

Zur langfristigen Lagerung werden von allen Spalthefestämmen Glycerolkulturen angelegt. Dazu werden Zellen aus einem Milliliter einer Kultur des jeweiligen Stamms im gleichen Volumen sterilem 2 x YEA + 25 % Glycerol-Medium aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die Kulturen werden dann bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.1.4 Herstellung chemisch kompetenter *S. pombe*-Zellen

Die Herstellung von chemisch kompetenten *S. pombe*-Zellen stützt sich auf die Anleitung von Suga und Hatakeyama (Suga & Hatakeyama, 2005). Zum Ansetzen einer Vorkultur werden einige frische Hefekolonien in 10 ml SLD-Medium überführt und über Nacht bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wird eine 100 ml-Hauptkultur angeimpft. Diese wird ebenfalls über Nacht bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Die Zellzahl der Kultur wird bestimmt; sie sollte bei mindestens 10⁷ Zellen/ml liegen. Die Kultur wird für 15 min auf Eis inkubiert und danach für 5 min bei 16000 g und 4 °C abzentrifugiert. Das Sediment wird dreimal mit je 10 ml eiskaltem dH₂O gewaschen und wie zuvor abzentrifugiert. Die Zellen werden in 1 ml kaltem LiAc/Glycerin gelöst und für 30 min auf Eis inkubiert. Aliquots der Zellsuspension zu je 50 µl werden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C gelagert.

LiAc/Glycerin, pH 4,9	30 % Glycerin (v/v) 0,1 M Lithiumacetat
SLD-Medium	0,67 % <i>bacto yeast nitrogen base</i> 0,5 % Glucose

2.2.1.5 Hefetransformation

Das Einschleusen von DNA in einen kompetenten Mikroorganismus bezeichnet man als Transformation. Die hier verwendete Lithiumacetat-Methode stützt sich auf die Eigenschaft der Alkaliionen, die Zellwand porös zu machen. Die Durchführung dieser Methode orientiert sich ebenfalls an der Vorschrift von Suga und Hatakeyama (Suga & Hatakeyama, 2005).

Bei der Transformation von Hefezellen werden die Zellen für 2 min bei 37 °C aufgetaut, worauf die Zugabe von 5 µl Träger-DNA (aus Lachssperma, 10 mg/ml), 2 µl Plasmid-DNA sowie 145 µl PEG 4000 (50 %) folgt. Der gemischte Ansatz wird dann für 15 min einer Hitzeschock-Behandlung bei 42 °C unterzogen. Danach werden die Ansätze für 5 min mit 3000 g bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Das Sediment wird in 300 µl dH₂O resuspendiert und die Zellen werden auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert. Die Platten werden anschließend bis zum Erscheinen von Klonen im Wärmeschrank bei 30 °C inkubiert.

2.2.1.6 Wachstumsversuche

Wachstumsversuche dienen in erster Linie der Bestimmung der spezifischen Wachstumsratenkonstanten μ von Spaltheferstämmen unter verschiedenen Bedingungen. Darüberhinaus können Proben, die in der stationären Phase entnommen werden, zur Bestimmung der Biomassekapazität des Systems K herangezogen werden. Außerdem kann ein Wachstumsversuch auch dazu dienen, die Reaktion der Stämme auf veränderte Umweltbedingungen (z.B. Temperaturveränderungen, pH-Änderungen, Substrateinfluss) zu untersuchen. Derartige Versuche können aber auch dazu verwendet werden, den Einfluss von sekundären physikalischen, chemischen oder biologischen Parametern zu bestimmen. Beispiele hierfür sind die Konzentration von Medienkomponenten wie Glucose oder enzymespezifische Produkte, pH-Wert, der Zell-Phänotyp, Proteinexpression usw.

Mikrobielles Wachstum kann durch ein 4-Phasen-Modell beschrieben werden: Anlaufphase, exponentielle Phase, stationäre Phase und Absterbephase. Die Anlaufphase zeichnet sich durch das Ansteigen von μ auf den entsprechenden Wert der exponentiellen Phase aus, während am Übergang von exponentieller zu stationärer Wachstumsphase μ gegen 0 strebt. Charakteristisch für die stationäre Phase ist, dass die Zelldichte die Kapazität des Systems erreicht hat. In der Absterbephase nimmt letztlich

die Lebensfähigkeit der Zellen ab. Normalerweise ist die Zeitabhängigkeit der Biomassedichte mehr oder weniger vergleichbar mit der Darstellung in Abbildung 6.

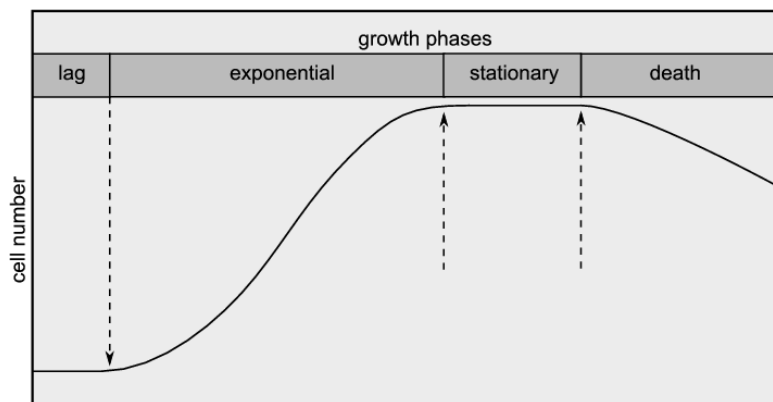


Abbildung 6: Idealierte Darstellung der vier Phasen des mikrobiellen Wachstums (growth phases): Anlauf(lag)-Phase, exponentielle (exponential) und stationäre (stationary) Wachstumsphase sowie Absterbe(death)-Phase. Der dargestellte Messparameter ist die Zellzahl (cell number).

Das Zellwachstum kann dabei durch folgende Formel beschrieben werden:

$$(1) \quad y(x) = \frac{K * y_0}{y_0 + (K - y_0) * e^{-\mu x}}$$

Die Biomasse zu Beginn des Tests (y_0) steigt zunächst exponentiell an, um dann in die stationäre Phase überzugehen. In dieser Formel stehen K für die Kapazität des Systems in g/l und x für die Zeit in Stunden. Die charakteristische Wachstumskonstante μ beschreibt die Zunahme der Trockenbiomasse pro Stunde. Die Generationszeit eines Hefestammes t_g kann über folgende Formel aus μ berechnet werden:

$$(2) \quad t_g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsexperimenten wird die Trockenbiomasse im Kulturvolumen als Messparameter herangezogen. Wenn nicht anders angegeben, werden 10 ml-Vorkulturen der zu charakterisierenden Spaltheferstämmen angesetzt und über 24 h bei 30 °C im Rotationsschüttler (150 Upm) inkubiert. Am nächsten Tag wird die Vorkultur abzentrifugiert (3000 g, 5 min, 4 °C) und in 10 ml frischem EMM aufgenommen. Damit wird nun eine 100 ml-Kultur beimpft und die Probe zum Anfangszeitpunkt t_0 genommen. Die Wachstumskulturen werden dann für 72 h weiter wie zuvor inkubiert. Nach der Anlaufphase, die in der Regel etwa 3 bis 5 h andauert, werden regelmäßig etwa alle 2 h Proben entnommen. Deren Trockenbiomasse wird bestimmt, indem 2 ml Probenvolumen in vorher eingewogenen Eppendorf-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert werden (5000 g, 5 min, RT), der Kulturüberstand verworfen und die verbleibenden Zellen über 48 h bei 60 °C

getrocknet werden. Die Differenz der Probengefäßmassen mit Zellen und der Masse der leeren Gefäße multipliziert mit dem Faktor 500 ergibt die Trockenbiomasse in g/l. Alle Wachstumsexperimente werden, wenn nicht anders vermerkt, dreimal unabhängig, jeweils mit der Bestimmung von Doppelwerten durchgeführt und die erhaltenen Daten gemittelt. Die spezifische Wachstumsrate μ und die Biomassekapazität des Systems K wurden softwaregestützt durch Kleinstquadrat-Approximation mit Hilfe des Programms Gnuplot errechnet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Nährmedien für *E. coli*

Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani) Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)

LB-Agar: LB-Medium + 2 % Agar

Zur Selektion wird den Medien Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

SOC-Medium:	Bacto-Trypton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	0,58 g
	KCl	0,186 g
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	2,03 g
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2,46 g
	Glucose	3,6 g
	dH ₂ O	1 l

2.2.2.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht der Bakterien erfolgt in LB-Medium. Flüssigkulturen werden mit einer Frequenz von 150 Upm im Rotationsschüttler bei 30 °C inkubiert. Agarplatten werden bei 37 °C bebrütet. Die Inkubationsdauer beträgt 12-16 h.

2.2.2.3 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonucleasen

Den Vorgang, bei dem doppelsträngige DNA mit Hilfe spezieller Enzyme sequenzspezifisch gespalten wird, bezeichnet man als Restriktionsverdau. Diese Reaktion wird von sogenannten Restriktionsendonucleasen katalysiert; diese sind bakterielle Enzyme, die *in vivo* Fremd-DNA abbauen.

Ein standardisierter Restriktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

Restriktionspuffer (10 x; wird vom Hersteller 3 µl
des Restriktionsenzym mitgeliefert)

BSA (20 mg/ml)	1 μ l
DNA	1 μ g (für analytische Verdaus) bzw. 5 μ g (für präparative Verdaus)
Restriktionsenzym	0,5 μ l
dH ₂ O	<i>ad</i> 30 μ l

Der analytische Verdau erfolgt mindestens für 2 h bei 37 °C; bei längeren Reaktionszeiten werden häufig bessere Ergebnisse erzielt, sofern kein unspezifischer DNA-Verdau (Star-Aktivität) zu befürchten ist. Der präparative Verdau erfolgt für 16 bis 20 h über Nacht.

2.2.2.4 Agarosegel-Elektrophorese

Diese Technik wird eingesetzt, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe zu trennen. In einem elektrischen Feld wandern die DNA-Fragmente in Richtung Anode. Als elektrisch neutrale Matrix wird ein Agarosegel benutzt, dessen Porosität mit dem Agarosegehalt variiert. Kleineren DNA-Fragmenten erlaubt dieses poröse Netzwerk im Verhältnis zu größeren Fragmenten eine schnellere Passage durch das Gel; effektiv bedeutet dies eine Auftrennung des DNA-Gemischs nach der Größe.

Zur Herstellung des Agarosegels wird 1 % Agarose in 0,5 x TBE-Puffer gelöst. Hierfür erhitzt man die Lösung bis sie klar wird. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgt mittels Ethidiumbromid, einer aromatischen Verbindung, die in die DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert. Das Ethidiumbromid wird der warmen Agaroselösung in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml zugegeben, bevor man diese in eine Gelkammer gießt und zur Erzeugung der Probenaschen einen Kamm einsetzt. Zum DNA-Gemisch werden 20 % eines Gelladepuffers hinzugegeben, der einerseits das Absinken der Proben in die Probenaschen ermöglicht und andererseits zwei Farbstoffe enthält, welche die Lauffront der Proben anzeigen. Nach Erstarren des Gels wird der Kamm entfernt, das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Kammer gelegt und das DNA-Gemisch in die Probenaschen pipettiert. 5 μ l eines DNA-Größenstandards (Smart Ladder) werden zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen mit aufgetragen. Die angelegte Spannung während der Elektrophorese beträgt 80 V.

10 x TBE-Puffer:	Tris-HCl	8 g
	Borsäure	55 g
	0,5 M EDTA (pH 8,0)	40 ml
	dH ₂ O	<i>ad</i> 1 l

Gel-Ladepuffer:	Bromphenolblau	2,5 mg
	Xylencyanol	2,5 mg
	Glycerol	300 µl
	dH ₂ O	ad 1 ml

2.2.2.5 Isolierung von DNA aus einem Agarosegel

Die Reisolation der im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgt mit der *Squeeze-Freeze*-Methode. Die unter UV-Licht ausgeschnittenen Gelstücke, die das zu isolierende DNA-Fragment enthalten, werden in ein kleines Reaktionsgefäß überführt. Dieses Gefäß ist zu einem Drittel mit silanisierter Glaswolle gefüllt und am unteren Ende durchstoßen. Nun stellt man dieses Gefäß in ein größeres Reaktionsgefäß und zentrifugiert das Konstrukt für 10 min mit 8000 g bei Raumtemperatur. Anschließend fällt man die erhaltene DNA-Lösung mit 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol. Diese Fällung erfolgt mindestens 30 min lang bei -20 °C. Schließlich sedimentiert man die DNA durch Zentrifugation (20 min, 20000 g, 4 °C), um dann die DNA in einem geeigneten Volumen dH₂O aufzunehmen.

2.2.2.6 Ligation von DNA-Molekülen

Der Schritt der kovalenten Verknüpfung eines Vektors mit einem DNA-Fragment ist ein Beispiel für eine Ligation. Katalysiert wird diese Knüpfung von Phosphodiesterbindungen durch spezielle Enzyme, den DNA-Ligasen.

Bereitet man eine Ligation vor, so ist darauf zu achten, dass die eingesetzte DNA-Menge größer ist als die eingesetzte Menge an Vektor (optimal ist häufig ein Verhältnis von ca. 100:1), um die Eigenligationsrate des Vektors zu verringern. Ein Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

T4-DNA-Ligase-Puffer mit ATP (10x; vom Hersteller der Ligase mitgeliefert)	2 µl
T4-DNA-Ligase (100 U/µl)	1 µl
DNA-Fragment (Insert)	x µl
Vektor	y µl
dH ₂ O	ad 20 µl

Die Reaktion mit dem *T4-Ligase Kit* der Firma Fermentas erfolgt bei 8 °C über Nacht.

2.2.2.7 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Bakterienzellen die freie DNA aufnehmen können bezeichnet man als kompetent. Bakterien die keine natürliche Kompetenz besitzen können durch verschiedene

Methoden kompetent gemacht werden. Verbreitet ist dazu die CaCl_2 -Methode (Hanahan, 1983).

3 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO_4 werden mit 10 μl Glycerolkultur des zu bearbeitenden Stamms beimpft und für 12-16 h bei 37 °C im Rotationsschüttler bei 250 Upm inkubiert. Mit 500 μl dieser Kultur werden 50 ml LB-Medium + 10 mM MgSO_4 inokuliert und unter gleichen Bedingungen so lange bebrütet, bis bei 600 nm (OD_{600}) eine optische Dichte von 0,3-0,5 erreicht ist. Die Zellen werden abzentrifugiert (5000 g, 5 min, 4 °C) und in 14 ml Transferpuffer I resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation auf Eis werden die Zellen erneut abzentrifugiert. Anschließend wird das Sediment vorsichtig in 2 ml Transferpuffer II aufgenommen. Die Bakterien werden zu je 100 μl in Eppendorfgefäße aliquotiert und nach dem Schockfrostern in flüssigem Stickstoff bei -80 °C aufbewahrt.

Transferpuffer I:	1 M CH_3COOK	3 ml
	1 M KCl	10 ml
	1 M CaCl_2	1 ml
	Glycerin	12 ml
	Auf 80 ml mit dH_2O auffüllen, mit NaOH auf pH 6,1 einstellen	
dann Zugabe von	1 M MnCl_2	5 ml
	Auf 100 ml mit dH_2O auffüllen	
Transferpuffer II:	0,2 M MOPS (3-N-Morpholino-propansulfonsäure)	1,0 ml
	1 M KCl	0,2 ml
	1 M CaCl_2	1,5 ml
	Glycerin	2,4 ml
	Auf 20 ml mit dH_2O auffüllen	

2.2.2.8 Bakterientransformation

Bei der verwendeten Methode macht man sich den Umstand zu Nutze, dass die - nach Hinzufügen einer Salzlösung - poröse Bakterienmembran durch eine kurze Temperaturerhöhung auf 42 °C für die Fremd-DNA durchlässig wird. Eine unmittelbar auf diesen Temperaturanstieg folgende Abkühlung des Reaktionsansatzes erhöht die Effizienz der sogenannten Hitzeschocktransformation.

Für einen Transformationsansatz werden 100 μl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut. Zu diesen Zellen werden, je nach DNA Konzentration, 1-5 μl Plasmidlösung gegeben. Den Ansatz lässt man für 30 min auf Eis stehen. Anschließend erfolgt bei

42 °C ein Hitzeschock für 30-45 s. Danach werden die Zellen sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 0,25 ml SOC-Medium werden die Zellen für 1 h bei 30 °C im Rotationsschüttler inkubiert. Die Selektion der transformierten Zellen erfolgt durch das Ausplattieren dieser Suspension auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten. Die Platten werden für 12-16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.9 Plasmidisolierung aus Bakterien

Die verwendete Methode (Birnboim & Doly, 1979) beruht auf dem Umstand, dass nur ringgeschlossene Plasmid-DNA intakt aus einer alkalischen Behandlung der transformierten Bakterien hervorgeht. Zur Vorbereitung erfolgt die Anzucht der Transformanten. Dazu überführt man einzelne Bakterienklone von der Agarplatte in ampicillinhaltiges LB-Medium, in welchem sie über Nacht bei 30 °C unter Schütteln (150 Upm) inkubiert werden.

Nachdem die Bakterien über Nacht angewachsen sind werden sie für 10 min mit 5000 g bei 4 °C zentrifugiert. Mit den daraus resultierenden Sedimenten wird dann, wie in der Anleitung der verwendeten Plasmid-Kits NucleoBond® AX 100 bzw. NucleoSpin® Plasmid der Fa. Macherey-Nagel beschrieben, die Plasmidpräparation durchgeführt.

Bei diesem Verfahren wird die Plasmid-DNA nach der alkalischen Lyse der Bakterien an eine Anionen-Austauscher-Säule gebunden, von der sie anschließend durch Verwendung eines Hochsalzpuffers eluiert wird. Der letzte Schritt besteht darin, die Plasmid-DNA durch Isopropanol-Präzipitation und eine Ethanol-fällung aufzureinigen und zu entsalzen.

2.2.2.10 Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von DNA

Die Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrads von DNA erfolgt durch eine spektralphotometrische Analyse. Es ist möglich, den DNA-Gehalt einer Lösung anhand ihrer Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) zu ermitteln. Ein Absorptionswert von 1,0 entspricht hierbei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Zur Bestimmung des Reinheitsgrads der isolierten Plasmid-DNA verwendet man den Quotienten der gemessenen Absorptionen bei 260 und 280 nm. Da bei 280 nm das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren (Phe, Trp, Tyr) liegt, spiegelt die bei dieser Wellenlänge gemessene Absorption den Proteinanteil in der Lösung wider. Man geht von einer weitgehend proteinfreien Plasmid-DNA-Lösung aus, wenn der gebildete Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

Eine weitere Möglichkeit die DNA-Konzentration abzuschätzen ist die schon beschriebene Agarosegel-Elektrophorese (siehe 2.2.2.4). Trägt man hier die zu untersuchende DNA-Probe zusammen mit einem standardisierten Molekulargewichtsmarker als Referenz auf, so kann durch die Intensität der DNA-Banden auf die Konzentration geschlossen werden.

2.2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Ermittlung der Basenabfolge einer DNA-Sequenz ist sinnvoll, um beispielsweise das Resultat einer Klonierung zu überprüfen und u.U. Mutationen zu detektieren. Die zugrunde liegende Methode der DNA-Sequenzierung beruht auf dem von Sanger entwickelten Kettenabbruchverfahren (Sanger, 1981). Hierbei wird durch Didesoxynucleotide die Synthese des zur Matrize komplementären Strangs im Extensionsschritt einer PCR abgebrochen. Die Sequenzierung der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Expressionskonstrukte erfolgt durch Eurofins MWG Operon.

2.2.3 Ganzzell-Biotransformation

2.2.3.1 Klonselktion

Um nach der Transformation von Spalthezefellen mit Expressionskonstrukten einen Klon mit möglichst großer Umsatzaktivität aus den resultierenden Kolonien auszuwählen wird ein Aktivitätsvergleich von jeweils 10 bis 20 Transformanden durchgeführt. Dabei können sowohl die Biotransformationsaktivitäten der einzelnen Transformanden untereinander verglichen, als auch eventuelle Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen aufgedeckt werden. Dazu werden jeweils 7 ml EMM mit den nötigen Zusätzen in 15 ml-Falcongefäßen mit einem Klon der zu untersuchenden Spalthezefestämme angeimpft. Diese Kulturen werden bei 30 °C und 70 Upm für 48 h horizontal liegend im Inkubationsschüttler inkubiert. Danach werden in drei Reaktionsgefäßen jeweils 2 ml jeder Kultur abzentrifugiert (3000 g, 5 min, RT) und die Überstände verworfen. Ein Zellsediment dient dann der Bestimmung der Trockenbiomasse, wie unter 2.2.1.6 näher beschrieben. Die Zellen in den beiden verbleibenden Gefäßen (Zweifachwerte) werden in jeweils 1 ml frischem EMM mit den entsprechenden Zusätzen resuspendiert. Diese Zellsuspensionen werden dann in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (MTP) überführt, in die Progesteron (500 µM Endkonzentration) vorgelegt wurde. Die MTP wird anschließend mit Parafilm verschlossen, um die Verdunstung zu minimieren, und auf einem MTP-Schüttler bei 750 Upm und 30 °C über 24 h inkubiert. Nach der Biotransformation wird der gesamte Inhalt jeder einzelnen Vertiefung mit Cyclohexan extrahiert und die Produktbildung durch HPLC-Analyse überprüft wie unter 2.2.5.1 angegeben. Die erhaltenen Daten werden auf die Trockenbiomasse normalisiert, um eventuelle Unterschiede im Wachstumsverhalten verschiedener Klone bzw. Stämme auszugleichen. Die spezifische 20 α -DHP-Bildungsaktivität wird dementsprechend als µmol Produkt pro g Trockenbiomasse angegeben. Nach einem Selektions-Durchgang folgen jeweils zwei unabhängige Wiederholungen des Tests mit denjenigen (ca. 5) Klonen, die sich in der ersten Untersuchung als die aktivsten erwiesen. Zellen der Transformanden mit der höchsten Aktivität werden aliquotiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C in 2xYEA-Medium mit 25 % Glycerin gelagert. Die übrigen Klone werden verworfen.

2.2.3.2 Ganzzell-Biotransformation in Schüttelkolben

Die für das Experiment notwendigen Spaltheferzellen werden, soweit nicht anders angegeben, in einem Mediumvolumen von 50 ml in 250 ml-Erlenmeyerkolben bei 150 Upm und 30 °C inkubiert. Das Inkubationsmedium, die initiale Zelldichte, die Substratkonzentration sowie die Inkubationsdauer werden entsprechend dem jeweiligen Experiment gewählt. Zu den angegebenen Zeitpunkten werden Proben mit einem Volumen von 1 ml aus den Kulturen entnommen und bis zu ihrer weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Um die Produktbildung zu verfolgen werden diese Zellsuspensionen nach dem Auftauen extrahiert und dann mittels HPLC analysiert wie unter 2.2.5.1 angegeben. Alle Experimente werden, wenn nicht anders vermerkt, dreimal unabhängig, jeweils mit der Bestimmung von Doppelwerten durchgeführt und die erhaltenen Daten gemittelt.

2.2.3.3 Ganzzell-Biotransformation in MTPs

In MTPs kann eine große Anzahl von Biotransformationsansätzen (bis zu 96) parallel zueinander behandelt werden. Die Spaltheferzellen werden dabei, soweit nicht anders angegeben, in 1 ml EMM auf einem MTP-Schüttler bei 750 Upm und 30 °C inkubiert. Die initiale Zelldichte beträgt in der Regel 2×10^8 Zellen/ml, Substratkonzentration und Inkubationsdauer werden dem jeweiligen Experiment angepasst. Nach der Biotransformation wird der gesamte Inhalt jeder einzelnen Vertiefung in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, extrahiert und mittels HPLC analysiert wie unter 2.2.5.1 angegeben. Alle Experimente werden, wenn nicht anders angegeben, dreimal unabhängig, jeweils mit der Bestimmung von Dreifachwerten durchgeführt und die erhaltenen Daten gemittelt.

2.2.3.4 Ganzzell-Biotransformation im 1 l-Bioreaktor

Fermentationen im 1 l-Maßstab werden im „Biostat M“ (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) oder im „Biostat“-Laborfermenter (Sartorius AG, Göttingen) durchgeführt. Die entsprechenden Fermentationsgefäße fassen 2 l (Biostat M) bzw. 1,5 l (Biostat), das Arbeitsvolumen beträgt jeweils ca. 1 l. Der pH-Wert wird kontinuierlich mit einer pH-Elektrode (Easyferm plus K8 200, Hamilton; Reno, NV, USA) überwacht und durch automatische Dosierung von 25 % NaOH konstant bei pH 5,5 gehalten. Der Gelöst-Sauerstoff wird kontinuierlich mit einer Sauerstoffelektrode (Oxyferm FDA 225, Hamilton) gemessen. Soweit nicht anders angegeben werden darüberhinaus folgende Parameter gewählt: Als Fermentationsmedium dient DM1 mit den für den jeweiligen Produktionsstamm notwendigen Zusätzen. Das Fermentationsgefäß wird mit einem dem jeweiligen Experiment angepassten Anfangsvolumen vorgefüllt. Nach der Eichung der pH-Elektrode wird der Bioreaktor bei 120 °C für 20 min autoklaviert. Nach einer Polarisierungsphase wird die Sauerstoffelektrode mit Stickstoffgas für das Null-Signal bzw. mit Luft bei einer Durchflussrate von 2 l/min für das 100%-Signal kalibriert. Der Bioreaktor wird unter sterilen Bedingungen mit abzentrifugierter und in 10 ml EMM resuspendierter Biomasse des jeweiligen Produktionsstamms angeimpft, die in

Abwesenheit von Thiamin im Kulturmedium bis zur stationären Phase herangezogen worden war. In der Regel wird 1 mmol Substrat in 10 ml Ethanol zu Beginn des Fermentationsprozesses zugegeben. Die Fermentationen werden bei 30 °C, einer Belüftungsrate von 2 l/min und einer Rührgeschwindigkeit von 400 Upm durchgeführt. Als *feed*-Medium dient FM1 mit den notwendigen Zusätzen. Das *feeding* der Kultur erfolgt wie beim jeweiligen Experiment angegeben. Die Dauer der Biotransformation und die Gesamtfermentationsdauer variieren wie angegeben.

2.2.3.5 Ganzzell-Biotransformation im 10 l-Bioreaktor

Fermentationen im 10 l-Maßstab werden im „Biostat“-Laborfermenter (Sartorius AG; Göttingen) in einem 12 l-Reaktionsgefäß durchgeführt, dessen Arbeitsvolumen ca. 10 l beträgt. Der pH-Wert wird kontinuierlich mit einer pH-Elektrode (Easyferm plus K8 200, Hamilton; Reno, NV, USA) überwacht und durch automatische Dosierung von 25 % NaOH konstant bei pH 5,0 gehalten. Der Gelöst-Sauerstoff wird kontinuierlich mit einer Sauerstoffelektrode (Oxyferm FDA 225, Hamilton) gemessen. Als Fermentationsmedium dient EMM. Das Fermentationsgefäß wird mit einem Anfangsvolumen von 9 l vorgefüllt. Nach der Eichung der pH-Elektrode wird der Bioreaktor bei 120 °C für 20 min autoklaviert. Nach einer Polarisierungsphase wird die Sauerstoffelektrode mit Stickstoffgas für das Null-Signal bzw. mit Luft bei einer Durchflussrate von 9 l/min für das 100%-Signal kalibriert. Der Bioreaktor wird unter sterilen Bedingungen mit abzentrifugierter und in 50 ml EMM resuspendierter JMN8-Biomasse einer 1 l-EMM-Kultur beimpft, die über 24 h in Abwesenheit von Thiamin im Kulturmedium bis zur stationären Phase herangezogen worden war. 1,562 g Dydrogesteron in 50 ml Ethanol werden zu Beginn des Fermentationsprozesses zugegeben, was einer anfänglichen Substratkonzentration von etwa 500 µM entspricht. Die Fermentationen werden bei 30 °C und einer Rührgeschwindigkeit von 300 Upm durchgeführt. Der Bioreaktor wird anfänglich mit einer Rate von 9 l/min belüftet, nach einer 24-stündigen Biomassewachstumsphase wird die Belüftungsrate auf 2 l/min reduziert. Das *feeding* der Kultur erfolgt durch manuelle, punktuelle Zugabe von 330 ml einer konzentrierten Glucoselösung (600 g/l) nach etwa 24 h und 48 h Fermentationsdauer. Die Gesamtdauer einer Fermentation beträgt ca. 72 h.

2.2.3.6 Ganzzell-Biotransformation im 70 l-Bioreaktor

Fermentationen im 70 l-Maßstab werden im „Labor Pilot“-Bioreaktor (LP 351, Bioengineering AG; Wald, Schweiz) durchgeführt, dessen Arbeitsvolumen ca. 50 l beträgt. Der pH-Wert wird kontinuierlich mit einer pH-Elektrode (Ingold Einstabmesskette, Bioengineering) überwacht und durch automatische Dosierung von 25 % NaOH konstant bei pH 5,3 gehalten. Der Gelöst-Sauerstoff wird kontinuierlich mit einem Sauerstoffmesssystem (IL/Ingold amperometrische Sauerstoffelektrode und IL-pO₂ Messverstärker, Bioengineering) kontrolliert. Soweit nicht anders angegeben werden darüberhinaus folgende Parameter gewählt: Als Fermentationsmedium dient DM1 mit einem Glucosegehalt von 0.4 % (w/v) und 0,01 % (w/v) Adenin. Das

Fermentationsgefäß wird mit einem Anfangsvolumen von 22 l vorgefüllt. Nach der Eichung der pH-Elektrode wird der Bioreaktor bei 115 °C für 10 min *in situ* autoklaviert. Nach einer Polarisierungsphase wird die Sauerstoffelektrode mit Stickstoffgas für das Null-Signal bzw. mit Luft bei einer Durchflussrate von 9 l/min für das 100%-Signal kalibriert. Der Bioreaktor wird unter sterilen Bedingungen mit abzentrifugierter und in 200 ml EMM resuspendierter Biomasse aus acht 1 l-Schüttelkolbenkulturen von CAD302 beimpft, die über 72 h in Abwesenheit von Thiamin im Kulturmedium bei 30 °C bis zu einer Trockenbiomasse von etwa 4 g/l inkubiert worden waren. Nach einer 24-stündigen Biomasseanzuchtsphase werden 72,7 g (64 mmol) β -Cyclodextrin in 400 ml dH₂O mit 5 ml 25 % NaOH und danach 20 g (64 mmol) Substrat in 350 ml Ethanol zugeführt. Damit beträgt die Substrat- und β -Cyclodextrinkonzentration zu Beginn der Biotransformationen jeweils ca. 2,9 mM. Die Fermentation wird bei 30 °C und einer Rührgeschwindigkeit von 300 Upm über 136 h fortgeführt, was eine Gesamtlaufzeit von 160 h ergibt. Die Sauerstoffsättigung wird stets über 20 % gehalten, indem der Bioreaktor mit einer im Laufe der Fermentationszeit steigenden Durchflussrate im Bereich von 9 bis 35 l/min belüftet wird. Als *feed*-Medium dient zweifach konzentriertes FM1 mit 0,02 % (w/v) Adenin oder konzentrierte Glucoselösung (600 g/l). Das *feeding* der Kultur erfolgt, wie beim jeweiligen Experiment angegeben, entweder automatisch geregelt und wachstumsratenangepasst oder linear mit nach Bedarf manuell angepassten Flussraten. Dabei wird der Glucosegehalt während der Biomasseanzuchtsphase im Bereich von etwa 0,1 bis 0,5 g/l eingestellt. Nach der Substratzugabe wird die Glucosekonzentration auf 0,5 bis 5,5 g/l erhöht.

Bei allen Ganzzell-Biotransformationen in Bioreaktoren werden regelmäßig Proben entnommen und bezüglich Glucosekonzentration, Trockenbiomasse und Produktbildung untersucht. Die Produktkonzentration wird wie unter 2.2.5.1 angegeben mittels HPLC bestimmt. Ein von Călin-Aurel Drăgan firmenintern entwickeltes Datenerfassungssystem zeichnet pH, Gelöst-Sauerstoff, Alkali- und *feed*-Pumpenlaufzeit, Temperatur und Rührgeschwindigkeit online auf. Die Glucosekonzentration wird offline mit einem „Accu-Chek Sensor“ Gerät (Roche Diagnostics, Mannheim) gemessen, nachdem dieses mit bekannten Glucosekonzentrationen in EMM kalibriert wurde.

Nicht alle im Rahmen dieser Arbeit im 1 l-Maßstab durchgeführten Fermentationen werden hier schriftlich dokumentiert. Es werden beispielhaft einzelne Fermentationen beschrieben, die exemplarisch für den jeweiligen Entwicklungsstand sind. Die Daten aus verschiedenen Fermentationen werden hierbei nicht gemittelt.

2.2.4 Bioreaktor-feeding

Qualitatives Ziel des *feedings* in *fed-batch*-Fermentationen ist, den für Zellwachstum und Biotransformation benötigten Glucosegehalt einzustellen und aufrecht zu erhalten. Die Grundlagen der in dieser Arbeit eingesetzten *feeding*-Strategien werden im Folgenden erläutert.

2.2.4.1 Manuelle, punktuelle Glucosezugabe

Wenn keine exakt bedarfsangepasste Glucoseversorgung angestrebt wird ist es für Biotransformationen häufig ausreichend, zu bestimmten Zeitpunkten manuell ein bestimmtes Volumen einer konzentrierten Glucoselösung (40-60 % (w/v)) zur Biotransformationskultur zuzufügen. Dabei enthält das Fermentationsmedium eine gewisse Anfangsglucosekonzentration. Genaue Parameter werden beim jeweiligen Experiment angegeben.

2.2.4.2 Automatisch geregeltes, wachstumsratenangepasstes *feeding*

Für eine starke Spalthefe-Biomassezunahme ist eine Ethanolbildung soweit wie möglich zu verhindern und damit also eine streng kontrollierte *feeding*-Strategie notwendig, wobei eine *feedback*-Kontrolle der Glucose- und/oder Ethanolkonzentration hilfreich ist. Für jeden Biotransformationsprozess muss ein Glucosekonzentrationsverlauf gefunden werden, der eine hohe Biomassekonzentration in Kombination mit einer optimalen Umsatzaktivität ermöglicht.

Um diese Bedingungen umzusetzen erfolgt das automatisch geregelte *feeding* mit einer *feed-forward*-Strategie (offener Regelkreis), die sich prinzipiell an den Arbeiten von Hensing *et al.* und Jansen *et al.* orientiert (Hensing, *et al.*, 1995, Jansen, *et al.*, 2006). Die dort erwähnten, für das Biomassewachstum relevanten Parameter werden hierbei miteinander kombiniert. Demnach wird die *feeding*-Rate F nach der folgenden Formel bestimmt:

$$(3) \quad F = V_0 X_0 e^{\mu t} q_g S_g^{-1}$$

V_0 entspricht dabei dem Initialvolumen der Kultur, X_0 der initialen Trockenbiomasse und S_g der Glucosekonzentration im *feed*-Medium. Die spezifische Glucoseverbrauchsrate q_g wird entsprechend der Formel (4) berechnet:

$$(4) \quad q_g = (\mu / Y_{Xg}) + M$$

Aufgrund empirischer Daten wird der Biomasseertragskoeffizient für Glucose Y_{Xg} gleich $0,33 \text{ g}_{\text{Biomasse}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ gewählt, während der Wert von $0,02 \text{ g}_{\text{Glucose}}/(\text{g}_{\text{Biomasse}} \cdot \text{h})$ für den *maintenance factor* M von de Jong-Gubbles *et al.* übernommen wird (de Jong-Gubbels, *et al.*, 1996). Die Wachstumsrate μ ist zeitabhängig. μ_{\max} ist aufgrund der Herbert-Pirt-Beziehung (Herbert, 1958, Pirt, 1965) am Anfang eines Fermentationsprozesses gegeben und nimmt mit der Zeit ab (Jansen, *et al.*, 2006). Daher wird μ in der Formel (3) durch das folgende sigmoide Profil beschrieben:

$$(5) \quad \mu(t) = 1/(a+be^{ct})$$

Anhand empirischer Daten wird μ_{\max} gleich $0,06 \text{ h}^{-1}$, der Parameter a gleich 15 und b gleich 1 gewählt; für c wird abhängig vom Prozessmaßstab ein Wert von 0,05 (1,5 l-Bioreaktor) bzw. 0,035 (70 l-Bioreaktor) eingestellt und nach Bedarf nachgeregelt. Die *feed*-Raten-Formel (3) bildet so die Basis für ein Datenerfassungs- und Kontroll-

Programm, das von Călin-Aurel Drăgan firmenintern programmiert wurde. Dieses erlaubt dem Benutzer alle relevanten Parameter manuell einzugeben und unter bestimmten Umständen nachzuregulieren und ermöglicht ein automatisiertes *feeding* während der gesamten Prozesslaufzeit ohne *feedback*-Kontrolle. Eine variable *feed*-Pumpenrate wird ebenfalls durch softwarekontrollierte Pulsweitenmodulation der Pumpenlaufzeit (eine Periode entspricht 5 min) ermöglicht.

2.2.4.3 Konstantes *feeding*

Im Laufe einer *fed-batch*-Biotransformation kann es unter bestimmten Umständen bzw. zu bestimmten Zeitpunkten notwendig und sinnvoll sein, anstelle einer automatisch geregelten, wachstumsratenangepassten *feed*-Strategie ein manuell geregeltes konstantes *feeding* mit FM1 oder konzentrierter Glucoselösung anzuwenden. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn sich ein lineares *feeding* besser an die aktuellen Wachstumsbedingungen der jeweiligen Kultur anpassen lässt. Sowohl der Zeitpunkt eines *feed*-Strategie-Wechsels als auch die genaue *feed*-Zusammensetzung und die Flussrate beruhen dabei weitestgehend auf empirischen Daten. Die wichtigsten Hinweise und Orientierungspunkte für die Notwendigkeit und den Umfang einer manuellen Anpassung des *feedings* während einer Biotransformation liefert die Glucosekonzentration. Ist diese höher oder niedriger als erforderlich besteht Handlungsbedarf. Genaue Parameter werden beim jeweiligen Experiment angegeben.

2.2.5 Analytische Methoden

2.2.5.1 High performance liquid chromatography (HPLC)-Analyse

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie oder *high performance liquid chromatography* (HPLC) ist ein Analyse-Verfahren, mit dem man Substanzgemische trennen und die verschiedenen Substanzen identifizieren und quantifizieren kann. Es handelt sich um ein flüssigchromatografisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz mit einem Fließmittel (der mobilen Phase) durch eine Trennsäule, welche die stationäre Phase enthält, gepumpt wird. Verschiedene Substanzen werden dabei voneinander getrennt und können in begrenztem Umfang identifiziert werden, indem man ihre Retentionszeit mit der von Standardsubstanzen vergleicht. Neben der Retentionszeit kann bei Verwendung eines Diodenarray-Detektors auch der Abgleich des UV-Spektrums zur Identifizierung dienen. Die Konzentration einer Substanz in einer Probe wird anhand einer Eichgeraden bestimmt. Die HPLC-Methode kann nicht nur zu analytischen Zwecken eingesetzt werden. Sie findet auch präparative Verwendung, um Produkte von Verunreinigungen, Nebenprodukten und Ausgangssubstanzen zu trennen.

In dieser Arbeit wird ein HPLC-System der Firma Waters (Eschborn) verwendet, das aus einem Alliance 2690-Trennmodul und einem Fotodiodenarray-Detektor PDA966 besteht. Sofern nicht anders beschrieben, handelt es sich bei der stationären Phase um

eine EC 125/4 Nucleosil 100-5C18-Säule (4 x 125 mm, 5 μ m) mit einer CC 8/4 Nucleosil 100-5C18-Vorsäule (4 x 8 mm, 5 μ m) der Firma Macherey-Nagel (Düren). Die mobile Phase besteht aus einem Acetonitril-Wasser-Gemisch (50:50 (v/v)). Das Probeninjektionsvolumen beträgt 20 μ l, die Säulentemperatur beträgt 40 °C und die Flussrate 1,0 ml/min, was abhängig von der zu analysierenden Substanz eine Laufzeit von 10 bis 12 min ergibt. Die Absorption von Dydrogesteron wird bei einer Wellenlänge von 290 nm verfolgt, die von Pregnenolon bei 200 nm und die von allen weiteren in dieser Arbeit verwendeten Steroiden bei 240 nm. Die Peak-Detektion und die Produktquantifizierung erfolgen mit Hilfe des Peak-Detektionsalgorithmus der Analysesoftware Millennium[®] (Waters, Eschborn). Lösungen der reinen Steroide werden als Referenzstandards verwendet. Produktkonzentrationen in Proben werden anhand von Eichgeraden im Bereich von 10 bis 1000 μ M bestimmt. Dazu werden die Konzentrationen des Analyten in den Eichlösungen gegen die entsprechenden absoluten Peakflächen aufgetragen und ein lineares Kleinstquadrat-Regressionsmodell zur Berechnung von Eichgeraden verwendet.

Proben für die HPLC-Analyse werden, wenn nicht anders angegeben, wie folgt aufbereitet: 1 ml Zellsuspension wird in einem 2 ml-Reaktionsgefäß mit 500 μ l Ethylacetat extrahiert. Die organische (obere) Phase wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur vollständigen Trockenheit eingedampft. Der Rückstand wird in 1 ml Acetonitril resuspendiert und dann analysiert. Die HPLC-Analytik kann also nur das wiedergeben, was in der Kulturflüssigkeit vorhanden ist, d.h. es gibt einen systematischen Unterbefund unter Bedingungen bei denen die zu analysierenden Steroide ausgefallen sind oder an Reaktionsgefäßen anhaften.

2.2.5.2 Nuclear magnetic resonance (NMR)-Spektroskopie

Die Kern(spin)resonanzspektroskopie oder *Nuclear magnetic resonance* (NMR)-Spektroskopie kann zur Bestimmung von Molekülstrukturen eingesetzt werden, indem die elektronische Umgebung einzelner Atome und deren Wechselwirkungen mit den Nachbaratomen untersucht wird. Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten NMR-Spektroskopie-Analysen zur Strukturaufklärung und Qualitätsüberprüfung von Steroidmetaboliten wurden von Dr. Josef Messinger (Solvay Pharmaceuticals GmbH, Hannover) durchgeführt.

2.2.6 Produktaufreinigung

2.2.6.1 Dünnschichtchromatografie

Die Methode der Dünnschichtchromatografie (DC) beruht auf Wanderungsprozessen von zu trennenden Molekülen in einer Flüssigkeit, die durch eine Adsorbenschicht strömt. Das Wanderungsverhalten eines Moleküls hängt dabei sowohl von der Art der stationären und mobilen Phasen, als auch vom Molekül selbst ab. Meist lassen sich

Adsorbensmaterialien und Fließmittelgemische so kombinieren, dass die verschiedenen Substanzen eines Gemischs verschieden weit wandern und sich voneinander trennen.

Bei der hier durchgeführten Normalphasen-DC wird ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄ DC-Fertigfolie verwendet, deren Trennschicht aus 0,20 mm Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator UV₂₅₄ besteht. Dieses Schichtmaterial fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm. Die farblosen Steroide absorbieren das UV-Licht und werden somit durch Fluoreszenzlöschung sichtbar. Als Fließmittel dient ein Chloroform:Ethylacetat:Methanol-Gemisch im Verhältnis 20:4:1 (v/v/v). 5 µl Probenvolumen werden auf der Startlinie aufgetragen. Lösungen einer reinen Vergleichssubstanz (10 mM Progesteron) werden parallel mit aufgetragen und dienen der Identifizierung der einzelnen Substanzen in den Proben. Nach dem Auftragen wird die Platte getrocknet und dann senkrecht in eine Chromatografiekammer eingestellt, die zuvor etwa 1,5 cm hoch mit dem Fließmittel befüllt wurde und in die zur Äquilibrierung ein Filterpapier eingelegt wurde. Nachdem die Laufmittelfront durch Kapillarkräfte den oberen Teil der DC-Folie erreicht hat, wird die DC-Folie aus der Kammer entnommen und getrocknet. Danach erfolgt die Auswertung der DC durch Betrachtung unter der UV-Lampe.

2.2.6.2 Säulenchromatografie zur 20α-DHP-Aufreinigung

Bei der Säulenchromatografie handelt es sich um ein Trennverfahren, das auf dem Adsorptionsverfahren beruht. Die zu trennenden Substanzen wechselwirken mit dem festen Adsorbensmaterial. Da die Stärke der Wechselwirkung abhängig von der Polarität der funktionellen Gruppen der Komponenten ist, wandern diese als Zonen durch die Säule.

Es wird eine Säule von 30 cm Länge und 0,7 cm Durchmesser (Econo-Column; Bio-Rad Laboratories GmbH, München) verwendet. Als mobile Phase wird ein Chloroform:Ethylacetat:Methanol-Gemisch im Verhältnis 20:4:1 (v/v/v) eingesetzt. Als stationäre Phase dienen 2,5 g Kieselgel 60 (35 - 70 µm Körnung), welche im späteren Laufmittel aufgeschlämmt werden und dann luftblasenfrei in die senkrecht stehende Säule eingefüllt werden. Das Lösungsmittel wird bis zum oberen Rand der Kieselgelfüllung ablaufen gelassen und dann das in 1 ml Chloroform gelöste Substanzgemisch auf die Säule aufgetragen und in die Feststoffschicht einsickern gelassen. Das Säulenmaterial wird anschließend mit etwa 1 cm Seesand abgedeckt. Das verbleibende Säulenvolumen wird mit Laufmittel aufgefüllt und während der Elution wird das Lösungsmittel stetig manuell nachgefüllt. Es ergibt sich eine Fließgeschwindigkeit von etwa 0,2 ml/min. Fraktionen mit einem Volumen von 600 µl werden gesammelt und weiter analysiert.

2.2.6.3 Niederdruck-Flüssigkeits-Chromatografie zur 20α-DHP-Aufreinigung

Die Niederdruck-Flüssigkeits-Chromatografie ist eine durch den Einsatz von Niederdruck (bis max. 9 bar) schnell durchführbare Form der Säulenchromatografie. Sie

stellt eine einfache und ökonomische Variante der präparativen Flüssigkeitschromatografie dar. Hierfür werden optimierte, vorgepackte Plastiksäulen verwendet, die meist mit Kieselgel als Festphase gefüllt sind. Durch diese wird Lösemittel mit einer hohen Flussrate gepumpt, was einen beschleunigten Probendurchlauf und damit eine verkürzte Trennzeit ermöglicht.

In dieser Arbeit wird eine MD-80/100 Pumpe (Labomatic Instruments AG, Allschwil, Schweiz) verwendet und mit einem Druck von ca. 4 bar gearbeitet. Bei der stationären Phase handelt es sich um die Standard-Kieselgelsäule Chromabond® SiOH Flash MN-240 (40 x 240 mm) der Firma Macherey-Nagel (Düren). Die mobile Phase besteht aus einem *n*-Hexan:Ethylacetat-Gemisch (11:9 (v/v)). Das Probeninjektionsvolumen beträgt 9,5 ml und die Flussrate 70 ml/min. Die Detektion der Steroide erfolgt durch den UV/VIS-Detektor BT 8200 (Biotronic, Maintal) bei einer Wellenlänge von 240 nm. Die Fraktionen, die bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum aufweisen, werden gesammelt und die enthaltenen Steroide mittels HPLC-Analyse identifiziert sowie auf Substanzreinheit überprüft. Progesteron wird nach ca. 9 min eluiert, 20 α -DHP verlässt die Säule nach etwa 11 min. Die 20 α -DHP-Fraktionen werden gesammelt und im Rotationsverdampfer bei 55-60 °C und 200-280 mbar bis zur vollständigen Trockenheit eingedampft.

3 Ergebnisse

3.1 Funktionelle Expression von AKR1C1 in Spaltheffen

3.1.1 Klonierung der Expressionsplasmide

In dieser Arbeit sollten Expressionsplasmide konstruiert werden, welche die rekombinante Expression der humanen AKR1C1 in der Spaltheffe *S. pombe* ermöglichen. Die Aminosäuresequenz der humanen AKR1C1 wurde dazu von UniProtKB/Swiss-Prot (Eintrag Q04828) bezogen. Die entsprechende cDNA-Sequenz wurde von der Entelechon GmbH (Regensburg) für eine starke Expression in der Spaltheffe bezüglich organismusspezifischer Condonverwendung, Primär- und Sekundärstruktur optimiert und anschließend synthetisiert. Die der optimierten cDNA entsprechende Aminosäuresequenz ist mit der des humanen AKR1C1-Enzyms identisch. Um eine direkte Klonierung in die Spaltheffe-Expressionsvektoren pCAD1 und pREP1 zu ermöglichen wurde die cDNA mit 5'-terminaler *NdeI*- und 3'-terminaler *BamHI*-Restriktionsschnittstelle hergestellt. Die für den Zielorganismus optimierte cDNA-Sequenz der humanen AKR1C1 ist im Anhang aufgeführt.

Die AKR1C1-cDNA wurde aus dem von Entelechon bereitgestellten pCR4-TOPO-Vektor wie unter 2.2.2.3 beschrieben mit *NdeI/BamHI* ausgeschnitten. Die anschließende Ligation (siehe 2.2.2.6) mit den *NdeI/BamHI* geschnittenen Spaltheffe-Expressionsvektoren pCAD1 und pREP1 ergab die neuen Expressionsplasmide pCAD1-AKR1C1 sowie pREP1-AKR1C1. Nach der Präparation der neuen Expressionsplasmide (siehe 2.2.2.9) wurde ihre Identität durch analytischen Verdau mit *NdeI*, *BamHI* und *NotI* bestätigt. Die Restriktionsanalysen von pCAD1-AKR1C1 und pREP1-AKR1C1 sind in Abbildung 7 gezeigt.

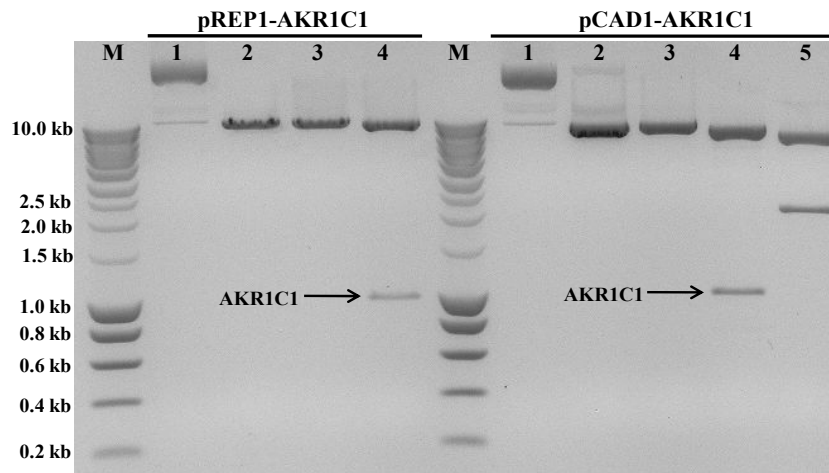


Abbildung 7: Restriktionsanalyse von pREP1-AKR1C1 und pCAD1-AKR1C1. Spur M: Marker; Spur 1: unverdauter Expressionsvektor; Spur 2: Verdau mit *NdeI*; Spur 3: Verdau mit *BamHI*; Spur 4: Verdau mit *NdeI* und *BamHI*; Spur 5: Verdau mit *NotI*. Der Pfeil kennzeichnet jeweils das AKR1C1-Fragment.

Abbildung 7 zeigt im *NdeI/BamHI*-Doppelverdau (Spur 4) jeweils ein ca. 1,0 kb großes AKR1C1-Fragment, welches in guter Übereinstimmung mit der errechneten Größe von 981 bp liegt. Wie erwartet ergibt der *NotI*-Verdau von pCAD1-AKR1C1 neben einem 6,1 kb-Integrationskonstrukt ein 2,0 kb-Fragment, das die bakteriellen Sequenzen enthält (Spur 5). *NdeI* sowie *BamHI* linearisieren den Expressionsvektor, wie durch Vergleich der Kontrollspuren, die den zugeschnittenen Vektor (Spur 1) und den linearisierten Vektor (Spuren 2 und 3) enthalten, deutlich wird. Damit konnte gezeigt werden, dass die AKR1C1-cDNA erfolgreich in die Spalthefe-Expressionsvektoren pCAD1 bzw. pREP1 kloniert wurde. Abschließend wurde die Richtigkeit der Expressionskonstrukte pCAD1-AKR1C1 und pREP1-AKR1C1 durch automatische Sequenzierung (siehe 2.2.2.11) bestätigt.

3.1.2 Klonierung der Expressionsstämme JMN7 und JMN8

Das Expressionskonstrukt pCAD1-AKR1C1 wurde mit *NotI* geschnitten und vom bakteriellen Vektorrückgrat mittels Agarosegel-Elektrophorese getrennt. Anschließend wurde das isolierte Integrationsfragment zur Transformation des Spalthefestamms NCYC2036 (Genotyp *h⁻ ura4.dl18*) wie unter 2.2.1.5 angegeben verwendet. Die Selektion erfolgte über das im Plasmid enthaltene Auxotrophiemarkergen *ura4*. Die korrekte Integration des Expressionskonstrukts in das *leu1*-Gen von NCYC2036 wurde durch Replica-Plattieren der erhaltenen Kolonien auf EMM-Platten ohne Leucinzusatz überprüft. Der daraus resultierende neue Stamm hat den Genotyp *h⁻ ura4.dl18 leu1::pCAD1-AKR1C1* und wurde **JMN7** genannt.

Der Expressionsvektor pREP1-AKR1C1 konnte direkt für die Transformation des Spalthefestamms NCYC1913 (Genotyp *h⁻ leu1.32*) verwendet werden. Nach der Transformation wurden die Zellen auf EMM-Platten ohne Leucinzusatz ausgestrichen

und bis zum Erscheinen von Kolonien inkubiert. Der neu erhaltene Stamm hat den Genotyp $h^- leu1.32/pREP1-AKR1C1$ und wurde **JMN8** genannt.

Die Konstruktion der AKR1C1-Expressionsstämme JMN7 und JMN8 ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Aus einer Transformation resultierten jeweils zwischen 50 und 200 Kolonien. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde daraus jeweils ein Klon mit starker AKR1C1-Aktivität ausgewählt (siehe 3.1.6).

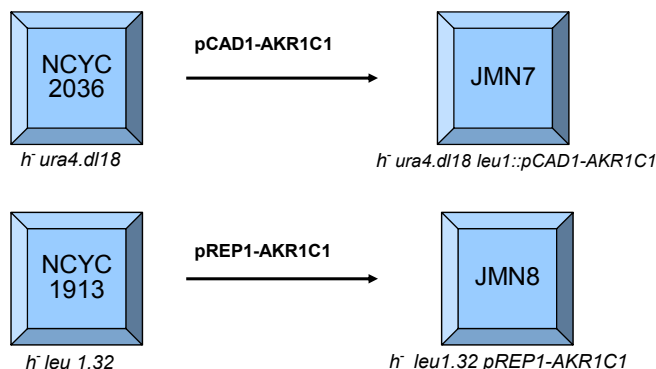


Abbildung 8: Konstruktion der AKR1C1-Expressionsstämme JMN7 und JMN8. JMN7 entstand durch Transformation von NCYC2036 mit dem Vektor pCAD1-AKR1C1, JMN8 entstand durch Transformation von NCYC1913 mit pREP1-AKR1C1.

3.1.3 Biotransformation von Progesteron

Nach der Transformation wurde jeweils ein Klon der Spalthefermentstämme JMN7 und JMN8 einmalig in Biotransformationsversuchen mit dem natürlichen AKR1C1-Substrat Progesteron eingesetzt um die Funktionalität des rekombinant exprimierten AKR1C1-Enzyms zu bestätigen. Dazu wurden jeweils 10^8 Zellen/ml in Schüttelkolben mit 10 ml EMM und 1 mM Progesteron über 72 h inkubiert und anschließend wurde die Produktbildung in den Kulturüberständen untersucht. Abbildung 9 zeigt, dass beide Stämme eine Progesteron-Biotransformationsaktivität aufweisen. Dabei kommt es zu keiner detektierbaren Bildung von Nebenprodukten.

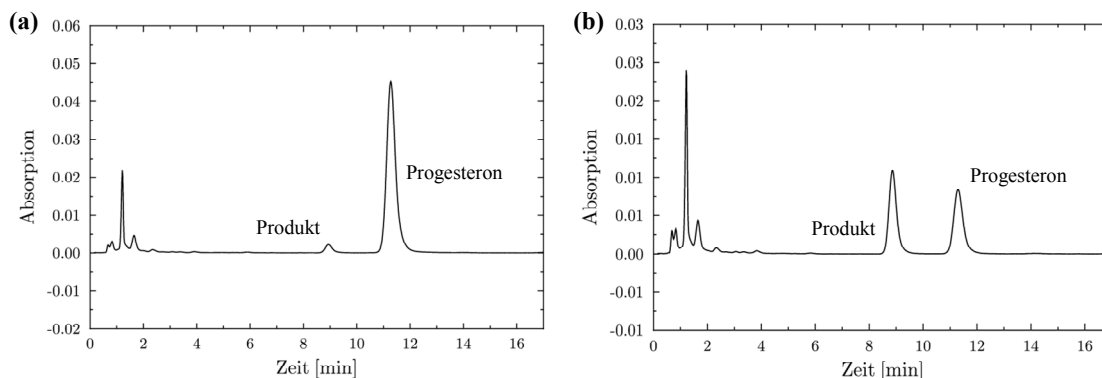


Abbildung 9: Biotransformation von Progesteron mit JMN7 und JMN8 in Schüttelkolben. HPLC-Chromatogramme ($\lambda = 240 \text{ nm}$) von Kulturüberständen der Stämme JMN7 (a) oder JMN8 (b) nach 72 h Inkubation bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ mit 1 mM Progesteron. Die initiale Zelldichte der Kultur betrug 10^8 Zellen/ml.

Beide Stämme, JMN7 und JMN8, bildeten unter diesen Bedingungen ein klar detektierbares Produkt. Auch mit den Eltern-Hefestämmen NCYC2036 und NCYC1913 war eine Produktbildung erkennbar, allerdings mit einer deutlich geringeren Rate (Daten nicht gezeigt). Diese Basisaktivität lässt sich vermutlich auf eine endogene 20α -HSD-Aktivität in *S. pombe* zurückführen, die bereits zuvor beschrieben wurde (Pajic, *et al.*, 1999). Die HPLC-Chromatogramme von Hefekulturen zeigen zudem innerhalb der ersten Minuten stets sogenannte Matrixpeaks, die auf unspezifische Substanzen in den Kulturflüssigkeiten zurückzuführen sind. Dieses Experiment konnte einen ersten Hinweis darauf liefern, dass der Stamm JMN8 das besagte Produkt effizienter bildet als JMN7; diese Eigenschaft wurde allerdings später detailliert untersucht. Die Identität des Produkts konnte im Weiteren durch NMR-Strukturanalysen eindeutig als 20α -DHP bestätigt werden.

3.1.4 Optimierung der Produktextraktion

In der vorliegenden Arbeit wurden Steroide mit Hilfe eines Flüssig-flüssig-Extraktionsverfahrens aus Kulturmedien isoliert. Um diesen Vorgang möglichst effizient und ressourcenschonend zu gestalten wurden in Vorversuchen verschiedene organische Lösemittel bezüglich ihrer Eignung für die Extraktion von Progesteron und des hydroxylierten Produkts untersucht. Zusätzlich wurde das Volumenverhältnis bestimmt, bei dem mit einem minimalen Lösemittelvolumen eine möglichst vollständige Extraktion erfolgen kann (Abbildung 10).

Um unter realistischen Bedingungen mit einer Biotransformationskultur zu arbeiten wurde JMN8 für 72 h mit 1 mM Progesteron in 1 l EMM bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem 2 l -Erlenmeyerkolben inkubiert. Nach der Inkubation wurde einerseits die Zellsuspension der Kultur und andererseits der zellfreie Überstand nach 10-minütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 20000 g vergleichend untersucht. $500 \text{ }\mu\text{l}$ Probenvolumen wurden jeweils dreimal unabhängig im Volumenverhältnis 1:1 mit einem der folgenden

Extraktionsmittel extrahiert: Chloroform, Cyclohexan, *tert*-Butylmethylether, Dichlormethan und Ethylacetat.

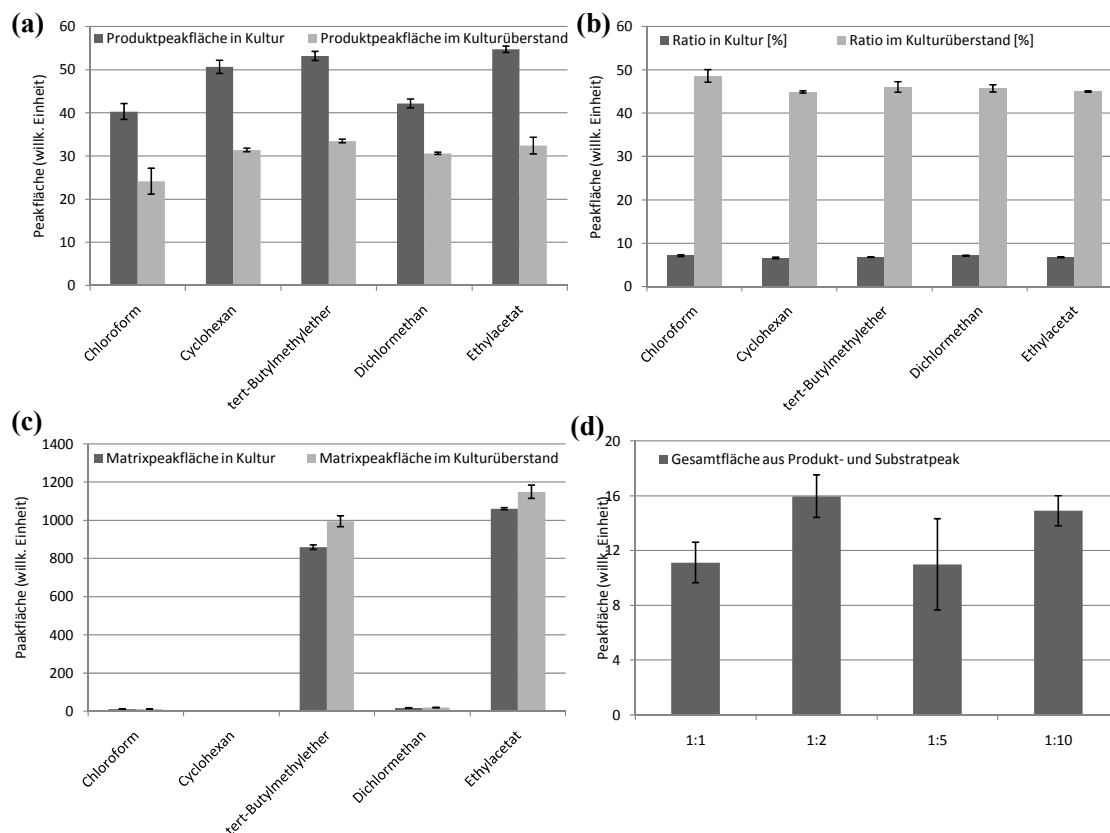


Abbildung 10: Vergleich des 20α -DHP-Extraktionsvermögens verschiedener Lösemittel und Extraktionsvolumina. Die Extraktion aus der Gesamtkultur und dem zellfreien Kulturüberstand von Stamm JMN8 nach 72 h Inkubation bei 30 °C mit 1 mM Progesteron wurde vergleichend untersucht ((a)-(c)). (a) Produktpeakflächen in HPLC-Chromatogrammen ($\lambda = 240$ nm). (b) *Ratio* (Anteil des Produkts an der Gesamtstoffmenge). (c) Matrixpeakflächen in HPLC-Chromatogrammen ($\lambda = 240$ nm). (d) Vergleich des Extraktionserfolgs mit verschiedenen Volumenverhältnissen von Cyclohexan zu Zellsuspension.

Wie aus Abbildung 10 (a) zu entnehmen ist lässt sich mit allen hier verwendeten Lösemitteln etwa 40 % mehr 20α -DHP aus der gesamten Kultur extrahieren als aus dem zellfreien Überstand. Cyclohexan, *tert*-Butylmethylether und Ethylacetat eignen sich in etwa gleich gut als Lösemittel für die Extraktion von 20α -DHP aus der JMN8-Biotransformationskultur, Chloroform und Dichlormethan etwas weniger gut.

Obwohl die aus dem zellfreien Überstand extrahierte Produktmenge deutlich geringer ist, verlagert sich das Verhältnis von Produktmenge zu Substratmenge durch Zentrifugation stark in Richtung des Produkts (siehe Abbildung 10 (b)). Die *Ratio*, also der Anteil des Produkts an der Gesamtsubstanzmenge von Produkt und Substrat, ist unabhängig vom Extraktionsmittel jeweils gleich: ca. 7 % in der Gesamtkultur und etwa 45 % im Überstand.

Die Größe des Matrixpeaks in HPLC-Chromatogrammen von Hefekulturen kann Aufschluss darüber geben, wie viele Fremdstoffe (z.B. Zuckerreste, Proteine, usw.) extrahiert wurden. Abbildung 10 (c) zeigt, dass die Matrixpeakfläche bei Extraktion mit Cyclohexan vernachlässigbar klein war, bei Extraktion mit Chloroform und Dichlormethan zeigte sich ebenfalls nur ein sehr kleiner Matrixpeak. *tert*-Butylmethylether und Ethylacetat als Extraktionsmittel hingegen lieferten 100- bis 1000-fach größere Matrixpeakflächen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass Cyclohexan unter den hier getesteten Lösemitteln das am besten geeignete für die Extraktion von möglichst reinem 20α -DHP bzw. Progesteron ist. Für eine rein quantitative Extraktion sind *tert*-Butylmethylether und Ethylacetat grundsätzlich ebenso gut geeignet. *Tert*-Butylmethylether ist allerdings aufgrund seines verhältnismäßig hohen Preises für Extraktionen mit großen Volumina aus ökonomischer Sicht nicht sinnvoll, wohingegen Ethylacetat für diese Art von Extraktion am besten geeignet ist. Daher wurde in allen folgenden Experimenten entweder Cyclohexan oder Ethylacetat als Extraktionsmittel verwendet.

Um einen Eindruck zu erlangen, welches Volumen des am besten geeigneten Extraktionsmittels für eine möglichst quantitative Extraktion benötigt wird, wurden jeweils verschiedene Volumenteile der JMN8-Umsatzkultur mit einem Volumenteil Cyclohexan extrahiert (Abbildung 10 (d)). Dabei zeigte sich, dass sich bei einem Cyclohexan:Kultur-Verhältnis von 1:10 eine gleichgroße Substanzmenge extrahieren lässt wie mit größeren (bis zu 1:1) Verhältnissen.

3.1.5 Bestimmung der Substratlöslichkeit

Die Steroidbiotransformationsaktivität eines Systems ist unter anderem wesentlich von der Substratkonzentration und damit von der maximalen Substratlöslichkeit im Reaktionsmedium abhängig. Daher wurde im Folgenden die maximale Löslichkeit von Progesteron und 20α -DHP in EMM bestimmt. Dazu wurden Lösungen mit Progesteron- bzw. 20α -DHP-Konzentrationen im Bereich zwischen $10\ \mu\text{M}$ und $1\ \text{mM}$ in $500\ \mu\text{l}$ EMM angesetzt. Ein Teil der Proben wurde direkt mit je $500\ \mu\text{l}$ Cyclohexan extrahiert und die Stoffkonzentration im Extrakt durch HPLC-Analysen bestimmt. Ein zweiter Teil wurde scharf abzentrifugiert ($10\ \text{min}$, $18000\ \text{g}$, RT), um nicht gelöste, in mikrokristalliner Form vorliegende Steroide aus dem Probenüberstand zu entfernen, bevor dieser Teil wie der erste Teil der Proben weiter behandelt wurde. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 11 dargestellt.

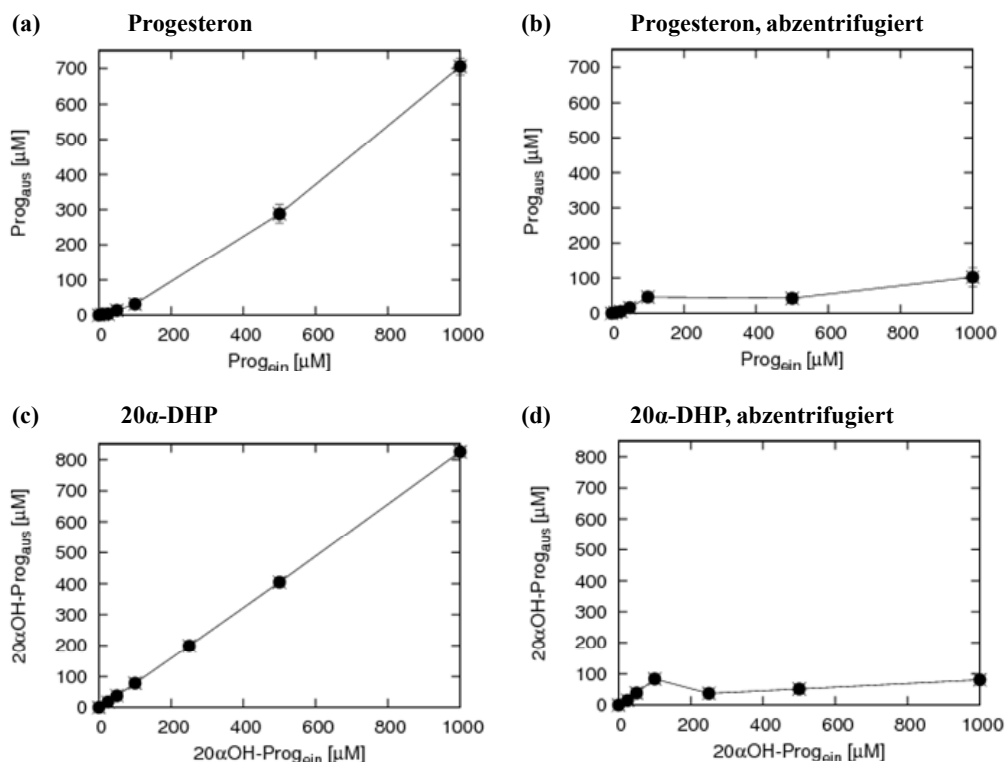


Abbildung 11: Bestimmung der maximalen Progesteron- bzw. 20α-DHP-Löslichkeit in EMM. Vergleich von Proben vor Zentrifugation ((a), (c)) und nach Zentrifugation für 10 min bei 18000 g und RT ((b), (d)). Konzentrationen im Bereich zwischen 10 μM und 1 mM wurden in 500 μl EMM eingestellt, die Proben bzw. deren Überstände im Verhältnis 1:1 (v/v) mit Cyclohexan extrahiert und die extrahierte Stoffmenge mittels HPLC-Analyse bestimmt.

Aus den Überständen nach Zentrifugation kann nur der gelöste Anteil der Substanz wiedergewonnen werden, während dagegen aus den Proben, die nicht abzentrifugiert wurden, theoretisch die gesamte zugesetzte Stoffmenge extrahiert werden kann. Die dabei auftretende Differenz zwischen zugesetzter („ein“) und wiedergefundener („aus“) Stoffmenge stellt den jeweiligen Extraktionsverlust dar. Wie aus Abbildung 11 (a) und (c) zu erkennen ist, liegt der Extraktionsverlust für diese Art der Extraktion bei 25 % für Progesteron und bei 15 % für 20α-DHP. Durch eine zweite Extraktion konnten weniger als 10 % mehr Substanz gewonnen werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieses eher geringen Zugewinns wurde bei allen folgenden Extraktionen auf Mehrfachextraktionen verzichtet. Beide Stoffe zeigen eine maximale Löslichkeit in EMM von unter 100 μM (Abbildung 11 (b) und (d)).

3.1.6 Klonselktion

Es wurden jeweils 10 Transformanten der neu hergestellten Expressionsstämme JMN7 und JMN8 wie unter 2.2.3.1 beschrieben einer Klonselktion unterzogen. Dabei wurden die Hefezellen im MTP-Format mit Progesteron inkubiert, um die Biotransformationsaktivität sowohl der einzelnen Transformanten untereinander als auch der beiden

Stämme gegeneinander zu vergleichen. Die Produktbildung wurde durch HPLC-Analyse bestimmt (Abbildung 12).

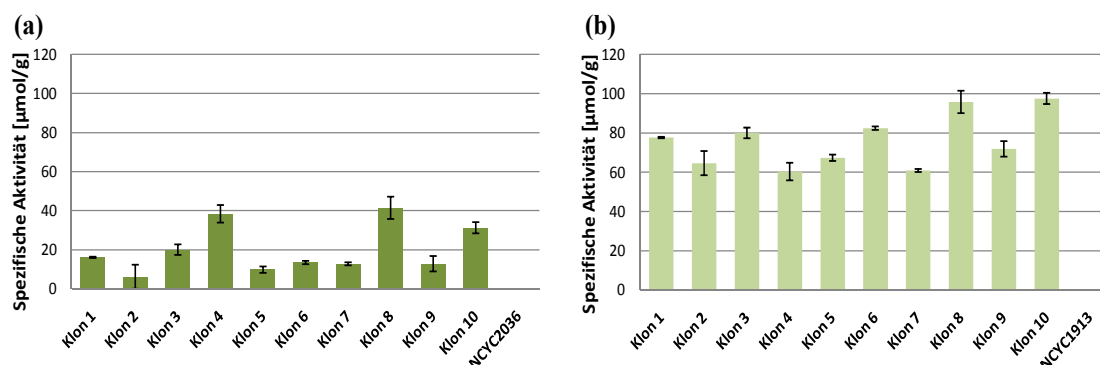


Abbildung 12: Biotransformationsaktivität von verschiedenen JMNs- (a) und JMNs-Transformanten (b) in MTPs. Die spezifische 20α -DHP-Bildungsaktivität wurde nach 24 h Inkubation bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit $500\text{ }\mu\text{M}$ Progesteron bestimmt. Die Daten wurden auf die Trockenbiomasse normalisiert.

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist zeigte der aktivste JMNs-Klon (Klon 8) eine spezifische Progesteron-Biotransformationsaktivität von $41\text{ }\mu\text{mol/g}$, wohingegen der aktivste Klon von JMNs (Klon 10) mit $98\text{ }\mu\text{mol/g}$ mehr als die doppelte Aktivität aufwies. JMNs-Zellen zeigten durchweg eine deutlich höhere Aktivität als Zellen von JMNs. Nur der jeweils aktivste Klon von JMNs und JMNs wurde in weiteren Experimenten verwendet. Aufgrund seiner höheren Umsatzaktivität wurde in den zunächst folgenden Progesteron-Biotransformationen JMNs eingesetzt. Die im Vergleich zu JMNs erhöhte Aktivität des Stamms JMNs ist möglicherweise auf eine höhere Kopienzahl der AKR1C1-Genkassette in diesem Stamm zurückzuführen.

3.1.7 Wachstumskinetik

Um das Wachstumsverhalten des AKR1C1-Expressionsstamms JMNs im Vergleich zu seinem Elternstamm NCYC1913 näher zu charakterisieren wurden Wachstumskinetiken (siehe 2.2.1.6) bestimmt mit dem Ziel, die spezifische Wachstumsrate μ zu ermitteln. Als Messparameter wurde die Trockenbiomasse im Kulturprobenvolumen benutzt. Weiterhin wurden die Proben verwendet um die Phänotypen der Hefezellen zu vergleichen. Um die AKR1C1-Expression in den JMNs-Zellen zu induzieren, wurden die Hefestämme in Abwesenheit von Thiamin im Kulturmedium inkubiert (Abbildung 13).

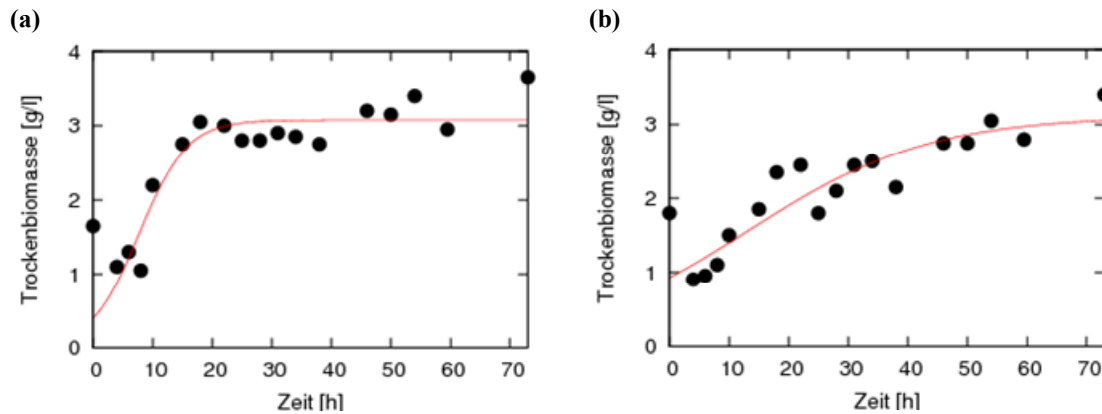


Abbildung 13: Wachstumskinetik des *S. pombe*-Stamms JMN8 (a) und seines Elternstamms NCYC1913 (b). Zellen wurden über 72 h bei 30 °C in EMM inkubiert. Exemplarisch ist jeweils ein Wachstumsexperiment gezeigt.

Der Phänotyp des AKR1C1-exprimierenden Stamms JMN8 ist vergleichbar mit dem des Elternstamms (nicht gezeigt), allerdings ist die spezifische Wachstumsrate μ von JMN8-Zellen mit $0,2 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$ etwa dreifach höher als die von NCYC1913-Zellen von $0,07 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$.

3.1.8 Expressionsregulierung

Um zu überprüfen, dass das AKR1C1-Gen im Stamm JMN8 unter der Kontrolle des durch Thiamin reprimierbaren Promotors *nmt1* steht, wurde sein Biotransformationsverhalten in An- und Abwesenheit von 5 μM Thiamin im Kulturmedium verglichen. Dazu wurde JMN8 in einem MTP-Experiment (siehe 2.2.3.3) mit 500 μM Progesteron über 24 h inkubiert und die 20 α -DHP-Konzentrationen nach der Biotransformation bestimmt (Abbildung 14).

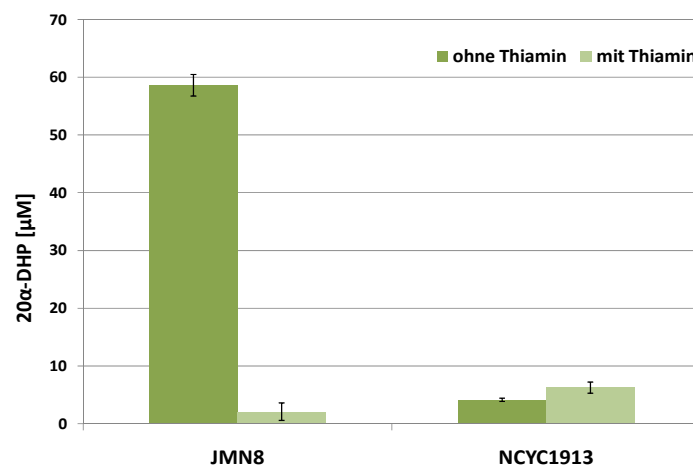


Abbildung 14: Durch Thiamin reprimierte AKR1C1-Aktivität in JMN8. Inkubation von 2×10^8 Zellen/ml JMN8 bzw. NCYC1913 (Kontrolle) mit 500 μM Progesteron in 1 ml EMM. Die Inkubation erfolgte über 24 h bei 30 °C in MTPs jeweils in An- und in Abwesenheit von 5 μM Thiamin im Kulturmedium. Alle Inkubationen wurden dreifach durchgeführt.

Es konnte wie erwartet gezeigt werden, dass die starke Aktivität des rekombinanten AKR1C1-Enzyms in JMN8 von $58 \pm 2 \mu\text{M/d}$ durch die Abwesenheit von Thiamin im Kulturmedium induziert wird. Es wurde lediglich eine sehr geringe Basisaktivität ($2 \pm 2 \mu\text{M/d}$), die auch im Ausgangsstamm beobachtet wird, detektiert, wenn bei ansonsten unveränderten Bedingungen $5 \mu\text{M}$ Thiamin zum Kulturmedium gegeben wurde. NCYC1913 zeigte mit einer Aktivität von $4,1 \pm 0,3 \mu\text{M/d}$ mit Thiamin bzw. $6 \pm 1 \mu\text{M/d}$ ohne Thiamin kaum eine Reaktion auf die Zugabe von Thiamin zum Reaktionsmedium. Damit konnte bewiesen werden, dass die im Vergleich zum Elternstamm NCYC1913 stark erhöhte Progesteron-Biotransformationsaktivität von JMN8 auf das Vorhandensein des korrekten pREP1-AKR1C1-Expressionskonstrukts zurückzuführen ist.

3.1.9 Zelldichteabhängige Umsatzrate

Im Folgenden wurde der Einfluss der Zelldichte auf die Metabolitenbildung untersucht. Grundsätzlich ist anzunehmen, dass sich eine gesteigerte Anzahl von Katalysatoren positiv auf die Umsatzrate auswirkt. Dazu wurden JMN8-Zellen mit $500 \mu\text{M}$ Progesteron über 24 h in MTPs inkubiert (siehe 2.2.3.3). Es wurden Anfangszelldichten im Bereich von 5×10^6 bis 1×10^9 Zellen/ml eingestellt. Nach der Inkubation wurde die 20α -DHP-Konzentration in den Zellsuspensionen mittels HPLC-Analyse bestimmt und die Umsatzrate halblogarithmisch gegen die Zelldichte aufgetragen (Abbildung 15).

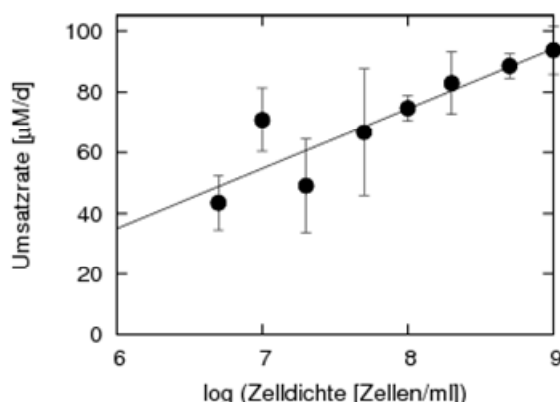


Abbildung 15: Progesteron-Umsatzrate in Abhängigkeit von der Zelldichte. Inkubationen von JMN8-Zellen (5×10^6 bis 1×10^9 Zellen/ml) mit $500 \mu\text{M}$ Progesteron in EMM über 24 h bei 30°C .

Es wurde eine annähernd lineare Beziehung ($R^2 = 0.807$) zwischen Zelldichte und 20α -DHP-Bildung festgestellt. Die Umsatzrate korreliert nicht ganz im Verhältnis 1:1 mit der Zelldichte. Es gibt jedoch keinen Hinweis auf einen negativen Einfluss hoher Zelldichten auf die Produktbildung. Dementsprechend wurden weitere Biotransformationsexperimente mit einer möglichst hohen Zelldichte durchgeführt, um eine möglichst große Umsatzaktivität zu erzielen.

3.1.10 Umsatzkinetiken

3.1.10.1 Temperaturabhängige Umsatzkinetik

Es wurde als nächstes untersucht, ob eine Erhöhung der Inkubationstemperatur von 30 °C auf 37 °C zu einer gesteigerten Biotransformationsaktivität von JMN8 führt. Dieses Verhalten konnte bereits bei einigen CYP-Enzymen in diesem Expressionssystem beobachtet werden (Drăgan, *et al.*, unveröffentlicht). Zu diesem Zweck wurde JMN8 wie unter 2.2.3.3 beschrieben über 24 h mit 500 µM Progesteron in MTPs inkubiert. Proben wurden nach 0, 1, 4, 8 und 24 h entnommen. Der 20α-DHP-Gehalt in den Proben wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt (Abbildung 16).

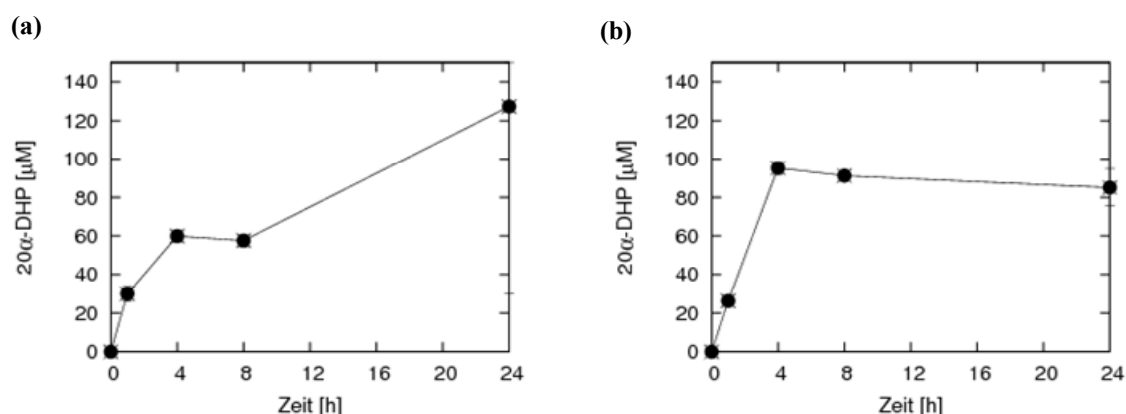


Abbildung 16: AKR1C1-Aktivität in JMN8 bei 30 °C (a) und 37 °C (b) Inkubationstemperatur. Inkubation von 2×10^8 Zellen/ml JMN8 mit 500 µM Progesteron in 1 ml EMM. Die Inkubation erfolgte über 24 h bei 30 °C bzw. 37 °C in MTPs.

Der Temperaturparameter hat in diesem Bereich nur sehr geringen Einfluss auf die Transformationsaktivität. Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur von 30 °C auf 37 °C scheint zwar in den ersten Stunden eine geringe Steigerung der Transformationsrate zu ermöglichen, allerdings zeigte sich bei längerer Inkubationsdauer eher ein leicht negativer Effekt. Daher wurden alle folgenden Experimente bei 30 °C durchgeführt.

3.1.10.2 Substratabhängige Umsatzkinetik

Im Folgenden wurde die Abhängigkeit der Biotransformationsaktivität von der Substratkonzentration untersucht. In einem MTP-Experiment (siehe 2.2.3.3) wurden JMN8-Zellen mit vergleichsweise niedrigen Progesteronkonzentrationen (25 µM bis 500 µM) über einen Zeitraum von 4 h in EMM mit einem Glucosegehalt von 50 g/l inkubiert. Die 20α-DHP-Konzentration in den Zellsuspensionen wurde regelmäßig bestimmt. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 17 dargestellt.

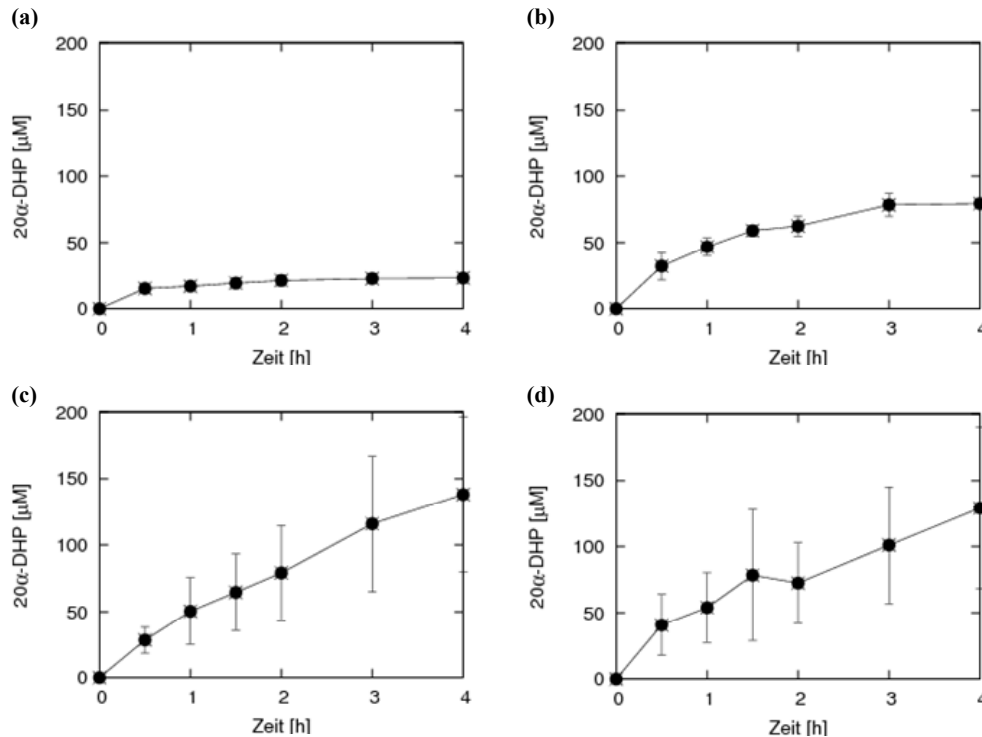


Abbildung 17: 20α-DHP-Konzentrationen in Inkubationsansätzen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Inkubationen von 2×10^8 Zellen/ml JMN8 mit 25 µM (a), 100 µM (b), 250 µM (c) und 500 µM (d) Progesteron in EMM mit 50 g/l Glucose über 4 h bei 30 °C.

Dieses Experiment zeigt, dass die Produktbildung annähernd konstant verläuft solange eine ausreichende Substratmenge verfügbar ist. In den Experimenten mit Anfangskonzentrationen von 25 µM und 100 µM Progesteron wurde nach einer bzw. drei Stunden fast Totalumsatz erreicht. Mittels linearer Regression wurden für diese Phase Umsatzraten von 20 ± 4 µM/h (25 µM Progesteron) und 31 ± 3 µM/h (100 µM Progesteron) berechnet. Bei höheren Substratkonzentrationen fand eine gleichmäßige Produktbildung während der gesamten Experimentdauer von vier Stunden statt, wobei sich Umsatzraten von 38 ± 2 µM/h (250 µM Progesteron) bzw. 36 ± 3 µM/h (500 µM Progesteron) ergaben. Bei einer Substratkonzentration um 250 µM wurde also die maximale Umsatzrate unter diesen Bedingungen erreicht.

Dennoch erwies sich dieses Experiment als zeitlich zu kurz und die untersuchten Substratkonzentrationen waren zu gering, um Aussagen über die Charakteristika in Langzeitexperimenten mit hohen Substratkonzentrationen, wie sie für erfolgreiche Produktionsprozesse benötigt werden, treffen zu können. Daher wurde untersucht, ob eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration möglicherweise einen negativen Effekt auf die Produktbildung zur Folge hat. Dazu wurde JMN8 in einem Langzeitexperiment (über 24 h mit häufiger Probenahme innerhalb der ersten 8 h) mit einer Zelldichte von 10^8 Zellen/ml über 24 h in EMM mit einem Glucosegehalt von 50 g/l in Schüttelkolben mit Progesteron-Anfangskonzentrationen von 100 µM, 500 µM, 1 mM

und 1,5 mM inkubiert. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 18 dargestellt.

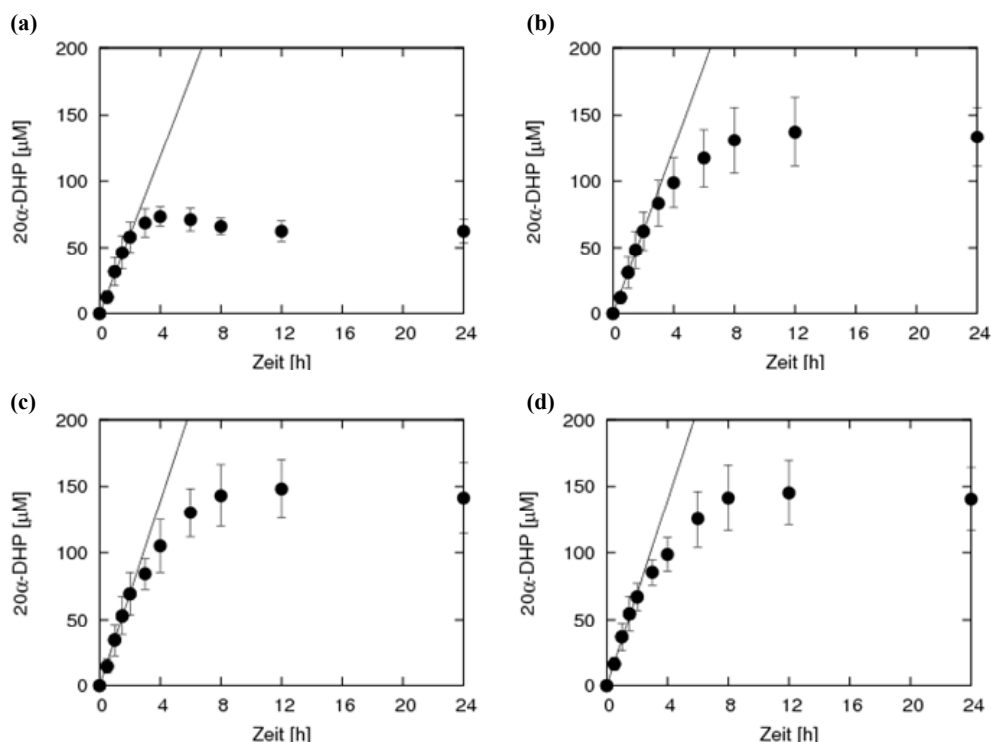


Abbildung 18: 20α-DHP-Konzentrationen in Inkubationsansätzen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Inkubationen von 10^8 Zellen/ml JMN8 mit 100 µM (a), 500 µM (b), 1 mM (c) und 1,5 mM (d) Progesteron in EMM mit 50 g/l Glucose über 24 h bei 30 °C.

Aus den Daten dieses Experiments ist erkennbar, dass auch hier bei allen untersuchten Progesteronkonzentrationen die Metabolitenbildungsrate während der ersten Stunden des Versuchs am höchsten war und dann abnahm, bis es letztlich zu keiner weiteren Produktbildung mehr kam. Während der ersten beiden Stunden betrug die Produktbildungsrate 30 ± 1 µM/h (100 µM Progesteron), 31 ± 1 µM/h (500 µM Progesteron) bzw. 35 ± 1 µM/h (1 mM und 1,5 mM Progesteron). Während der gesamten Versuchsdauer wurden etwa 65 µM 20α-DHP bei 100 µM Substratkonzentration hergestellt und etwa 140 µM 20α-DHP bei allen höheren untersuchten Substratkonzentrationen. Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass mit Progesteronkonzentrationen im Bereich um 250 µM die maximale Umsatzgeschwindigkeit unter diesen Bedingungen erreicht wird und dass eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration nicht zu höheren Umsatzzraten führt, aber ebenso keine Verminderung der Biotransformationsaktivität verursacht.

3.1.10.3 Glucoseabhängige Umsatzkinetik

Um den Einfluss verschiedener Glucosekonzentrationen im Inkubationsmedium auf die AKR1C1-abhängige Biotransformationsaktivität von Stamm JMN8 zu untersuchen wurden wie unter 2.2.3.2 beschrieben jeweils 2×10^8 Zellen/ml über 8 h in

Schüttelkolben in EMM mit Glucosegehalt von 20, 50 bzw. 100 g/l und 500 μM Progesteron kultiviert. In regelmäßigen Intervallen wurden die Produktbildung und die Glucosekonzentration in den Inkubationsansätzen bestimmt (Abbildung 19).

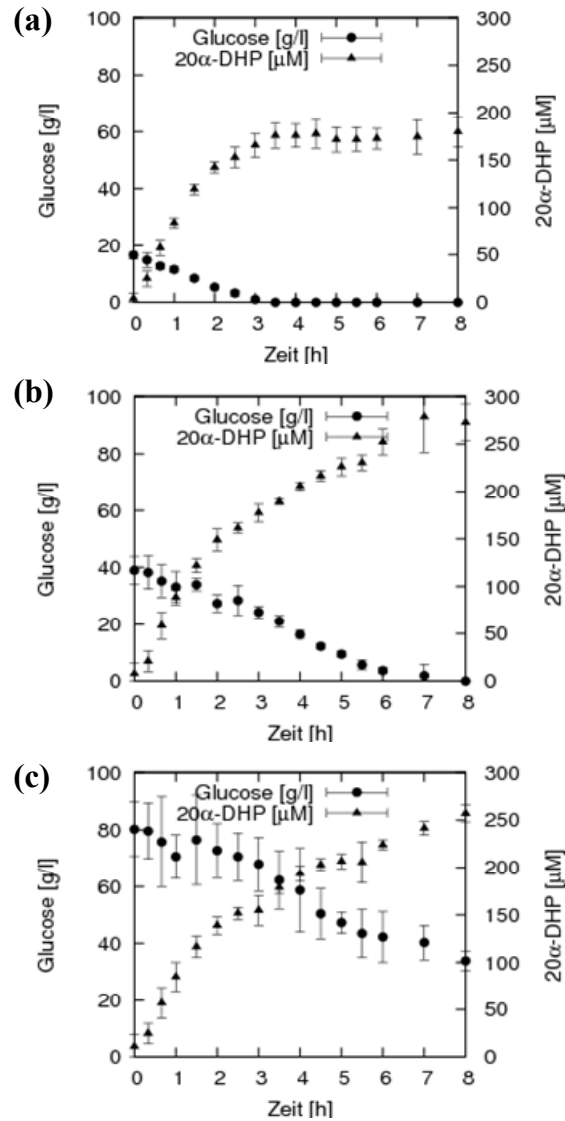


Abbildung 19: Zeitverlauf von 20 α -DHP-Konzentration und Glucosegehalt. Inkubationen von 2×10^8 Zellen/ml JMN8 in EMM mit Anfangsglucosekonzentrationen von 20 g/l (a), 50 g/l (b) und 100 g/l (c) über 8 h bei 30 °C mit 500 μM Progesteron.

Die Daten zeigen, dass die Metabolitkonzentration in den Inkubationsansätzen zunimmt, solange Glucose verfügbar ist. Wenn die Glucose verbraucht ist kommt die Produktbildung sofort zum Erliegen. In Kontrollansätzen mit Medium ohne Glucose war keine Produktbildung erkennbar (Daten nicht gezeigt). Die Biotransformationsaktivität hängt also von der Anwesenheit von Glucose im Medium ab. Die initialen Produktionsraten unterscheiden sich jedoch nicht, was darauf hindeutet, dass höhere Glucosekonzentrationen keine höheren Biotransformationsaktivitäten zur Folge haben.

3.1.11 Versuche zur Etablierung eines Inhibitortestsystems

Beim Menschen ist eine erhöhte AKR1C1-Aktivität mit einer Reihe verschiedenster gesundheitlicher Probleme verbunden (Griffin, *et al.*, 2001, Piekorz, *et al.*, 2005, Rizner, *et al.*, 2006). Daher werden Anstrengungen unternommen, selektive und potente Inhibitoren der AKR1C1 zu identifizieren (Usami, *et al.*, 2002, Higaki, *et al.*, 2003, Bauman, *et al.*, 2005). Dazu werden Testsysteme benötigt, die einfach und ohne großen Zeitaufwand anzuwenden sind und darüberhinaus die Testung einer großen Vielfalt an Substanzen zulassen. Um herauszufinden ob sich AKR1C1-exprimierende *S. pombe*-Zellen möglicherweise als Testsystem für die Suche nach potentiellen neuen Inhibitoren eignen, wurde versucht, eine Inhibierung der JMN8-Biotransformationsaktivität mit den bereits bekannten AKR1C1-Inhibitoren 7-Hydroxyflavon, Acetylsalicylsäure, Salicylsäure und 3,5-Diiodosalicylsäure zu erreichen.

Die Inhibitortests wurden im MTP-Format grundsätzlich wie unter 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. In Vorexperimenten wurden geeignete Testbedingungen ermittelt. Gute Progesteron-Umsatzraten wurden bei einer Durchführung der Biotransformation in 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit 50 g/l Glucose bei einem pH-Wert von 7,4 erreicht (Daten nicht gezeigt). Um zu gewährleisten, dass sich beim Beginn des Progesteronumsatzes die Inhibitorsubstanz bereits an ihrem Wirkungsort in der Zelle befindet, wurden alle Ansätze 15 min bei Raumtemperatur mit den Inhibitoren in Konzentrationen im Bereich zwischen 0 und 1000 μM vorinkubiert, bevor das Substrat zugegeben wurde. Die weitere Inkubation erfolgte dann mit 100 μM Progesteron über einen Zeitraum von 2 h bei 30 °C. Die Konzentration an gebildetem 20 α -DHPs in den Inkubationsansätzen wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt und gegen die jeweilige Inhibitorkonzentration aufgetragen (Abbildung 20).

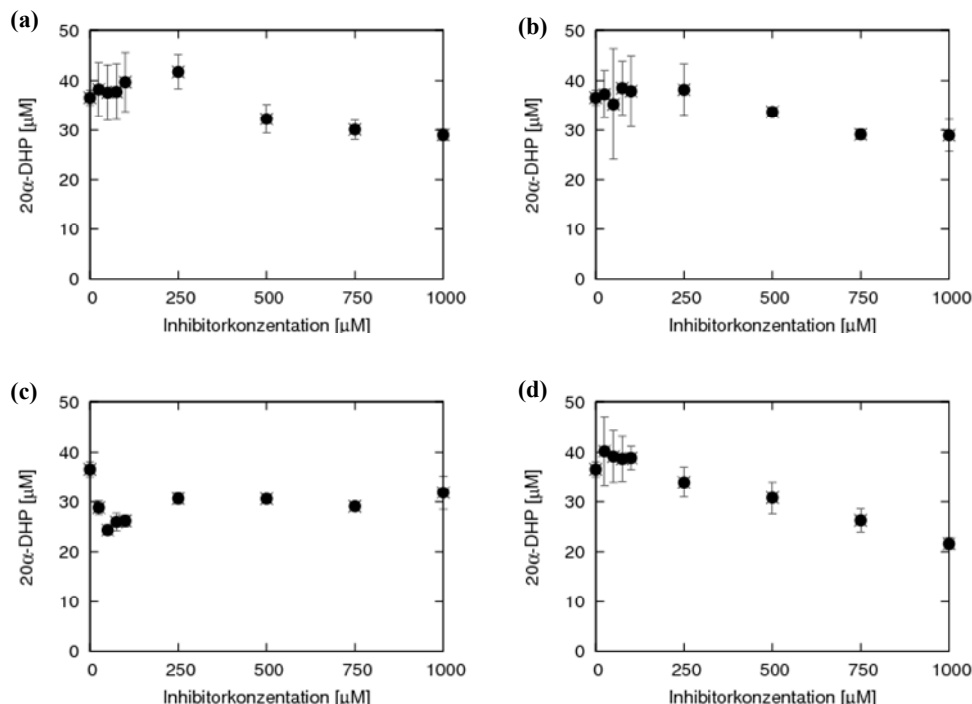


Abbildung 20: Inhibitortests. JMN8-Biotransformationsaktivität nach Zugabe der AKR1C1-Inhibitoren Salicylsäure (a), Acetylsalicylsäure (b), 7-Hydroxyflavon (c) und 3,5-Diiodosalicylsäure (d) in Konzentrationen von 25 bis 1000 μM . Inkubationen von 2×10^8 Zellen/ml in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 mit 50 g/l Glucose und 100 μM Progesteron. Die Inkubationen erfolgten über 2 h bei 30 °C.

Wie diesen Daten zu entnehmen ist bewirkt unter diesen Bedingungen keine der vier getesteten Inhibitorsubstanzen eine nennenswerte Inhibierung der AKR1C1-abhängigen Biotransformation von Progesteron mit JMN8. Lediglich die Zugabe vergleichsweise hoher Konzentrationen von 3,5-Diiodosalicylsäure (über 500 μM) führt zu einer leicht verringerten Produktbildung. Da bei Inhibitortestsystemen eine möglichst starke inhibitorische Wirkung bereits bei geringen Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors auftreten sollte ist JMN8 unter den getesteten Bedingungen für den Aufbau eines Inhibitortestsystems eher uninteressant, weshalb keine weiteren AKR1C1-Inhibitortests durchgeführt wurden.

3.1.12 Biotransformation von Dydrogesteron

Bisher wurde gezeigt, dass die AKR1C1-Expressionsstämme JMN7 und JMN8 in der Lage sind, die 20-Ketogruppe von Progesteron zu reduzieren und so 20 α -DHP zu produzieren. Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob diese Spalthefernstämme ebenfalls in der Lage sind, das aus kommerzieller Sicht als Substrat interessante synthetische Progestogen Dydrogesteron in gleicher Weise umzusetzen. Erste Biotransformationsversuche mit Dydrogesteron als Substrat wurden analog zu den ersten Progesteron-Biotransformationsversuchen (vgl. 3.1.3) im 10 ml-Maßstab in Erlenmeyerkolben durchgeführt. Zum Vergleich wurde der Elternstamm NCYC2036 ebenfalls getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Als Referenz wurden Dydrogesteron

und 20α -DHD als Reinsubstanzen unter gleichen Bedingungen analysiert (Abbildung 22). Zusätzlich sind die UV-Spektren, die vom Fotodiodenarray-Detektor während der HPLC-Analyse aufgezeichnet wurden, in einem Konturendiagramm in Abbildung 23 gezeigt.

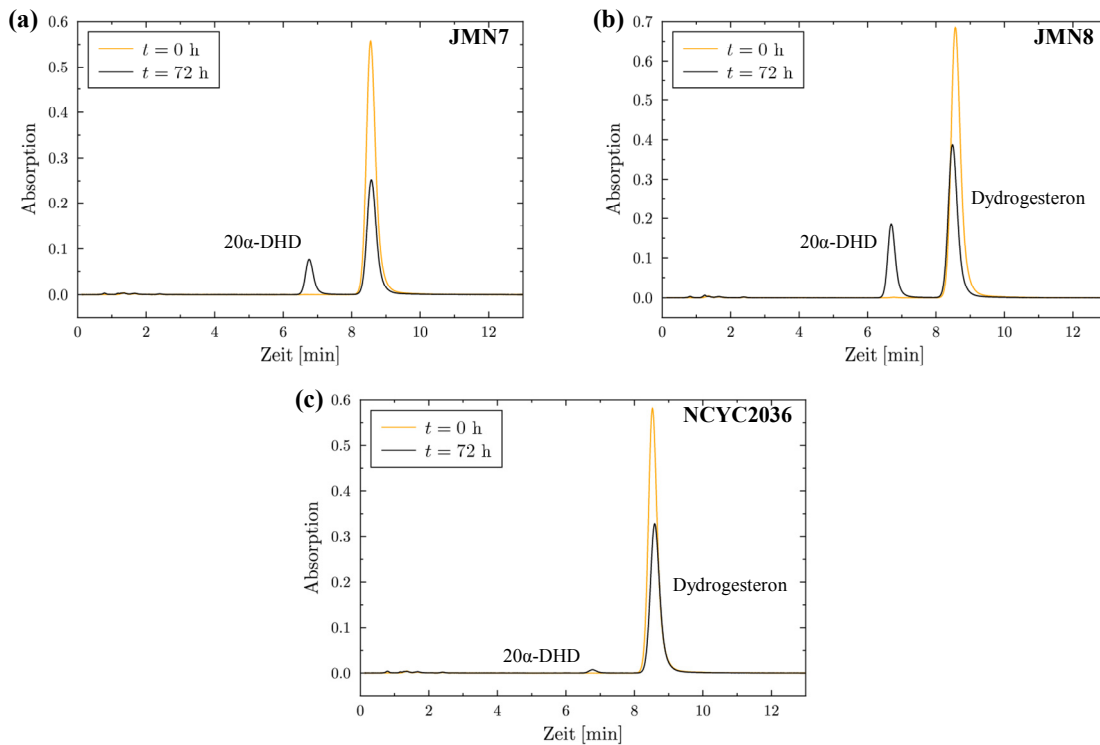


Abbildung 21: Biotransformation von Dydrogesteron mit JMN7, JMN8 und NCYC2036. HPLC-Chromatogramme ($\lambda = 290$ nm) von Kulturüberständen der Stämme JMN7 (a), JMN8 (b) und NCYC2036 (c) nach 0 h (gelbe Linie) und 72 h (schwarze Linie) Inkubation bei 30 °C mit 1 mM Dydrogesteron. Die initiale Zelldichte der Kulturen betrug 10^8 Zellen/ml.

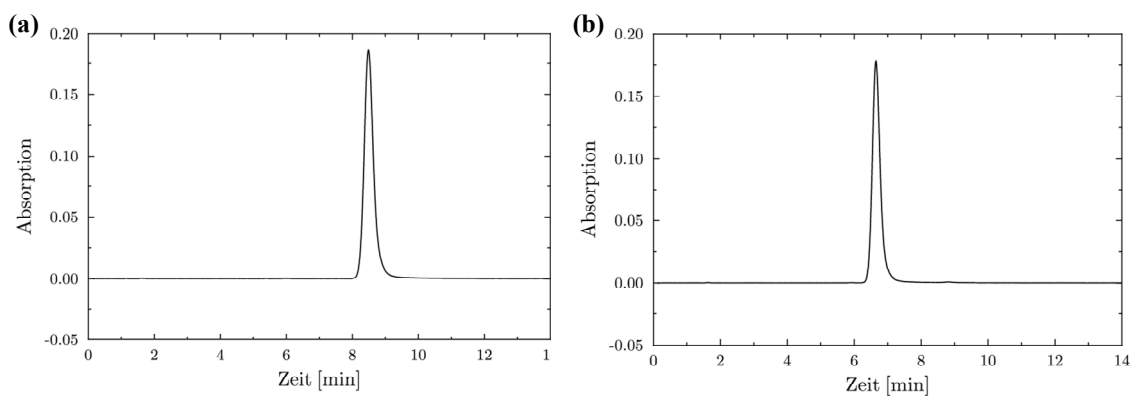


Abbildung 22: Analyse der Referenzstandardsubstanzen. HPLC-Chromatogramme ($\lambda = 290$ nm) von Dydrogesteron (a) und 20α -DHD (b).

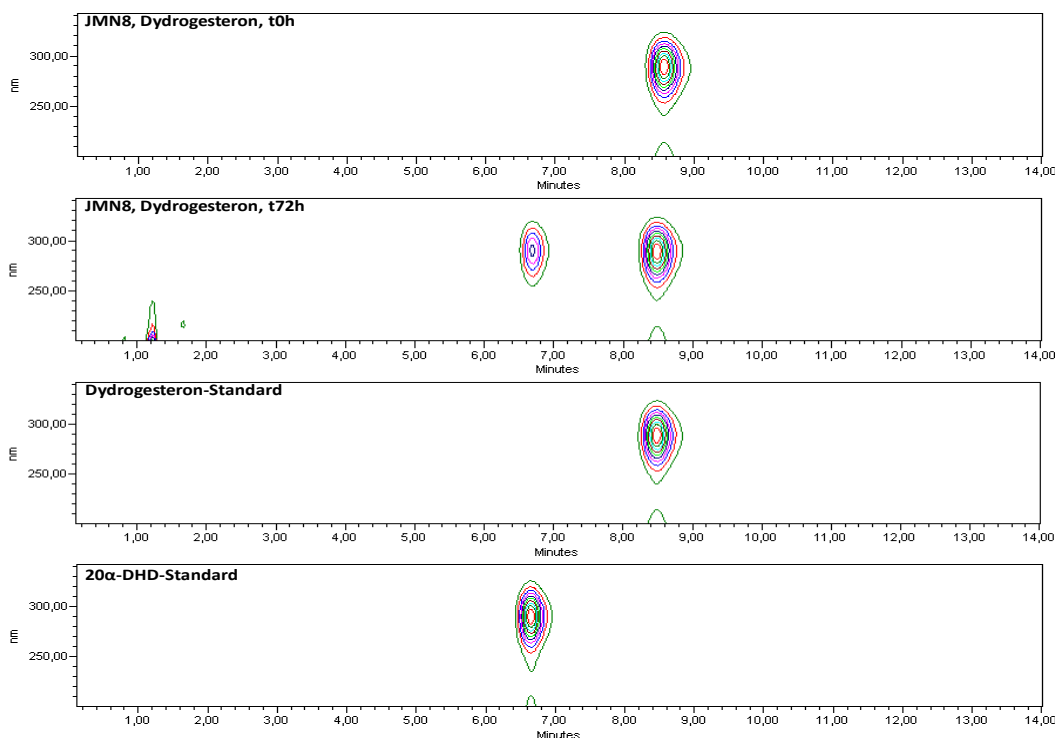


Abbildung 23: Konturendiagramme der HPLC-Daten und Spektren des Fotodiodenarray-Detektors ($\lambda = 200 - 350 \text{ nm}$). Die Abbildung zeigt die Konturendiagramme der ausgewählten Daten aus Abbildung 21 und Abbildung 22.

Eine zeitabhängige Dydrogesteronbiotransformation konnte bei beiden AKR1C1-exprimierenden Stämmen beobachtet werden, wobei auch hier die Produktbildungsrate von JMN8 mit $95 \mu\text{M/d}$ deutlich höher war als die von JMN7 mit $68 \mu\text{M/d}$. Die Identität des gebildeten Produkts konnte später durch NMR-Strukturanalysen eindeutig als 20α -DHD bestätigt werden (siehe Anhang B). Eine Biotransformationsaktivität des Elternstamms NCYC2036 war ebenfalls detektierbar, allerdings mit $6 \mu\text{M/d}$ sehr schwach (Abbildung 21). Retentionszeit und UV-Spektrum des gebildeten Produkts entsprachen denen der 20α -DHD-Reinsubstanz (Abbildung 22 und Abbildung 23). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der aktivere Stamm JMN8 auch für die weiteren Biotransformationsreaktionen von Dydrogesteron verwendet.

3.1.13 Untersuchung der Substratspezifität

Nachdem somit gezeigt worden war, dass der rekombinante Stamm JMN8 die Reduktion der 20-Ketogruppe sowohl des natürlichen AKR1C1-Substrats Progesteron als auch synthetischen Progestogens Dydrogesteron zu der jeweiligen 20α -Hydroxygruppe effektiv katalysiert, wurde das Substratspektrum dieses Systems näher untersucht. Dazu wurde die Biotransformationsaktivität von JMN8 bezüglich sieben weiterer strukturverwandter Steroide, die ebenfalls eine 20-Ketogruppe enthalten (Pregnenolon, 17α -Hydroxyprogesteron, 11-Deoxycortisol, Cortisol, 11-Deoxycorticosteron, Corticosteron und Aldosteron) im Vergleich zu Progesteron und Dydrogesteron

näher betrachtet. In einem MTP-Experiment (siehe 2.2.3.3) wurden die Stämme JMN8 bzw. dessen Elternstamm NCYC1913 (Kontrolle) über 24 h mit den jeweiligen potentiellen Substraten mit einer Endkonzentration von 500 μM inkubiert. Nach der Biotransformation wurde die Produktbildung in den Zellsuspensionen durch HPLC-Analysen untersucht (Abbildung 24).

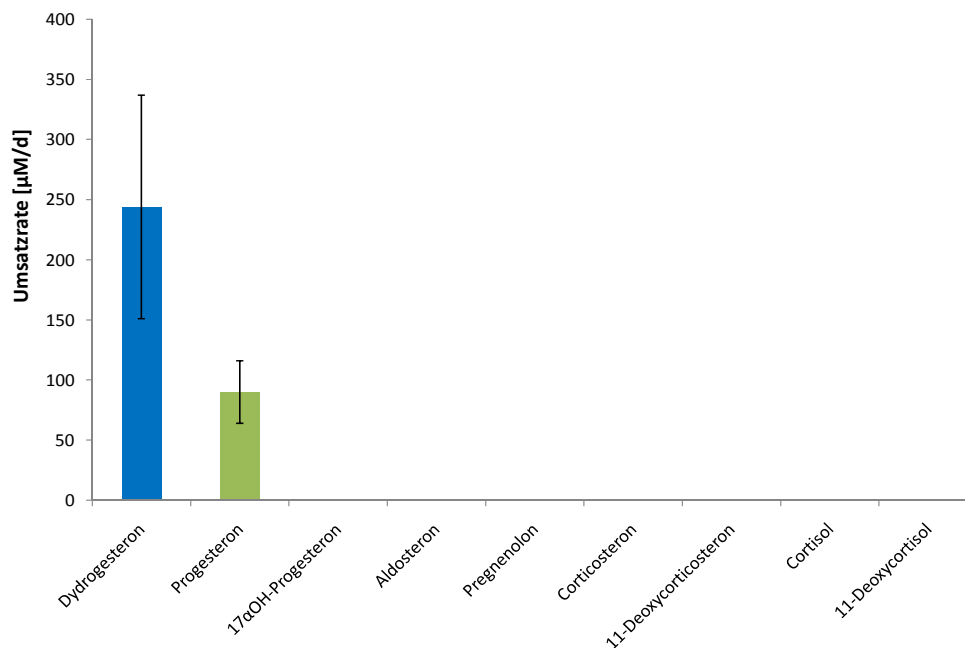


Abbildung 24: Umsatz verschiedener Steroide und steroidähnlicher Substanzen, die eine 20-Ketogruppe enthalten mit JMN8. Inkubationsansätze (EMM) enthielten 500 μM Substrat und 2×10^8 Zellen/ml, die Inkubation erfolgte über 24 h bei 30 °C.

Unter diesen Bedingungen wurden ausschließlich Progesteron und Dihydrogesteron erfolgreich zum entsprechenden 20 α -hydroxylierten Produkt umgesetzt, während alle anderen Substanzen unverändert blieben. Die Ganzzell-Biotransformationsraten von 90 (± 26) $\mu\text{M}/\text{d}$ 20 α -DHP und 244 (± 93) $\mu\text{M}/\text{d}$ 20 α -DHD wurden aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Diese Ergebnisse zeigen, dass Dihydrogesteron ein noch besseres Substrat für das in JMN8 rekombinant exprimierte AKR1C1-Enzym ist als das physiologische Progesteron. In allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Umsatzexperimenten wurde niemals die Bildung von Nebenprodukten festgestellt.

3.2 Prozessentwicklung mit dem Stamm JMN8

Mit JMN7 und JMN8 waren zwei Hefestämme konstruiert worden, welche die humane AKR1C1 funktionell exprimieren und in der Lage sind, die 20-Ketogruppe des natürlichen Substrats Progesteron sowie des synthetischen Progestogens Dihydrogesteron zu einer 20 α -Hydroxygruppe zu reduzieren. Dabei zeigte JMN8 deutlich höhere Umsatzaktivitäten als JMN7 und wurde daher für die weiteren Biotransformations-

experimente verwendet. Mit diesem System wurde eine Reihe verschiedener potentieller AKR1C1-Substrate hinsichtlich ihres Umsatzes getestet, jedoch konnten unter diesen Bedingungen nur Progesteron und Dydrogesteron erfolgreich transformiert werden. Da Dydrogesteron sogar mit höherer Aktivität umgesetzt wird als das physiologische Substrat wurde im Folgenden zunächst die Produktion von 20α -DHD mit JMN8 optimiert, bevor 20α -DHP produziert wurde. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden daher verschiedene Prozessführungen beschrieben, die zur besseren Orientierung in alphabetischer Reihenfolge bezeichnet werden.

3.2.1 Substratabhängige Wachstumskinetik

Um den Einfluss von Dydrogesteron als Biotransformationssubstrat auf das Wachstumsverhalten des AKR1C1-Expressionsstamms JMN8 zu untersuchen, wurde der Stamm JMN7 sowie der entsprechende Elternstamm NCYC1913 wie unter 2.2.1.6 beschrieben mit 1 mM Dydrogesteron im Kulturmedium betrachtet. Die spezifische Wachstumsrate μ wurde bestimmt und der Phänotyp der Hefezellen wurde jeweils überprüft. Um die AKR1C1-Expression in den JMN8-Zellen zu induzieren, wurden die Hefestämme in Abwesenheit von Thiamin inkubiert (Abbildung 25).

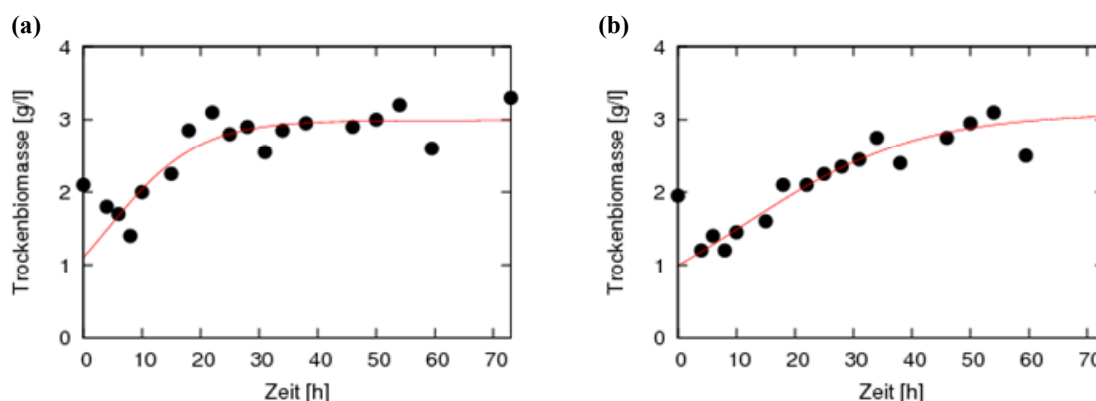


Abbildung 25: Wachstumskinetik des *S. pombe*-Stamms JMN8 (a) und seines Elternstamms NCYC1913 (b) unter Substrateinfluss. Zellen wurden über 72 h bei 30 °C in EMM mit 1mM Dydrogesteron inkubiert. Exemplarisch ist jeweils ein Wachstumsexperiment gezeigt.

Auch mit Substrat sind JMN8-Zellen zu schnellerem Wachstum fähig als NCYC1913-Zellen, wobei der Unterschied unter Substrateinfluss geringer ausfällt (vgl. 3.1.7). Während Dydrogesteron in diesem Experiment einen negativen Einfluss auf das Wachstum von JMN8 hat (verringerte spezifische Wachstumsrate $\mu = 0,1 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$), wirkt es sich kaum auf das Wachstum des Elternstamms aus ($\mu = 0,1 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$). Das phänotypische Erscheinungsbild beider Stämme ist unter dem Einfluss von Dydrogesteron deutlich granulierter als ohne Substratzugabe, allerdings unterscheiden sich die beiden Stämme untereinander im Phänotyp nicht (nicht gezeigt).

3.2.2 Substratabhängige Umsatzkinetik

Da sich bereits in vorangegangenen Biotransformationsexperimenten mit Progesteron als Substrat (vgl. 3.1.10.2) gezeigt hatte, dass die Umsatzrate in gewissem Maße von der Substratkonzentration im Reaktionsmedium abhängig ist, wurde im Folgenden die Abhängigkeit der Biotransformationsaktivität von der Dydrogesteronkonzentration untersucht. Im Hinblick auf den Aufbau eines geeigneten Produktionsverfahrens für 20α -DHD wurden die Substratkonzentrationen und die Inkubationsdauer in einem Bereich gewählt, der sich auch für die Produktion größerer Metabolitmengen eignet. Analog zu den vorausgegangenen entsprechenden Experimenten mit Progesteron als Substrat wurde der Stamm JMN8 mit einer Zelldichte von 10^8 Zellen/ml in EMM mit einem Glucosegehalt von 50 g/l in Schüttelkolben mit Dydrogesteronkonzentrationen von 100 μM , 500 μM , 1 mM und 1,5 mM für 24 h inkubiert. Die 20α -DHD-Konzentration in den Kulturen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abbildung 26).

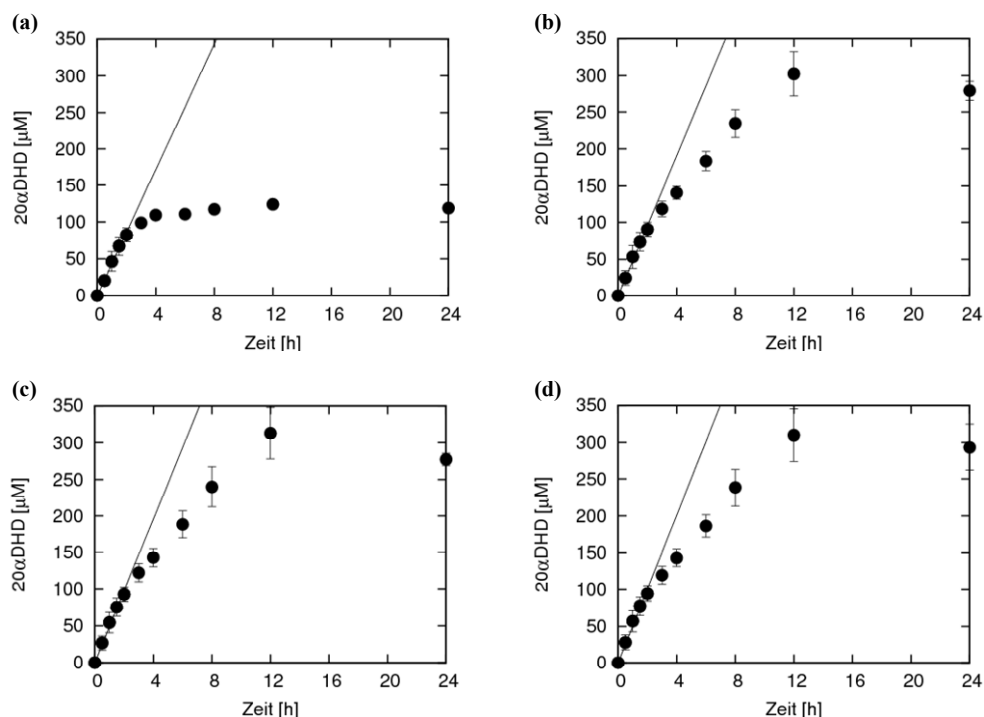


Abbildung 26: 20α -DHD-Produktion durch JMN8 in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Inkubationen von 10^8 Zellen/ml JMN8 mit 100 μM (a), 500 μM (b), 1 mM (c) und 1,5 mM (d) Dydrogesteron in EMM mit 50 g/l Glucose über 24 h bei 30 °C.

Dieses Experiment zeigt, wie bereits zuvor für Progesteron als Substrat beobachtet (vgl. 3.1.10.2), dass bei allen untersuchten Substratkonzentrationen die Metabolitenbildungsrate während der ersten drei bis vier Stunden des Versuchs am höchsten ist und dann abnimmt, bis es letztlich zu keiner weiteren Produktbildung mehr kommt. Mittels linearer Regression wurden für diese erste Phase folgende Umsatzraten berechnet: $43 \pm 1 \mu\text{M/h}$ (100 μM Dydrogesteron), $48 \pm 2 \mu\text{M/h}$ (500 μM Dydrogesteron), $49 \pm 2 \mu\text{M/h}$

(1 mM Dydrogesteron) bzw. $50 \pm 2 \mu\text{M/h}$ (1,5 mM Dydrogesteron). Die finale Produktkonzentration betrug bei Substratkonzentrationen ab $500 \mu\text{M}$ etwa $300 \mu\text{M}$. Auch im Falle von Dydrogesteron führt die Erhöhung der Substratkonzentration auf mehr als $100 \mu\text{M}$ kaum mehr zu einer Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit, was darauf hindeutet, dass auch hier die maximale Umsatzrate bereits mit Substratkonzentrationen zwischen 100 und $500 \mu\text{M}$ erreicht wird. Obwohl eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration nicht zu höheren Umsatzraten führt, verursacht sie aber ebenso keine Verminderung der Biotransformationsaktivität.

3.2.3 *Fed-batch*-Produktion von 20α -DHD im 1 l-Bioreaktor – Prozessführung A

Das Ziel der ersten Biotransformationsexperimente mit Dydrogesteron im Bioreaktor war in erster Linie, das 20α -DHD in ausreichenden Mengen für eine anschließende Strukturanalyse zu produzieren, so dass seine Identität eindeutig bewiesen werden konnte. Diese Biotransformation von Dydrogesteron mit dem Stamm JMN8 wurde als *fed-batch*-Kultur im Biostat M 2 L-Bioreaktor durchgeführt (siehe 2.2.3.4). Als Kulturmedium diente 1 l EMM. Dieses wurde mit JMN8-Zellen einer 100 ml-Kultur beimpft, die über 24 h herangezogen worden war. Der pH-Wert der Fermentationskultur betrug konstant 4,1. Das *feeding* der Kultur erfolgte durch manuelle, punktuelle Zugabe einer konzentrierten Glucoselösung. Nach einer 25-stündigen Biomasseanzuchtsphase, die im reinen *batch*-Verfahren ablief, wurde eine Substratkonzentration von 1 mM eingestellt. Nach einer Prozesslaufzeit von 25 h bzw. 50 h wurden jeweils 50 ml Glucoselösung (400 g/l Glucose) zugeführt. Der Fermentationsprozess wurde über weitere 75 h fortgeführt, was einer Gesamtfermentationsdauer von etwa 100 h entspricht. Die HPLC-Chromatogramme der ersten und der letzten Biotransformationsprobe werden in Abbildung 27 gezeigt.

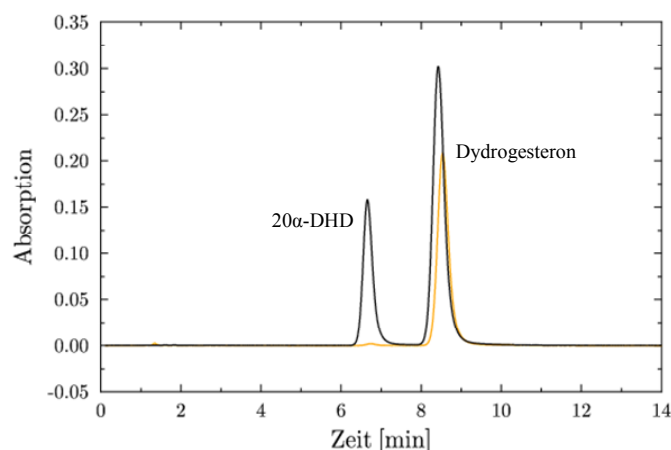


Abbildung 27: Biotransformation von Dydrogesteron im 2 l-Bioreaktor. HPLC-Chromatogramm ($\lambda = 290 \text{ nm}$) von JMN8-Zellsuspension nach Inkubation mit 312 mg (1 mmol) Dydrogesteron bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Proben wurden nach 25 h (0 h Biotransformation, orange Linie) und 100 h (75 h Biotransformation, schwarze Linie) Fermentationsdauer entnommen.

Entsprechend des Diagramms in Abbildung 27 waren nach 75 h Biotransformation 30 % des Substrats umgesetzt worden. Unter der Annahme, dass Elternsubstanz und Metabolit ähnliche Absorptionskoeffizienten aufweisen, enthielt der Kulturüberstand zu diesem Zeitpunkt also 300 μmol Produkt. Aus diesen Daten ergibt sich eine durchschnittliche 20α -DHD-Produktionsrate von $31 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($97 \text{ }\mu\text{M}/\text{d}$) für die gesamte Biotransformationszeit von 75 h. Die relative 20α -DHD-Menge, die zuvor durch Biotransformationen in MTPs oder Schüttelkolben produziert werden konnte, ist damit im Fermenter-Maßstab unter diesen Bedingungen noch nicht reproduzierbar.

Als nächstes erfolgte eine Reinigung der Steroide. Dazu wurde die Fermentationskultur abzentrifugiert (5 min, 3000 g, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Dieser Schritt hatte zwar einen Substanzverlust zur Folge, bewirkte jedoch eine Verschiebung des Produkt:Substrat-Verhältnisses zu Gunsten des Produkts. So konnte durch anschließende Flüssig-flüssig-Extraktion des Fermenterüberstands mit Cyclohexan ein Produkt erhalten werden, welches deutlich weniger mit Substrat verunreinigt war als wäre die Gesamtkultur extrahiert worden. Nach dem Eindampfen des Lösemittels wurden ca. 5 mg ($16 \text{ }\mu\text{mol}$) gelbliche Kristalle erhalten, was ca. 16 % der theoretischen Maximalausbeute entspricht. Vom gereinigten Produkt wurde eine HPLC-Analyse angefertigt (Abbildung 28).

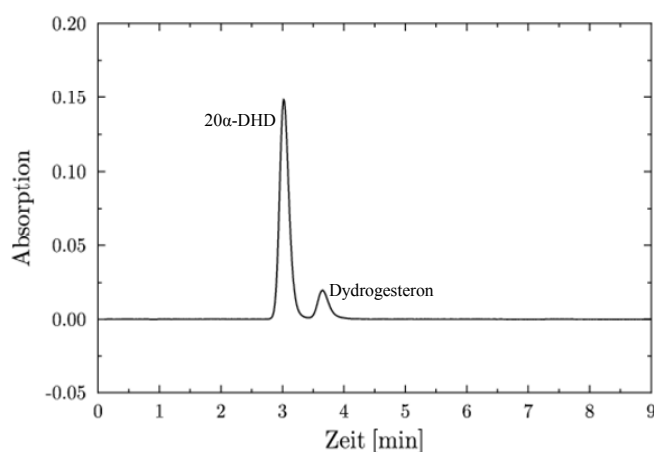


Abbildung 28: HPLC-Chromatogramm ($\lambda = 290 \text{ nm}$) des gereinigten Produkts aus der Dydrogesteronbiotransformation im 2 l-Bioreaktor. Entsprechend diesem Diagramm beträgt die Produktreinheit ca. 87 %.

Die HPLC-Analyse des Produkts weist eine Reinheit von 87 % auf, wobei es sich bei der einzig detektierbaren Verunreinigung um das Substrat handelt. Das gereinigte Produkt wurde durch Dr. Josef Messinger (Solvay Pharmaceuticals GmbH) per NMR analysiert. Diese Analyse bewies eindeutig, dass es sich bei der produzierten Substanz um 20α -DHD handelte. Die entsprechenden NMR-Spektren werden im Anhang gezeigt.

3.2.4 Fed-batch-Produktion von 20 α -DHD im 10 l-Bioreaktor – Prozessführung B

Die 20 α -DHD-Produktion im 1 l-Maßstab lieferte erste wichtige prozesstechnische Erkenntnisse für den Aufbau eines ausgereiften Produktionssystems. Der folgende Schritt war nun die maßstabgerechte Vergrößerung des Fermentervolumens um den Faktor 10, um erste Hinweise auf Verhalten und Veränderungen des vorhandenen Systems in einem größeren Herstellungsmaßstab zu erhalten.

Diese Biotransformationen von Dydrogesteron wurden mit dem Stamm JMN8 im Biostat-Bioreaktor durchgeführt, wie unter 2.2.3.5 beschrieben. Exemplarische Daten einer Biotransformation im 10 l-Maßstab werden in Abbildung 29 und Abbildung 30 gezeigt.

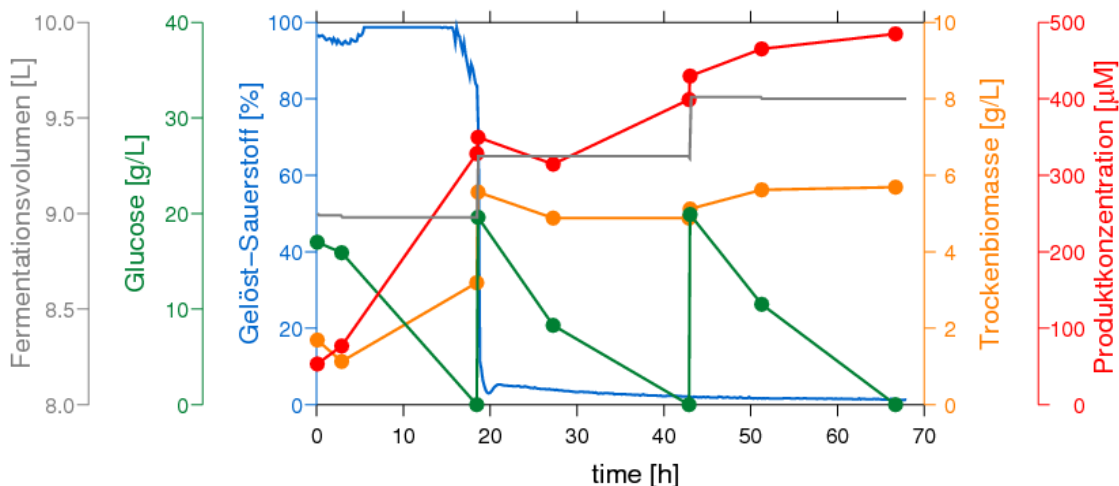


Abbildung 29: Biotransformation von Dhydrogesteron im 10 l-Fermenter. Fed-batch-Kultur von JMN8 in EMM mit 500 μ M Dhydrogesteron bei 30 °C. pH-Wert und Gelöst-Sauerstoff wurden kontinuierlich gemessen. Proben wurden regelmäßig entnommen und bezüglich Glucosekonzentration, Trockenbiomasse und Produktbildung untersucht. Die Gesamtbiotransformationszeit betrug ca. 67 h.

Wie aus Abbildung 29 ersichtlich ist, wiesen die ersten 24 h der Fermentation die stärkste Biomassezunahme (von etwa 1,7 g/l auf 5,6 g/l Trockenbiomasse) und Produktbildung (ca. 350 μ M/d) auf. Die weitere Biotransformation zeigt eine relativ konstante Biomassekonzentration bei kontinuierlicher Produktionsrate um 67 μ M/d. Der Sauerstoffgehalt im Kulturmedium verringerte sich in den ersten 24 h auf ca. 80 %, nach der Reduzierung der Belüftungsrate auf 2 l/min stagnierte dieser Wert bei unter 10 %. Es wurden insgesamt drei Fermentationen unter gleichen Bedingungen im 10 l-Bioreaktor durchgeführt. Dabei waren die Fermentationsverläufe gut reproduzierbar. Am Ende war das Substrat jeweils zu 90-97 % umgesetzt worden. Beispielhafte HPLC-Chromatogramme einer Probe vom Anfang und einer vom Ende einer Fermentation sind in Abbildung 30 gezeigt.

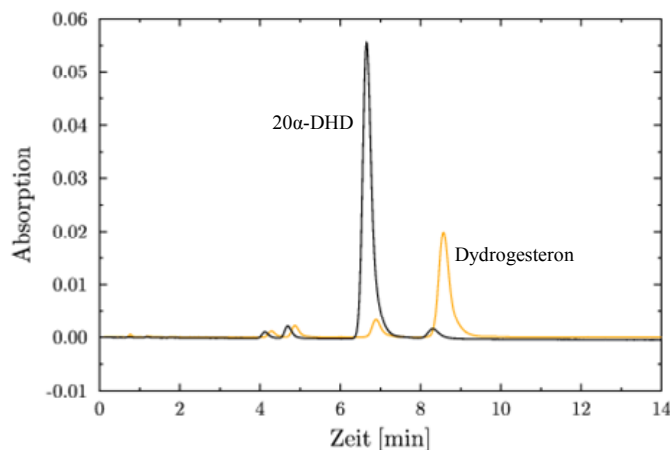


Abbildung 30: Biotransformation von Dydrogesteron im 10 l-Fermenter. HPLC-Chromatogramm ($\lambda = 290 \text{ nm}$) von JMN8-Kulturüberstand nach Inkubation mit $500 \mu\text{M}$ Dydrogesteron. Proben wurden nach 0 h (orange Linie) und 67 h (schwarze Linie) Biotransformation bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ entnommen.

Entsprechend des Diagramms in Abbildung 30 betrug die Produktreinheit im Kulturüberstand am Ende der Biotransformation (nach 67 h) etwa 97 %. Der Kulturüberstand enthielt zu diesem Zeitpunkt also $485 \mu\text{M}$ Produkt, was einer durchschnittlichen 20α -DHD-Produktionsrate für dieses Produktionssystem von ca. $175 \mu\text{M/d}$ (oder 485 mg/d) entspricht. Damit konnte die 20α -DHD-Bildungsrate, die zuvor im 2 l-Bioreaktor erreicht worden war ($97 \mu\text{M/d}$), im 10-fach höheren Volumen und unter ansonsten gering veränderten Fermentationsbedingungen nicht nur reproduziert, sondern fast verdoppelt werden.

Mit der gleichen Flüssig-flüssig-Extraktionsstrategie wie bereits zuvor für die 1 l-Kultur verwendet, konnten durchschnittlich ca. 200 mg 20α -DHD aus 10 l Fermentationsüberstand gewonnen werden, was ca. 13 % der theoretischen Maximalausbeute entspricht. Die Reinheit des isolierten Produkts wurde abschließend mittels HPLC-Analyse überprüft und betrug durchschnittlich etwa 95 % (Daten nicht gezeigt). Die in bisherigen Biotransformationen von Dydrogesteron mit JMN8 erreichte Produktausbeute ist dennoch zu gering für ein effizientes 20α -DHD-Produktionsverfahren. Es ist anzunehmen, dass die Produktmenge auf vielfältige Weise weiter gesteigert werden könnte. Eine naheliegende, einfache Möglichkeit war einerseits die weitere Maßstabsvergrößerung des Fermentationsvolumens, also die Übertragung der Produktion vom Labormaßstab auf die Pilotanlage. Andererseits erschien zuvor auch eine molekularbiologische Verbesserung des Produktionsstamms als sinnvoll. Auch die Erhöhung der Substratlöslichkeit war äußerst vielversprechend um eine Steigerung der Produktmenge durch erhöhte Umsatzraten bei höheren Substratkonzentrationen zu erreichen. Darüberhinaus ließen sich noch einzelne Parameter im Fermentationsverfahren, z.B. die *feed*-Strategie, weiter optimieren. Zuletzt bedarf es auch enormer Verbesserungen im Aufreinigungsverfahren, das bisher in keiner Weise optimiert wurde.

3.2.5 *Fed-batch*-Produktion von 20 α -DHP im 1 l-Bioreaktor – Prozessführung F

Die bisher für das Substrat Dydrogesteron erlangten Erfahrungen wurden im Folgenden für den Umsatz des natürlichen Substrats Progesteron mit dem Produktionsstamm JMN8 genutzt. Aufgrund der zeitlichen Parallelität der bereits beschriebenen Arbeiten zur *fed-batch*-Fermentation mit JMN8 (siehe 3.2.3 und 3.2.4) und der weiterführenden molekularbiologischen und prozesstechnischen Optimierung des Produktionsprozesses (siehe 3.3 und 3.4.4) konnten für die Produktion von 20 α -DHP die besten zu diesem Zeitpunkt bekannten Biotransformationsbedingungen gewählt werden.

Um das kommerziell nur schwer erhältliche 20 α -DHP in ausreichender Menge für die Verwendung als Referenzstandard zu produzieren und um seine Identität durch NMR-Strukturanalysen eindeutig zu beweisen wurde die Biotransformation von Progesteron als *fed-batch*-Kultur im Biostat-Bioreaktor wie unter 2.2.3.4 beschrieben durchgeführt. Das Anfangsvolumen der Kultur betrug 0,5 l. Das Fermentationsmedium wurde mit JMN8-Zellen einer 1 l-Kultur beimpft, die über 24 h herangezogen worden war. Die Substratanfangskonzentration betrug 2 mM. Der Fermenter wurde mit einer Rate von 3 l/min belüftet. Das *feeding* der Kultur erfolgte mit einer automatisch geregelten, wachstumsratenangepassten *feed*-Strategie mit FM1 (wobei der c-Parameter bei Bedarf manuell nachgeregelt wurde) wie sie auch bei der unter 3.4.4.3 beschriebenen Biotransformation mit Prozessführung E Anwendung fand. Die Fermentationsdauer betrug ca. 70 h. Eine detaillierte Übersicht über die Entwicklung der Prozessführungs- und *feeding*-Strategien sowie genaue Angaben zu Zeitpunkt und Umfang manueller Nachregelungen finden sich im Anhang. Der Verlauf dieser Progesteronbiotransformation mit JMN8 im 1 l-Bioreaktor ist in Abbildung 31 gezeigt.

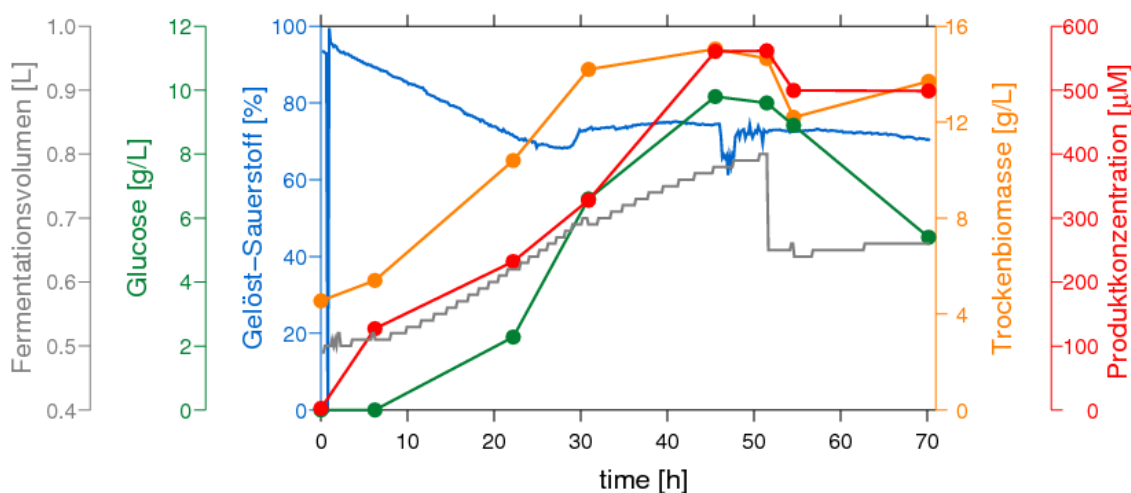


Abbildung 31: Biotransformation von Progesteron im 1,5 l-Fermenter. *Fed-batch*-Kultur von JMN8 in FM1 mit 315 mg (1 mmol) Progesteron bei 30 °C. pH-Wert und Gelöst-Sauerstoff wurden kontinuierlich gemessen. Proben wurden regelmäßig entnommen und bezüglich Glucosekonzentration, Trockenbiomasse und Produktbildung untersucht. Die Gesamtfermentationszeit betrug ca. 70 h.

Wie aus Abbildung 31 zu entnehmen ist nahm die Trockenbiomasse im Fermenter während der ersten 30 h von 4,6 g/l auf 14,2 g/l konstant zu und stagnierte dann weitgehend. Der Gelöst-Sauerstoff verhielt sich umgekehrt, er fiel in der ersten Phase stark ab. Das automatische *feeding* der Kultur bewirkte eine gleichmäßige, ausreichende Glucosekonzentration über den gesamten Fermentationszeitraum. Nach 51 h Fermentationsdauer wurden 150 ml Fermenterinhalt abgelassen, um weiteres Volumen für das andauernde *feeding* zu erhalten. Die Produktbildung verlief annähernd parallel zur Biomassekonzentration. In den ersten 46 h der Biotransformation lag die Umsatzrate bei 295 $\mu\text{M}/\text{d}$, danach kam es zu keiner weiteren Zunahme der Produktkonzentration. Am Ende der Fermentation betrug die Produktkonzentration in der Fermentationskultur ca. 500 μM . Aus den in diesem Experiment erhaltenen Daten kann damit eine durchschnittliche 20α -DHP-Produktionsrate für dieses Produktionssystem von ca. 171 $\mu\text{M}/\text{d}$ für die gesamte Biotransformationszeit von 70 h bestimmt werden. Damit ist die relative 20α -DHP-Menge, die durch Biotransformationen in MTPs produziert wurde, im Fermenter-Maßstab nicht nur reproduzierbar, es können sogar höhere Produktmengen erreicht werden. Das HPLC-Chromatogramm der ersten und der letzten Fermentationsprobe wird in Abbildung 32 gezeigt.

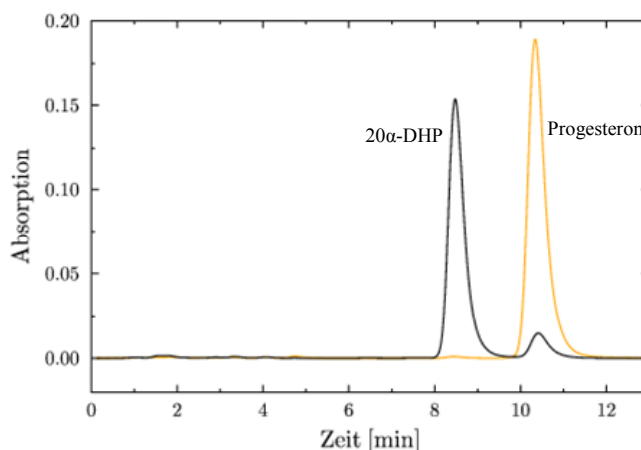


Abbildung 32: Biotransformation von Progesteron im 1,5 l-Fermenter. HPLC-Chromatogramm ($\lambda = 240 \text{ nm}$) von Fermenterproben von Stamm JMN8 nach Inkubation mit 315 mg (1 mmol) Progesteron. Proben wurden nach 0 h (gelbe Linie) und 70 h (schwarze Linie) Biotransformation bei 30 °C entnommen.

Entsprechend des Diagramms in Abbildung 32 betrug die Produktreinheit am Ende der Biotransformation von Progesteron mit JMN8 etwa 90 %. Im Anschluss wurden die Steroide durch Flüssig-flüssig-Extraktion mit 1/10 Volumen Cyclohexan im Scheidetrichter aus dem Fermenterüberstand wiedergewonnen. Nach dem Eindampfen der organischen Phase wurden etwa 50 mg Produkt-Substrat-Gemisch erhalten. Dieser verbliebene Extrakt wurde einer Säulenchromatografie (siehe 2.2.6.2) unterzogen, um das Produkt zu reinigen.

In Vorexperimenten wurden durch DC (siehe 2.2.6.1) geeignete Lösungsmittelmischungen für die chromatografische Trennung der Substanzen herausgefunden und diese Bedingungen dann direkt auf die Säulenchromatografie übertragen. Mit einem Gemisch von Chloroform, Ethylacetat und Methanol im Verhältnis von 20:4:1 (v/v/v) als Laufmittel ließ sich eine gute Trennung erreichen.

Es wurden insgesamt 25 einzelne Fraktionen gesammelt und jeweils 5 μl auf DC-Folie aufgetragen und auf Fluoreszenz unter UV-Licht geprüft. Von den Fraktionen, die dabei eine Fluoreszenz aufwiesen (Fraktionen 5-10), wurden dann jeweils 5 μl -Proben zusammen mit reinem Progesteron als Referenzstandard einer DC zur Überprüfung der Substanzidentität in den einzelnen Fraktionen unterzogen. Diejenigen, die ausschließlich das Produkt enthalten (Fraktionen 7-10) wurden vereinigt und eingedampft. Nach dem Eindampfen des Lösemittels wurden ca. 30 mg (95 μmol) eines leicht gelblichen, kristallinen Puders erhalten, was 30 % der theoretischen Maximalausbeute entspricht. Der Reinigungsfortschritt und die Qualität des produzierten 20α -DHPs wurden während des gesamten Reinigungsprozesses stets durch HPLC-Analysen überwacht. Die abschließende HPLC-Analyse des Produkts zeigte seine hohe Reinheit (ca. 99 %), wobei nur noch geringe Spuren der Elternsubstanz detektierbar waren (Abbildung 33).

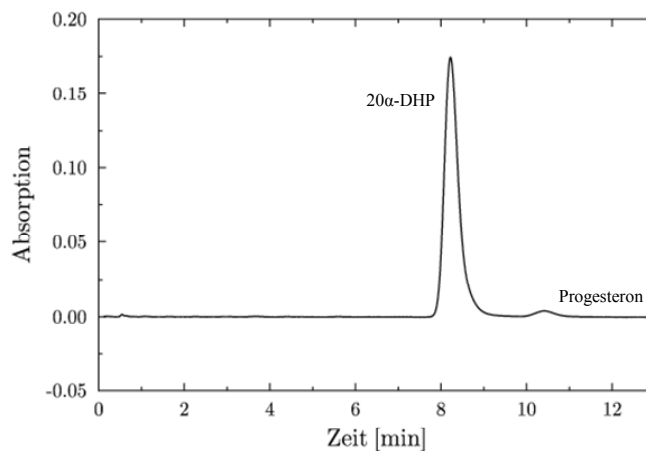


Abbildung 33: HPLC-Chromatogramm ($\lambda = 240 \text{ nm}$) des mittels Säulenchromatografie gereinigten Produkts aus der Progesteronbiotransformation im 1,5 l-Bioreaktor. Entsprechend diesem Diagramm beträgt die Produktreinheit ca. 99 %.

Um die Identität des produzierten 20α -DHPs nach der Aufreinigung aus der Fermenterkultur endgültig zu beweisen und genauere Daten bezüglich seiner Qualität zu erhalten, wurde anschließend durch Dr. Josef Messinger (Solvay Pharmaceuticals GmbH) eine NMR-Strukturanalyse angefertigt. Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem produzierten Progesteronmetaboliten tatsächlich um 20α -DHP handelt. Das entsprechende β -Isomer wurde nicht gebildet und auch sonstige Nebenprodukte waren nicht detektierbar. Lediglich minimale Verunreinigungen durch die Ausgangssubstanz

wurden festgestellt. NMR-Spektren des gereinigten 20α -DHPs befinden sich im Anhang.

In diesem Teil dieser Arbeit wurden in Biotransformationsexperimenten unter Verwendung des AKR1C1-Expriemierers JMN8 wichtige Erfahrungen und Erkenntnisse für die Produktion von 20α -DHD und 20α -DHP gesammelt. Mit diesem Stamm wurden erste Biotransformationen von Dydrogesteron und Progesteron im Bioreaktor im *fed-batch*-Verfahren durchgeführt. Ziel dabei war in erster Linie die Produktion einer für eine Strukturaufklärung ausreichenden Produktmenge. NMR-Strukturanalysen bewiesen eindeutig, dass es sich bei den produzierten Substanzen um 20α -DHD bzw. 20α -DHP handelte. Größere Mengen an 20α -DHD wurden im Zuge der weiteren Prozessoptimierung erstmals im 10 l-Fermentationsverfahren hergestellt. Da für den Aufbau eines effizienten und ökonomisch sinnvollen 20α -DHD-Produktionsverfahrens eine deutliche Steigerung der Produktausbeute erforderlich ist, wurde im Folgenden zunächst versucht, den Produktionsstamm mit molekularbiologischen Methoden zu verbessern.

3.3 Stammoptimierung

3.3.1 Klonierung der Expressionsstämme JMN9, CAD300 und CAD302

Die Spaltheftestämme JMN7 und JMN8 enthalten jeweils eine einzelne Expressionskassette für die humane AKR1C1-cDNA. Um Stämme zu konstruieren, die über mehrere AKR1C1-Expressionseinheiten verfügen und damit möglicherweise zu höherer Aktivität fähig sind, wurden neben dem bereits für die Konstruktion von JMN8 eingesetzten Expressionsplasmid pREP1-AKR1C1 die neuen Expressionsplasmide pREP1_{ura}-AKR1C1 und pMWIK2-AKR1C1 verwendet.

Der AKR1C1-Expressionstamm JMN9 entstand durch Transformation des bereits zuvor hergestellten Einfachexpriemierers JMN7 mit dem Expressionsvektor pREP1-AKR1C1. Nach der Transformation waren die Zellen zum Wachstum auf EMM-Platten ohne Auxotrophiemarker-Zusätze fähig. Der daraus resultierende neue Stamm JMN9 hat den Genotyp *h- ura4.d118 leu1::pCAD1-AKR1C1/pREP1-AKR1C1*; er enthält zwei Expressionskonstrukte für die humane AKR1C1.

Die Konstruktion zweier weiterer AKR1C1-Mehrfachexpriemierer wurde freundlicherweise von Călin-Aurel Drăgan übernommen: Die Spaltheftexpressionsplasmide pREP1-AKR1C1 und pREP1_{ura}-AKR1C1 wurden gleichzeitig zur Transformation des Spaltheftestamms ATCC96115 eingesetzt. Nach der Transformation wurden die Zellen auf EMM+Adenin+Histidin+Thiamin-Platten ausgestrichen und bis zum Erscheinen von Kolonien inkubiert. Der neu konstruierte Stamm enthält ebenfalls zwei AKR1C1-

Expressionskonstrukte und wurde CAD300 (Genotyp *h⁻ ade6.M210 his3.Δ1/pREP1-AKR1C1 pREP1ura-AKR1C1*) genannt. Das Expressionsplasmid pMWIK2-AKR1C1 wurde anschließend für die Transformation des Spaltheferstamms CAD300 verwendet. Die Selektion erfolgte über das im Plasmid enthaltene Auxotrophiemarkergen *his3*. Dieser neu konstruierte Stamm enthält drei Expressionskassetten für die humane AKR1C1 und wurde als CAD302 (Genotyp *h⁻ ade6.M210/pREP1-AKR1C1 pREP1ura-AKR1C1 pMWIK2-AKR1C1*) bezeichnet. Die Konstruktion der AKR1C1-Mehrfach-exprimierer JMN9, CAD300 und CAD302 ist in Abbildung 34 schematisch dargestellt.

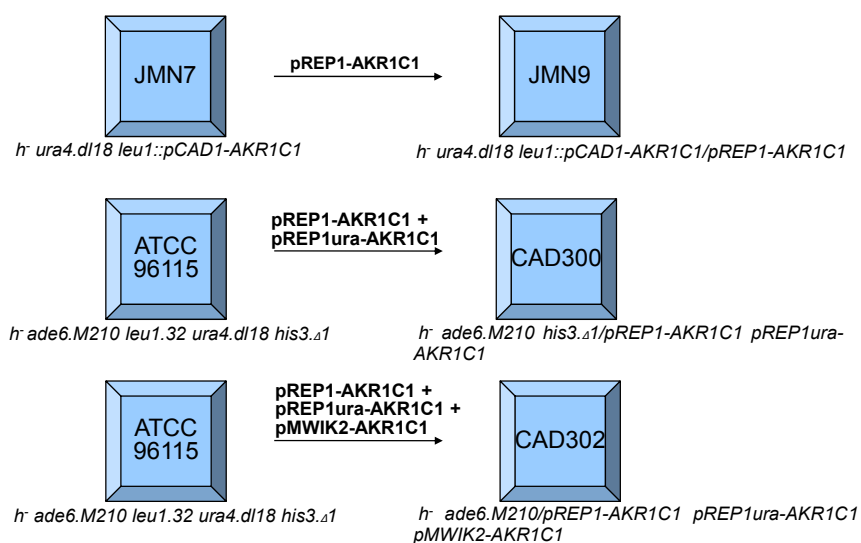


Abbildung 34: Konstruktion der AKR1C1-Expressionsstämme JMN9, CAD300 und CAD302. JMN9 entstand durch Transformation von JMN7 mit dem Vektor pREP1-AKR1C1, CAD300 entstand durch Doppeltransformation von ATCC96115 mit pREP1-AKR1C1 und pREP1ura-AKR1C1, CAD302 entstand durch Dreifachtransformation von ATCC96115 mit pREP1-AKR1C1, pREP1ura-AKR1C1 sowie pMWIK2-AKR1C1.

3.3.2 Klonselktion und Stammvergleich

Auch die neu konstruierte zweite Serie von AKR1C1-Expressionsstämmen wurde wie bereits zuvor die Einfachexprimierer JMN7 und JMN8 einer Klonselktion unterzogen (2.2.3.1), um jeweils den Klon mit der größten Umsatzaktivität auszuwählen und für die folgenden Experimente zu verwenden (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Umsatzaktivität der neu konstruierten Mehrfachexprimierer untereinander und mit dem aktivsten Einzelexprimierer JMN8 sowie mit dem Ausgangsstamm NCYC1913 (Kontrolle) verglichen (Abbildung 35).

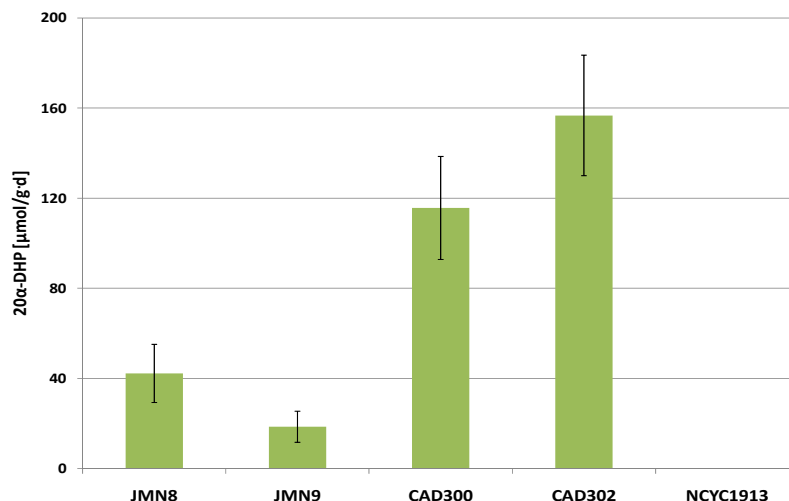


Abbildung 35: Biotransformationsaktivität von JMN8, JMN9, CAD300, CAD302 und NCYC1913 in MTPs. Die spezifische 20α-DHP-Bildungsaktivität (gegeben als μmol Produkt pro g Trockenbiomasse und Tag) wurde nach 24 h Inkubation bei 30 °C mit 500 μM Progesteron bestimmt.

Wie aus Abbildung 35 zu entnehmen ist, zeigte in diesem Experiment der AKR1C1-Einfachexprimierer JMN8 eine durchschnittliche spezifische 20α-DHP-Bildungsaktivität von $42 \pm 13 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Der Stamm CAD300 hatte mit $116 \pm 23 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ fast die dreifache Umsatzaktivität, CAD302 mit $157 \pm 27 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ fast die vierfache spezifische 20α-DHP-Bildungsaktivität im Vergleich zu JMN8. Der AKR1C1-Doppelexprimierer JMN9 wies hingegen eine im Vergleich zu JMN8 deutlich verringerte spezifische Aktivität von $19 \pm 7 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ auf. In den Kontrollansätzen mit dem Elternstamm NCYC1913 war unter diesen Bedingungen keine Aktivität detektierbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es durchaus einen deutlichen Gendosiseffekt bei Biotransformationen mit AKR1C1-Exprimierern gibt. Anhand dieser Daten wurde der AKR1C1-Dreifachexprimierer CAD302 als der vielversprechendste Stamm für den Aufbau eines effizienten Systems für den Umsatz von 20-Ketosteroiden zu den entsprechenden 20α-Hydroxymetaboliten angesehen.

3.4 Prozessentwicklung mit dem Stamm CAD302

Im weiteren Verlauf des Prozessaufbaus wurde CAD302 als einziger Produktionsstamm eingesetzt. Die folgenden Experimente zielten auf die Optimierung einzelner, wichtiger Parameter im Fermentationsverfahren ab.

3.4.1 Wachstumskinetiken

Mit dem Ziel, im späteren 20α-DHD-Produktionsprozess möglichst starkes Zellwachstum und damit hohe Biomassekonzentration zu erreichen, wurden Wachstumskinetiken (siehe 2.2.1.6) von CAD302 unter dem Einfluss verschiedener äußerer Parameter (Substrat- und Glucosekonzentration) untersucht.

3.4.1.1 Substratabhängige Wachstumskinetiken

Das Wachstumsverhalten des AKR1C1-Dreifachexprimierers CAD302 wurde in Wachstumskinetiken zunächst analog zu vorherigen Experimenten mit JMN8 und NCYC1913 untersucht, um die spezifische Wachstumsrate μ zu ermitteln. Das Wachstumsverhalten wurde dabei mit bzw. ohne 1mM Dydrogesteron im Kulturmedium betrachtet. Um die AKR1C1-Expression in den CAD302-Zellen zu induzieren wurde der Hefestamm dabei in Abwesenheit von Thiamin im Kulturmedium inkubiert (Abbildung 36). Die hier erhaltenen Werte werden in Tabelle 3 mit den Daten aus den vorangegangenen Wachstumsversuchen mit dem AKR1C1-Einfachexprimierer JMN8 und dem Elternstamm NCYC1913 (siehe 3.1.7 und 3.2.1) verglichen.

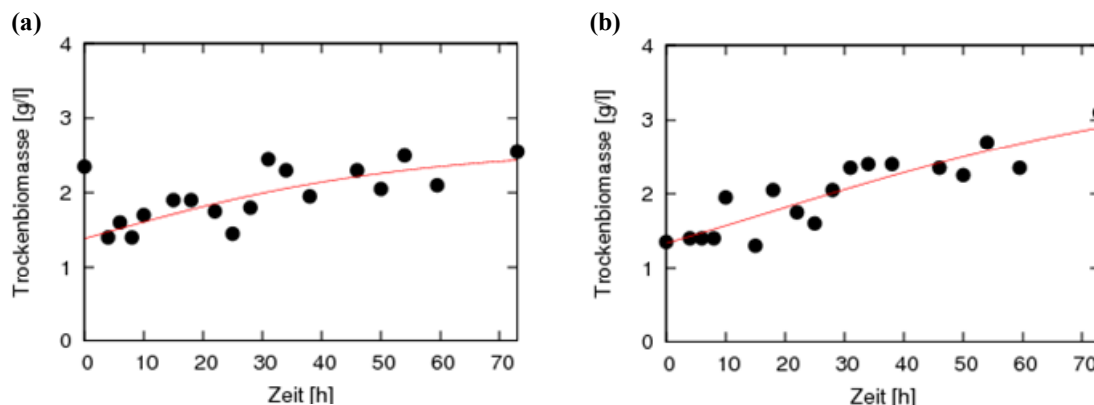


Abbildung 36: Wachstumskinetik des *S. pombe*-Stamms CAD302 mit (a) bzw. ohne (b) Substrat im Kulturmedium. Zellen wurden über 72 h bei 30 °C in EMM mit bzw. ohne 1mM Dydrogesteron inkubiert. Exemplarisch ist jeweils ein Wachstumsexperiment gezeigt.

Tabelle 4: Vergleich der spezifischen Wachstumsrate μ und Generationszeit t_g der *S. pombe* Stämme JMN8, CAD302 und des Elternstamms NCYC1913 jeweils mit bzw. ohne 1 mM Dydrogesteron im Kulturmedium. Zusammenstellung aller aus 3.1.7, 3.2.1 und 3.4.1.1 gewonnenen Daten.

Stamm	Substrat	μ [h ⁻¹]	t_g [h]
JMN8	-	0,2 ± 0,1	4 ± 2
JMN8	+	0,1 ± 0,1	6 ± 2
CAD302	-	0,04 ± 0,03	17 ± 11
CAD302	+	0,04 ± 0,04	14 ± 8
NCYC1913	-	0,07 ± 0,01	10 ± 1
NCYC191	+	0,1 ± 0,1	9 ± 4

Der Phänotyp von CAD302 ist vergleichbar mit dem von JMN8, und auch hier zeigen die Zellen unter dem Einfluss von 1 mM Dydrogesteron im Kulturmedium eine deutlich granuliertere Struktur als ohne Substratzugabe (nicht gezeigt). Die CAD302-Zellen wachsen mit einer spezifischen Wachstumsrate μ von $0,04 \pm 0,03$ h⁻¹ oder einer Generationszeit t_g von 17 ± 11 h nur sehr langsam, die Substratzugabe wirkt sich unter

diesen Bedingungen allerdings nicht auf das Wachstumsverhalten aus ($\mu = 0,04 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$; $t_g = 14 \pm 8 \text{ h}$). Die Biomassekapazität K aller untersuchten Stämme lag unabhängig vom Substrateinfluss etwa bei 3 g/l (Daten nicht gezeigt).

Im Folgenden wurde die Auswirkung verschiedener Dydrogesteronkonzentrationen im Kulturmedium auf das Wachstum von CAD302 näher betrachtet, um mögliche konzentrationsabhängige Effekte aufzudecken. Um die Versuchsbedingungen dabei möglichst eng an den Bedingungen des zeitlich parallel in einer Reihe von Parametern verbesserten 20 α -DHD-Produktionsprozesses im Bioreaktor auszurichten wurde DM1 mit 20 g/l Glucose statt EMM als Medium eingesetzt. Die Dydrogesteronkonzentrationen wurden im Bereich von 0 bis 3 mM gewählt und äquimolare Mengen β -Cyclodextrin zugesetzt. In Abbildung 37 ist die unter diesen Bedingungen ermittelte spezifische Wachstumsrate μ gegen die Dydrogesteronkonzentration aufgetragen.

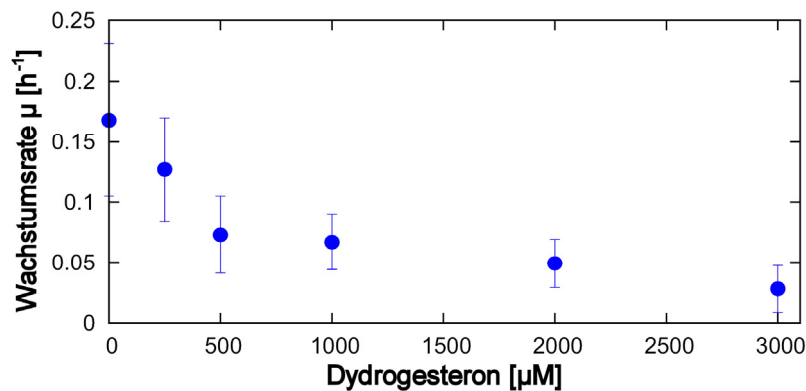


Abbildung 37: Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate μ des *S. pombe*-Stamms CAD302 von der Substratkonzentration im Kulturmedium. Zellen wurden über 72 h bei 30 °C in DM1 mit Dydrogesteronkonzentrationen zwischen 0 und 3000 μM inkubiert.

Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, zeigte sich in diesem Experiment eine deutliche inhibitorische Wirkung des Substrats auf das Zellwachstum. Der μ -Wert von $0,17 \text{ h}^{-1}$ ohne Dydrogesteroneinfluss verringert sich bis zu einer Konzentration von 500 μM Dydrogesteron linear um mehr als die Hälfte auf $0,07 \text{ h}^{-1}$. Eine weitere Erhöhung der Dydrogesteronkonzentration bis 3 mM führt zu einer weiteren Halbierung von μ auf $0,03 \text{ h}^{-1}$. Die Wachstumsraten sind unter diesen Bedingungen deutlich größer als die zuvor in EMM-Medium ermittelten, was darauf hindeutet, dass die hier verwendeten Bedingungen für effizientes Zellwachstum besser geeignet sind. Diese sowie die in den Abschnitten 3.4.1.2, 3.4.2.1, 3.4.3.1, 3.4.3.2 und 3.4.3.3 dargestellten Ergebnisse wurden im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von Jan Bechmann erhalten.

3.4.1.2 Glucoseabhängige Wachstumskinetik

Nach der näheren Untersuchung der Abhängigkeit des CAD302-Wachstums von der Substratkonzentration wurde der Einfluss verschiedener Glucosekonzentrationen im Kulturmedium auf die Wachstumsrate in der linearen Wachstumsphase betrachtet. Dazu

wurden ca. 1,5 g/l CAD302-Zellen² über 4 h in DM1 mit Anfangsglucosekonzentrationen von 0, 1, 2, 4, 8, 10 und 20 g/l inkubiert. Die Kulturen wurden stündlich beprobt und die spezifische Wachstumsrate μ wurde für diesen Zeitraum bestimmt (Abbildung 38).

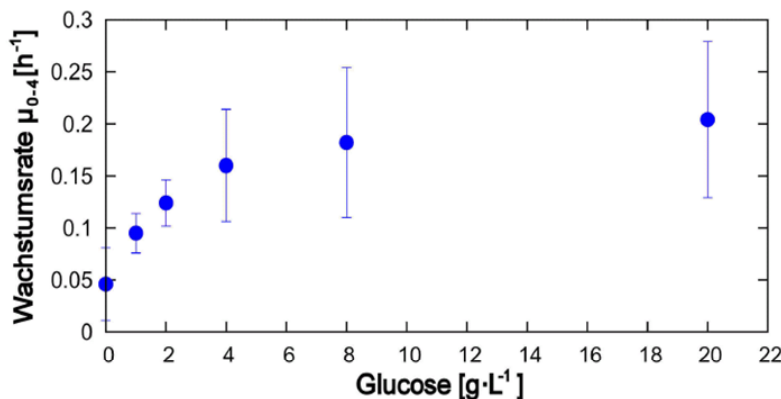


Abbildung 38: Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate μ des *S. pombe*-Stamms CAD302 von der Glucosekonzentration im Kulturmedium. Zellen wurden über 4 h bei 30 °C in DM1 mit Anfangsglucosekonzentrationen zwischen 0 und 20 g/l inkubiert. Die Wachstumsrate wurde innerhalb der ersten vier Stunden Inkubation nach Inokulation mit ca. 1,5 g/l (Trockenbiomasse) CAD302-Zellen aufgenommen und ist als μ_{0-4} bezeichnet.

Mit zunehmender Glucosekonzentration bis zu einem Wert von 4 g/l zeigt sich eine tendenzielle Steigerung der Wachstumsrate von 0,05 h⁻¹ (ohne Glucose) auf 0,16 h⁻¹. Eine weitere Erhöhung der Glucosekonzentration im Medium bis zu 20 g/l bewirkt keine weitere signifikante Steigerung der Wachstumsrate.

3.4.2 Verbesserung der Produktionsrate durch β -Cyclodextrin-Zugabe

Die Umsatzgeschwindigkeit in Steroidbiotransformationen ist unter anderem abhängig von der Substratkonzentration im Reaktionsmedium (vgl. 3.2.2 und 3.4.3). Die Substratlöslichkeit und damit verbunden die Substratverfügbarkeit ist also ein möglicher limitierender Faktor dieses Biotransformationsprozesses. Steroide zeigen vielfach in wässrigem Medium eine sehr geringe Löslichkeit, was durch die maximale Löslichkeit von Progesteron in EMM von weniger als 100 μ M (vgl. 3.1.5) veranschaulicht wird. Dies bedeutet möglicherweise, dass die erreichte maximale Umsatzgeschwindigkeit in Biotransformationsexperimenten mit höherer Substratkonzentration eher auf die erreichte maximale Substratlöslichkeit als auf das Erreichen der höchstmöglichen Umsatzkapazität der Zellen zurückzuführen ist. Demzufolge erschien eine Erhöhung der Substratlöslichkeit durch die Verwendung von Cyclodextrinen äußerst vielversprechend, um eine Steigerung der Produktivität zu erreichen.

² Trockenbiomasse abgeschätzt aus empirischen Daten, im Verlauf des Experiments verifiziert

3.4.2.1 Einfluss auf die Substratlöslichkeit

Um zu untersuchen, wie sich die Verwendung verschiedener β -Cyclodextrinkonzentrationen auf die Löslichkeit von Dydrogesteron im Medium auswirkt, wurden jeweils 2 ml DM1 mit 2 mM Dydrogesteron und verschiedenen β -Cyclodextrinkonzentrationen im Bereich zwischen 0 und 6 mM versetzt. Die Proben wurden 5 min gründlich gemischt und anschließend 15 min bei 13000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Je 1 ml Überstand wurde mit 500 μ l Ethylacetat extrahiert und die Dydrogesteronkonzentration im Extrakt durch HPLC-Analyse bestimmt. In Abbildung 39 sind die Konzentrationen des gelösten Dydrogesterons gegen die jeweilige β -Cyclodextrinkonzentration aufgetragen.

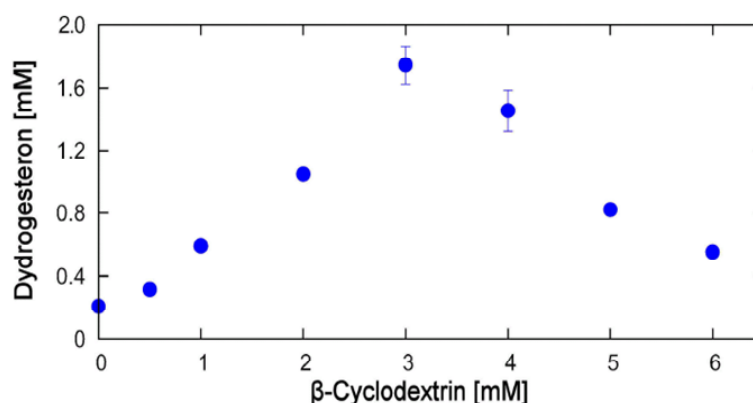


Abbildung 39: Abhängigkeit der Dydrogesteronlöslichkeit von der β -Cyclodextrinkonzentration im Kulturmedium. Die Proben enthielten 2 mM Dydrogesteron in DM1 bei verschiedenen β -Cyclodextrinkonzentrationen, wurden scharf abzentrifugiert und die Dydrogesteronkonzentration im Überstand wurde durch HPLC-Analyse bestimmt. Dieses Experiment wurde einmal mit der Bestimmung von Dreifachwerten durchgeführt und die erhaltenen Daten wurden gemittelt.

Wie Abbildung 39 zeigt, ist die Löslichkeit des Substrats in DM1-Medium bei einer β -Cyclodextrinkonzentration von 3 mM mit $1,7 \pm 0,1$ mM am höchsten. Generell nimmt die Dydrogesteronlöslichkeit bis zu dieser Cyclodextrinkonzentration um den Faktor 8,5 zu, um bei höheren Cyclodextrinkonzentrationen in fast umgekehrtem Maße wieder abzufallen. Optimale Löslichkeit lässt sich also durch Dydrogesteron: β -Cyclodextrin-Verhältnisse im Bereich 1:1 bis 1:2 erzielen.

3.4.2.2 Einfluss auf die Umsatzgeschwindigkeit

In einem Biotransformationsexperiment im Schüttelkolbenmaßstab wurde nun untersucht, wie sich die Verwendung unterschiedlicher Molaritätsverhältnisse von Dydrogesteron zu β -Cyclodextrin auf die Dydrogesteron-Umsatzrate auswirkt. Dabei wurden 10^8 Zellen/ml CAD302 in EMM über 24 h mit 1 mM Dydrogesteron inkubiert, wobei β -Cyclodextrinkonzentrationen im Bereich zwischen 0 und 10 mM gewählt wurden. Nach der Biotransformation wurden die Inkubationsansätze abzentrifugiert (5 min, 5000 g, 4 °C) und Kulturüberstände und Zellen (resuspendiert in 5 ml Kulturüberstand) separat extrahiert. In Abbildung 40 sind die jeweils gemessenen 20α -

DHD-Konzentrationen gegen die β -Cyclodextrinkonzentration in den Inkubationsansätzen aufgetragen.

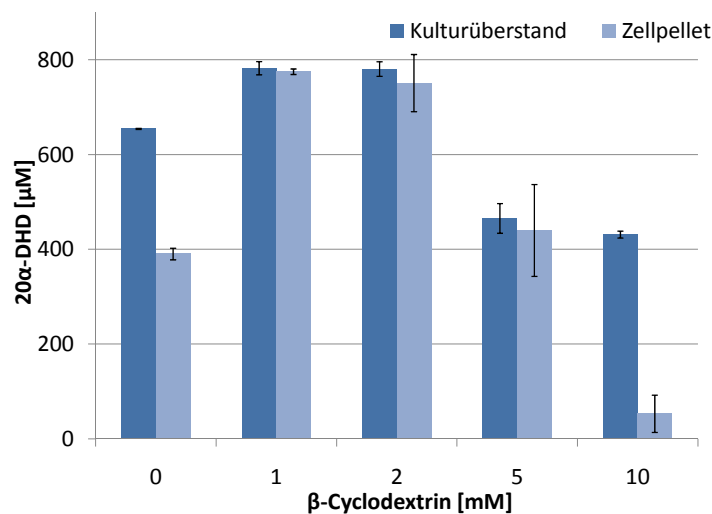


Abbildung 40: Abhängigkeit der Biotransformationsaktivität von der β -Cyclodextrinkonzentration im Kulturmedium. 10^8 Zellen/ml von CAD302 Zellen wurden über 24 h bei 30 °C in 50 ml EMM mit 1 mM Dydrogesteron und verschiedenen β -Cyclodextrinkonzentrationen inkubiert. Dieses Experiment wurde zweimal unabhängig, jeweils mit der Bestimmung von Doppelwerten, durchgeführt und die erhaltenen Daten wurden gemittelt.

Diese Daten weisen darauf hin, dass sich die Zugabe von β -Cyclodextrin im einfachen und zweifachen molaren Verhältnis zum Substrat förderlich auf die Umsatzrate auswirkt. Die Produktkonzentration ist verglichen mit dem Kontrollansatz ohne Cyclodextrin sowohl im Kulturüberstand als auch im Zellsediment um ca. 20 bis 50 % erhöht. Höhere β -Cyclodextrinkonzentrationen wirken sich hingegen negativ auf den Dydrogesteronumsatz aus. Aufgrund der Ergebnisse aus diesem Experiment sowie aus 3.4.2.2 wurde in folgenden Biotransformationsexperimenten und bei der Metabolitenproduktion im Bioreaktor, β -Cyclodextrin im molaren Verhältnis von 1:1 zum Substrat zum Kulturmedium gegeben.

3.4.3 Umsatzkinetiken

Mit dem Ziel, die Biotransformationsrate von Dydrogesteron im späteren Produktionsprozess zu verbessern, wurden als Vorversuche Umsatzkinetiken mit CAD302 im Schüttelkolbenmaßstab unter dem Einfluss verschiedener äußerer Parameter (Substrat-, Produkt- und Glucoseeinfluss) erstellt.

3.4.3.1 Substratabhängige Umsatzkinetik

Zur Untersuchung des Einflusses der Substratkonzentration auf die Umsatzrate wurden 100 ml-Kulturen von CAD302, die über 48 h inkubiert worden waren, abzentrifugiert (3000 g, 5 min, 4 °C), das Zellsediment einmal in DM1 gewaschen und in 5 ml DM1

resuspendiert. Von dieser Kultur wurden jeweils 2 ml verwendet, um die Versuchsansätze zu beimpfen. Die Zellen wurden in DM1 mit einem Glucosegehalt von 20 g/l über 24 h mit Dydrogesteronkonzentrationen von 250 μM , 500 μM , 1 mM, 2 mM bzw. 3 mM mit jeweils äquimolaren Mengen an β -Cyclodextrin inkubiert. Die 20 α -DHD-Konzentration in den Versuchsansätzen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten, die Biotrockenmasse zu Beginn und am Ende der Inkubation bestimmt. Die Abhängigkeit der spezifischen Umsatzrate (bezogen auf die Starttrockenbiomasse) sowie der Raum-Zeit-Ausbeute innerhalb der ersten 4 h der Biotransformation von der Dydrogesteronkonzentration im Medium wird in Abbildung 41 veranschaulicht.

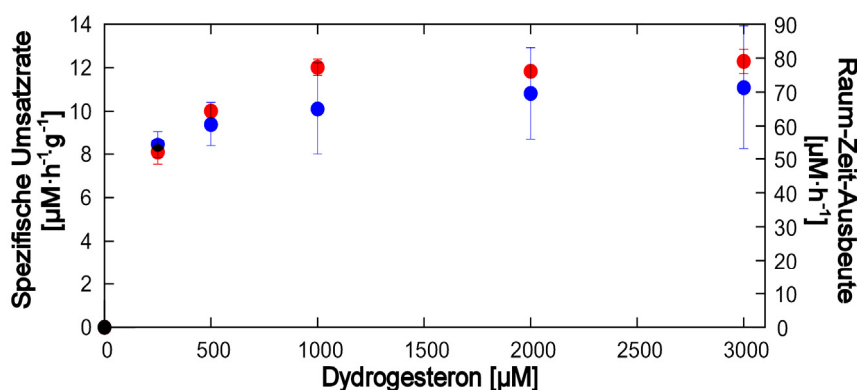


Abbildung 41: Spezifische Umsatzrate (blau) und Raum-Zeit-Ausbeute (rot) in Abhängigkeit von der Dydrogesteronkonzentration im Kulturmedium während der ersten 4 h der Inkubation. Inkubationen von CAD302 mit 0 bis 3 mM Dydrogesteron und äquimolaren Mengen β -Cyclodextrin in DM1 mit 20 g/l Glucose über 24 h bei 30 °C. Diese Experimente wurden zweimal unabhängig, jeweils mit der Bestimmung von Doppelwerten durchgeführt und die erhaltenen Daten für die spezifischen Umsatzraten gemittelt. Die dargestellten Raum-Zeit-Ausbeuten sind Mittelwerte eines exemplarischen Versuchs.

Eine Erhöhung der Substratkonzentration bis 1 mM bewirkt tendenziell eine gesteigerte spezifische Umsatzrate. Sie beträgt 8,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bei 250 μM Dydrogesteronkonzentration und 9,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bzw. 10,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ bei 500 μM und 1 mM Dydrogesteronkonzentration. Ein weiterer Anstieg der Substratkonzentration bewirkt jedoch keine signifikante Änderung der Umsatzrate mehr. Bei einer Substratkonzentration von 250 μM wird eine Raum-Zeit-Ausbeute von 54,1 $\mu\text{M}/\text{h}$ erreicht. Diese verhält sich analog zur Umsatzrate und steigt mit der Substratkonzentration auf Werte von 62,7 $\mu\text{M}/\text{h}$ (500 μM Dydrogesteron) bzw. bis ca. 80 $\mu\text{M}/\text{h}$ ab 1 mM Dydrogesteronkonzentration.

3.4.3.2 Glucoseabhängige Umsatzkinetik

Neben der Abhängigkeit der Biotransformationsrate von der Substratkonzentration wurde auch die Abhängigkeit von der Glucosekonzentration untersucht. Dazu wurde CAD302 in einem zu 3.4.3.1 analogen Versuch mit 2 mM Dydrogesteron und β -Cyclodextrin bei Glucosekonzentrationen im Bereich von 0 bis 20 g/l für 24 h inkubiert.

Die 20α -DHD-Konzentration in den Versuchsansätzen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten, die Biotrockenmasse zu Beginn und am Ende der Inkubation bestimmt. Die Abhängigkeit der spezifischen Umsatzrate (bezogen auf die Starttrockenbiomasse) sowie der Raum-Zeit-Ausbeute innerhalb der ersten 4 h der Biotransformation von der Glucosekonzentration im Medium, ist in Abbildung 42 gezeigt.

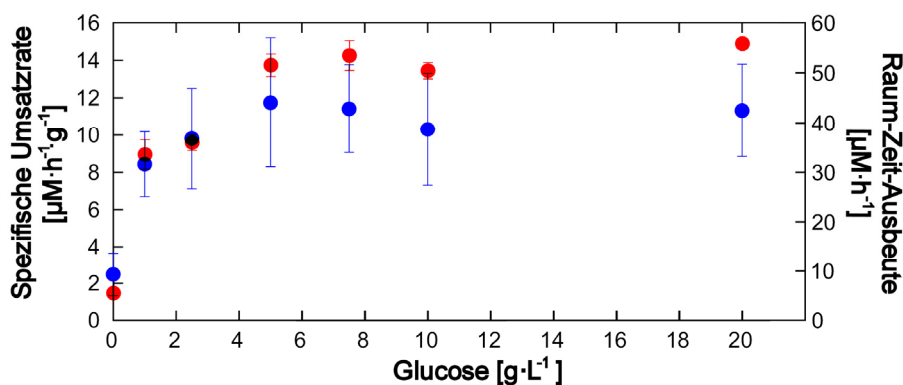


Abbildung 42: Spezifische Umsatzrate (blau) und Raum-Zeit-Ausbeute (rot) in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Kulturmedium während der ersten 4 h der Inkubation. Inkubationen von CAD302 mit 2 mM Dydrogesteron in DM1 mit Glucosekonzentrationen zwischen 0 und 20 g/l über 24 h bei 30 °C. Diese Experimente wurden zweimal unabhängig, jeweils mit der Bestimmung von Doppelwerten durchgeführt und die erhaltenen Daten für die spezifischen Umsatzraten gemittelt. Die dargestellten Raum-Zeit-Ausbeuten sind Mittelwerte eines exemplarischen Versuchs.

Wie in Abbildung 42 dargestellt ist die Biotransformationsrate von Dydrogesteron nur bedingt von der Glucosekonzentration abhängig. Ist Glucose im Kulturmedium vorhanden, so zeigen sich unabhängig von der Glucosekonzentration keine signifikanten Unterschiede der spezifischen Umsatzrate (um $8 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), höhere Glucosekonzentrationen haben also keine höheren Biotransformationsaktivitäten zur Folge. Im glucosefreien Medium hingegen ist die Umsatzrate um etwa 75 % verringert (ca. $2 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

3.4.3.3 Produktabhängige Umsatzkinetik

Nachdem zuvor die Wirkung von Dydrogesteron als Substrat auf die Biotransformationsrate untersucht worden war (siehe 3.4.3.1), wurde im Folgenden auch der Einfluss verschiedener Produktkonzentrationen näher betrachtet. Dieser Parameter ist nicht außer Acht zu lassen, da es in Produktionsprozessen mit hohen Substratkonzentrationen, wie sie hier durchgeführt wurden, zu hohen Produktkonzentrationen kommen kann, die dann ihrerseits unter Umständen die Umsatzrate stark beeinflussen können.

Die Umsatzrate wurde in Abhängigkeit von verschiedenen 20α -DHD-Konzentrationen im Medium ermittelt. Dazu wurde CAD302 in einem zu 3.4.3.1 analogen Versuch im Schüttelkolbenmaßstab mit 2 mM Dydrogesteron und β -Cyclodextrin in DM1 mit einem Glucosegehalt von 20 g/l über 24 h inkubiert. Dabei wurden in den Versuchs-

ansätzen 20α -DHD-Anfangskonzentrationen von $100\ \mu\text{M}$, $250\ \mu\text{M}$, $500\ \mu\text{M}$, $1\ \text{mM}$ sowie $2\ \text{mM}$ eingestellt. Die Produktkonzentration in den Versuchsansätzen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten, die Biotrockenmasse zu Beginn und am Ende der Inkubation bestimmt. Die Abhängigkeit der spezifischen Umsatzrate (bezogen auf die Starttrockenbiomasse) sowie der Raum-Zeit-Ausbeute innerhalb der ersten 4 h der Biotransformation von der 20α -DHD-Konzentration im Medium wird in Abbildung 43 veranschaulicht.

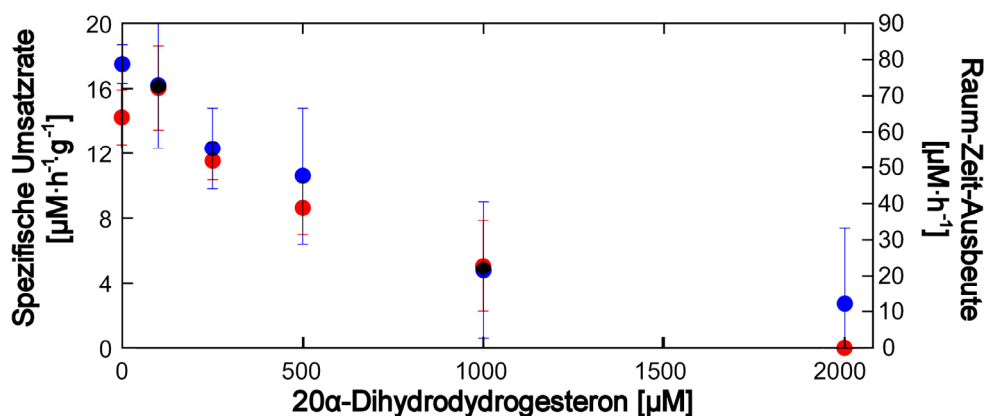


Abbildung 43: Spezifische Umsatzrate (blau) und Raum-Zeit-Ausbeute (rot) in Abhängigkeit von der 20α -DHD-Konzentration im Kulturmedium während der ersten 4 h der Inkubation. Inkubationen von CAD302 mit $2\ \text{mM}$ Dydrogesteron und 20α -DHD im Konzentrationsbereich zwischen 0 und $2\ \text{mM}$ in DM1 mit $20\ \text{g/l}$ Glucose über $24\ \text{h}$ bei $30\ ^\circ\text{C}$. Diese Experimente wurden zweimal unabhängig, jeweils mit der Bestimmung von Doppelwerten durchgeführt und die erhaltenen Daten für die spezifischen Umsatzraten gemittelt. Die dargestellten Raum-Zeit-Ausbeuten sind Mittelwerte eines exemplarischen Versuchs.

Wie in Abbildung 43 zu sehen ist nahm die spezifische Umsatzrate mit steigender Produktanfängskonzentration bis $1000\ \mu\text{M}$ annähernd linear von 18 ± 1 auf $5 \pm 4\ \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ab. Die weitere Verdopplung der Produktkonzentration auf $2\ \text{mM}$ führte zu einer weiteren Reduktion der spezifischen Umsatzrate auf $3 \pm 5\ \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Die Raum-Zeit-Ausbeute verringert sich analog von ca. $89\ \mu\text{M/h}$ ($0\ \mu\text{M}$ 20α -DHD) auf Werte um $7\ \mu\text{M/h}$ ($2\ \text{mM}$ 20α -DHD). Diese Daten geben Hinweise darauf, dass eine Produktinhibierung vorliegen könnte, die eine Produktion von 20α -DHD in höherer Konzentration ohne den Einsatz von besonderen prozesstechnischen Maßnahmen verhindert.

3.4.4 Fed-batch-Produktion von 20α -DHD im 1 l-Bioreaktor

3.4.4.1 20α -DHD-Produktion mit einmaliger Glucosezugabe – Prozessführung C

In den vorausgegangenen Schüttelkolben- und MTP-Experimenten wurden viele der für ein effizientes großtechnisches Produktionsverfahren relevanten Parameter näher betrachtet und die optimalen Bedingungen ermittelt. Danach wurde die Dydrogesteron-

Biotransformationsaktivität mit dem molekularbiologisch optimierten AKR1C1-Dreifachexprimierer CAD302 im Fermenter im 1 l-Labormaßstab untersucht. So sollten Hinweise darauf erlangt werden, wie sich der Stamm CAD302 in Fermentationsverfahren zur 20 α -DHD-Produktion verhält und in welche Richtung eine weitere verfahrenstechnische Optimierung möglich bzw. notwendig wäre. Diese Biotransformation wurde als *fed-batch*-Kultur im „Biostat“-Bioreaktor durchgeführt. Dafür wurden 0,7 l EMM mit einem Glucosegehalt von 50 g/l mit Zellen einer 400 ml-Kultur beimpft, die über 24 h bis zur stationären Phase herangezogen worden war. 218 mg Dydrogesteron wurden zu Beginn der Fermentation zugegeben, was einer Anfangssubstratkonzentration von 1 mM entspricht. Das *feeding* der Kultur erfolgte durch einmalige manuelle Zugabe von 30 ml einer konzentrierten Glucoselösung (600 g/l) nach einer Prozesslaufzeit von 21 h. So wurde der Glucosegehalt der Kultur stets über 20 g/l gehalten. Die Fermentation wurde dann für weitere 29 h bis zu einer Gesamtlaufzeit von 50 h fortgeführt (Abbildung 44).

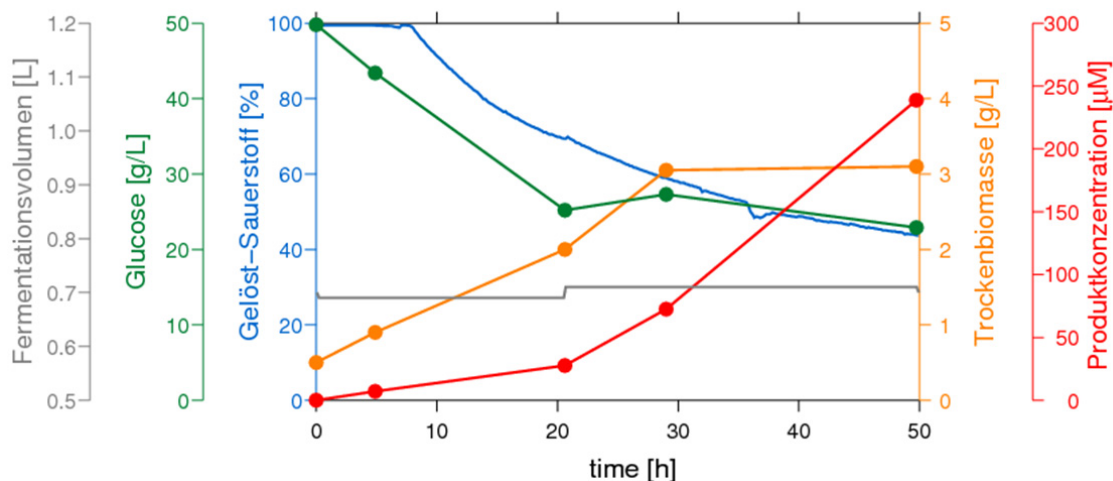


Abbildung 44: Biotransformation von Dydrogesteron mit CAD302 im 1,5 l-Fermenter. *Fed-batch*-Kultur von CAD302 in EMM mit 50 g/l Glucose bei 30 °C. 218 mg Dydrogesteron wurden als Substrat zugegeben (entspricht 1 mM Anfangssubstratkonzentration). pH-Wert und Gelöst-Sauerstoff wurden kontinuierlich gemessen. Proben wurden regelmäßig entnommen und bezüglich Glucosekonzentration, Trockenbiomasse und Produktbildung untersucht.

In Abbildung 44 ist zu sehen, dass die Trockenbiomasse nur in den ersten 30 h der Fermentation nennenswert zunahm, während der Gelöst-Sauerstoff nach etwa 8 h kontinuierlich bis auf einen Wert von 44 % abnahm. Eine ausreichende Versorgung der Umsatzkultur mit Glucose war über den gesamten Fermentationszeitraum gewährleistet. Aus den in diesem Experiment erhaltenen Daten ergibt sich für den gesamten Biotransformationszeitraum von 50 h eine durchschnittliche 20 α -DHD-Produktionsrate von ca. 115 μ M/d, wobei die Umsatzrate in den ersten 30 h parallel zur Biomassekonzentration zunahm und danach konstant etwa 192 μ M/d betrug. Die Fermentationskultur enthielt am Ende der Biotransformation eine Produktkonzentration von 239 μ M. Im vergleichbaren Dydrogesteron-Umsatzexperiment mit JMN8 (siehe

3.2.3) wurde eine Umsatzrate von ca. 98 $\mu\text{M}/\text{d}$ erreicht. Dementsprechend konnte die signifikante Steigerung der Ganzzell-Biotransformationsaktivität mit CAD302 im Vergleich zu JMN8, die in MTP-Experimenten beobachtet wurde (vgl. 3.3.2), im Fermentationsmaßstab bestätigt werden. Die HPLC-Analysen der ersten und der letzten Biotransformationsprobe werden in Abbildung 45 gezeigt.

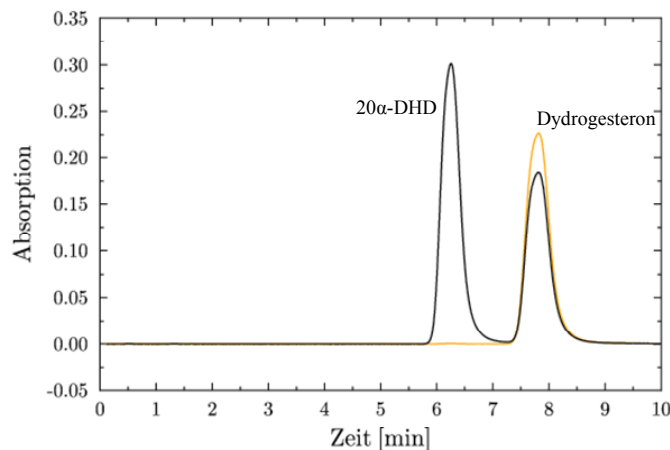


Abbildung 45: Biotransformation von Dydrogesteron mit CAD302 im 1,5 L-Fermentationsmaßstab. HPLC-Chromatogramm ($\lambda = 290 \text{ nm}$) von CAD302-Zellsuspensionen nach Inkubation mit 1 mM Dydrogesteron. Die Proben wurden zu Beginn (0 h, schwarze Linie) und am Ende (50 h, orange Linie) der Biotransformation entnommen. Entsprechend diesem Diagramm beträgt der relative 20 α -DHD-Anteil in der letzten Probe ca. 57 %.

Aus Abbildung 45 wird ersichtlich, dass der relative 20 α -DHD-Anteil an der gesamten Substanzmenge aus Produkt und Substrat nach 50 h Biotransformation mit CAD302 etwa 57 % beträgt. Diese Biotransformationsreaktion wurde nicht über einen längeren Zeitraum fortgeführt, da das Ziel dieses Experiments nicht das Erreichen eines Totalumsatzes war, sondern die Bestimmung der Umsatzeffizienz des neuen Stamms CAD302 unter Fermentationsbedingungen. Mit dem Spalthestamm CAD302 konnte somit unter diesen Fermentationsbedingungen eine beträchtliche Steigerung der Biotransformationsrate um fast 30 % gegenüber Prozessführung A (vgl. 3.2.3) erreicht werden. Die folgende Optimierung der Biotransformation von Dydrogesteron mit CAD302 im 1 l-Labormaßstab zielte auf eine weitere Steigerung der Umsatzrate ab, was als wichtige Voraussetzung für die Produktion höherer Mengen 20 α -DHD in größerem Maßstab angesehen wurde.

3.4.4.2 20 α -DHD-Produktion mit automatisiertem *feeding* – Prozessführung D

Nachdem bereits im ersten Dydrogesteron-Biotransformationsexperiment mit dem verbesserten Stamm CAD302 im 1 l-Bioreaktor eine im Vergleich zum entsprechenden Experiment mit JMN8 (Prozessführung A) deutlich erhöhte Umsatzrate erreicht werden konnte, wurden die ersten Änderungen der Fermentationsparameter hauptsächlich auf eine Verbesserung des *feedings* ausgerichtet. Eine optimale Versorgung der Kulturen

mit Glucose erwies sich in vorangegangenen Experimenten als unerlässlich für eine erfolgreiche Biotransformation. Um dies zu erreichen wurde das Anfangsvolumen der *fed-batch*-Kultur im „Biostat“-Bioreaktor von 0,7 l auf 0,6 l reduziert. Das *feeding* der Kultur erfolgte erstmals mit einer automatisch geregelten, wachstumsratenangepassten *feed*-Strategie mit FM1 statt manuell mit Glucoselösung und begann 8 h nach Fermentationsstart. Das Fermentationsmedium (EMM) wurde mit CAD302-Zellen einer 400 ml-Kultur beimpft, die in Abwesenheit von Thiamin 4 Tage inkubiert worden war; 315 mg (1 mmol) Dydrogesteron vorgelöst in 10 ml Ethanol wurden als Substrat zugesetzt, was einer Anfangssubstratkonzentration von ca. 1,7 mM entspricht. Die Dauer der Fermentation betrug 116 h. Alle anderen Parameter blieben unverändert. Die Daten dieser Dydrogesteronbiotransformation werden in Abbildung 46 gezeigt.

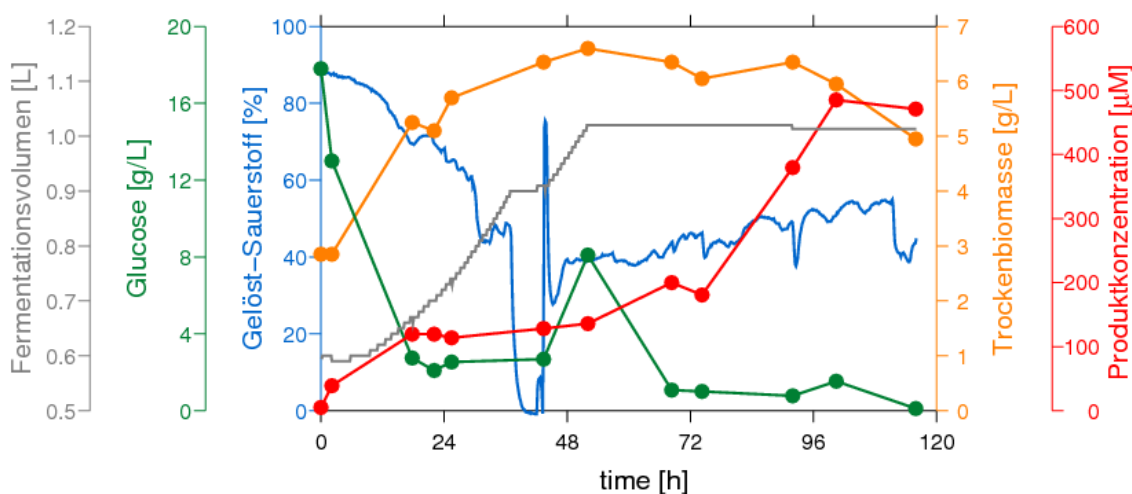


Abbildung 46: Biotransformation von Dydrogesteron mit CAD302 im 1,5 l-Fermenter unter optimierten Bedingungen. *Fed-batch*-Kultur von CAD302 in EMM bei 30 °C mit 1 mmol Dydrogesteron. Das *feeding* der Kultur erfolgte automatisiert mit FM1. pH-Wert und Gelöst-Sauerstoff wurden kontinuierlich gemessen. Proben wurden regelmäßig entnommen und bezüglich Glucosekonzentration, Trockenbiomasse und Produktbildung untersucht.

Die Trockenbiomassezunahme von 2,9 g/l auf 6,6 g/l fand innerhalb der ersten 48 h statt, danach stagnierte die Biomassekonzentration über einen langen Zeitraum und nach mehr als 100 h Fermentationsdauer kam es zu einer leichten Abnahme der Trockenbiomasse. Nach 43 h erreichte der Gelöst-Sauerstoff einen Wert von 0 %. Daraufhin wurde die Belüftungsrate auf 3 l/min und die Rührgeschwindigkeit auf 600 Upm angehoben, was den Gelöst-Sauerstoff erneut auf Werte zwischen 40 und 60 % ansteigen ließ. Das automatische *feeding* mit FM1 bewirkte eine ausreichende Glucoseversorgung der Kultur über den gesamten Zeitraum. Die Umsatzaktivität erreichte ein erstes Maximum von etwa 161 µM/d in den ersten 18 h der Biotransformation, danach reduzierte sich die Umsatzaktivität vorübergehend (bis zu 74 h Biotransformationszeit) auf einen mittleren Wert um 26 µM/d. Ein zweites Maximum der Umsatzaktivität von etwa 280 µM/d schließt sich bis zu 100 h Fermentationszeit an. Ab diesem Zeitpunkt, auf den gleichzeitig auch die Abnahme der Trockenbiomasse fällt, weist die Kultur keine

weitere Umsatzaktivität auf. Am Ende der Biotransformation wurde eine Produktkonzentration von 471 μM erreicht, was einer mittleren Umsatzaktivität von ca. 97 $\mu\text{M}/\text{d}$ im gesamten Fermentationszeitraum entspricht. Betrachtet man lediglich die ca. 100-stündige Phase der erfolgreichen Biotransformation, so beträgt die Umsatzrate 116 $\mu\text{M}/\text{d}$. Damit liegt die Biotransformationsaktivität in dieser CAD302-*fed-batch*-Kultur noch im Bereich der zuvor durch manuelles *feeding* erreichten (115 $\mu\text{M}/\text{d}$; vgl. 3.4.4.1). Es wurde somit eine erste automatisierte *feed*-Strategie entwickelt und erstmals erfolgreich eingesetzt, welche die Versorgung der Biotransformationskultur mit Glucose sowie, neben wichtigen Mineralstoffen, Spurenelementen und Vitaminen, einer leicht verfügbaren Stickstoffquelle $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ gewährleistet. Diese sollte im Folgenden noch weiter auf die Bedürfnisse einer CAD302-Umsatzkultur angepasst werden.

3.4.4.3 20 α -DHD-Produktion mit verbessertem Medium und β -Cyclodextrin-Zusatz – Prozessführung E

Da in parallel zu diesen Dydrogesteron-Biotransformationsexperimenten durchgeführten Fermentationsversuchen Hinweise darauf erlangt wurden, dass *S. pombe*-Zellen in phthalatfreiem Medium zu höheren Zelldichten heranwachsen können als in EMM wurde auch der Dydrogesteronumsatz bei Verwendung des entsprechenden, von Daniela Buchheit entwickelten Fermentationsmediums DM1 im Bioreaktor untersucht. Darüberhinaus wurde die Substratlöslichkeit durch den Einsatz von β -Cyclodextrin im molaren Verhältnis von 1:1 zum Substrat erhöht, was sich förderlich auf die Umsatzrate auswirken kann, wie in vorangegangenen Experimenten in Schüttelkolben (vgl. 3.4.2) gezeigt wurde. Das Anfangsvolumen der *fed-batch*-Kultur wurde von 0,6 l auf 0,5 l weiter reduziert, um ausreichende Volumenkapazität für ein angepasstes *feeding* der Kultur über einen längeren Zeitraum zu schaffen. Dadurch erhöhte sich die Anfangssubstratkonzentration auf 2 mM. Die Belüftungsrate wurde auf 3 l/min angehoben. Das *feeding* der Kultur erfolgte ab Fermentationsstart mit einer automatisch geregelten, wachstumsratenangepassten *feed*-Strategie mit FM1, wobei der c-Parameter bei Bedarf manuell nachgeregelt wurde. Die Fermentationsdauer betrug 51 h. Alle weiteren Parameter blieben vorerst unverändert und entsprachen damit denen der Prozessführung D. Eine detaillierte Übersicht über die Entwicklung der Prozessführungs- und *feeding*-Strategien sowie genaue Angaben zu Zeitpunkt und Umfang manueller Nachregelungen finden sich im Anhang. Die Daten der entsprechenden Dydrogesteronbiotransformation werden in Abbildung 47 gezeigt.

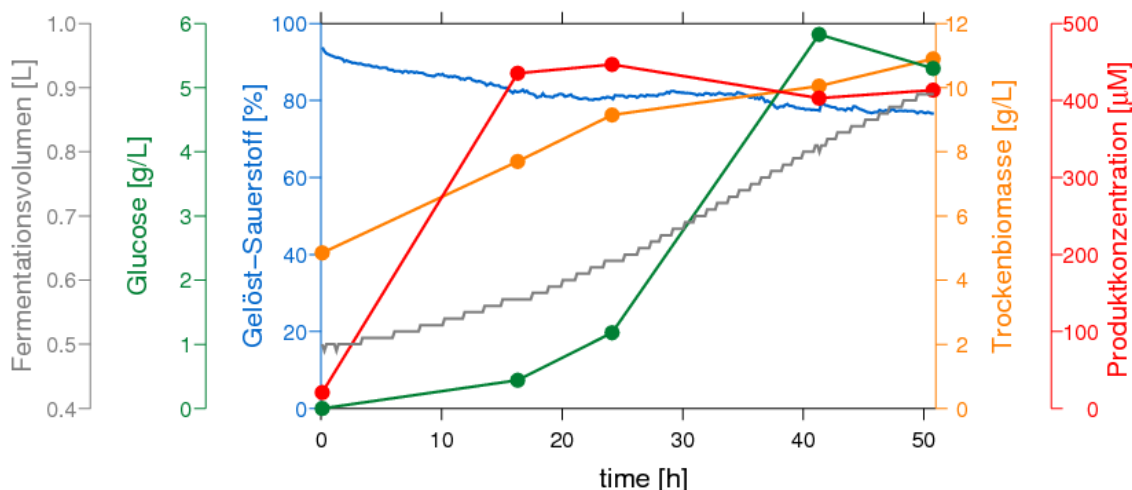


Abbildung 47: Biotransformation von Dydrogesteron mit CAD302 im 1,5 l-Fermenter gemäß Prozessführung E. *Fed-batch*-Kultur von CAD302 in DM1 bei 30 °C mit 1 mmol Dydrogesteron in Anwesenheit von 1 mmol β -Cyclodextrin im Medium. Das *feeding* der Kultur erfolgte automatisiert mit FM1. pH-Wert und Gelöst-Sauerstoff wurden kontinuierlich gemessen. Proben wurden regelmäßig entnommen und bezüglich Glucosekonzentration, Trockenbiomasse und Produktbildung untersucht.

Wie aus Abbildung 47 zu entnehmen ist, nahm die Glucosekonzentration im anfangs glucosefreien DM1-Medium durch das *feeding* im Laufe der Fermentation bis auf Werte um 5 g/l zu. Betrachtet man die anderen untersuchten Parameter, so zeigt sich ein Fermentationsverlauf, wie er ähnlich bereits in den vorherigen CAD302-Biotransformationen im 1,5 l-Bioreaktor zu beobachten war. Die Trockenbiomasse nahm über etwa 2 Tage stetig zu (von 4,9 g/l auf 10,9 g/l), die größte Steigerung der Produktkonzentration erfolgte innerhalb der ersten 24 h der Biotransformation (447 μ M/d). Danach erreichte die Produktkonzentration unter Berücksichtigung des stetig steigenden Kulturvolumens eine Plateauphase. Aus den in diesem Experiment erhaltenen Daten wurde für den Biotransformationszeitraum von 51 h eine mittlere 20α -DHD-Produktionsrate von ca. 195 μ M/d bestimmt. Da sich unter Verwendung dieser neuen Parameter eine weitere deutliche Steigerung der Umsatzaktivität um fast 70 % erreichen ließ, wurde in allen folgenden Biotransformationen DM1 als Fermentationsmedium eingesetzt, welches vor Substratzugabe mit β -Cyclodextrin im molaren Verhältnis von 1:1 zum Substrat versetzt wurde.

Um Metabolitmengen im Gramm-Maßstab ökonomisch sinnvoll zu produzieren, ist es trotz stark erhöhter Umsatzaktivität notwendig, die Produktion in Bioreaktoren im großen Maßstab durchzuführen. Aus diesem Grund erfolgten weitere Biotransformationen im Pilotmaßstab und die weitere Optimierung des Produktionsverfahrens zielte auf die Produktion in solchen Bioreaktoren ab.

3.4.5 *Fed-batch*-Produktion von 20 α -DHD im 70 l-Bioreaktor

3.4.5.1 20 α -DHD-Produktion – Prozessführung G

Die Produktion von 20 α -DHD sollte durch optimierte Biotransformationen von Dihydrogesteron mit dem Stamm CAD302 im „Labor-Pilot“ Bioreaktor erfolgen. Basierend auf den bisherigen Untersuchungsergebnissen zu verschiedenen, die AKR1C1-abhängige Steroidreduktion beeinflussenden Parametern, insbesondere Fermentations- und *feed*-Medium sowie *feed*-Strategie, wurden im ersten entsprechenden Umsatzexperiment erste Erfahrungen mit dem System im Pilotmaßstab gesammelt. Das *feeding* der Kultur erfolgte über 36 h weitestgehend analog zur letzten vorangegangenen Dihydrogesteronbiotransformation im 1 l-Bioreaktor (vgl. 3.4.4.3) mit einer automatisch geregelten, wachstumsratenangepassten *feed*-Strategie mit FM1, danach konstant mit nach Bedarf manuell angepassten Flussraten. Darauf aufbauend konnte die anschließende Produktionsoptimierung erfolgen. Der Fermenter wurde während dieser ersten Biotransformation im Pilotmaßstab konstant mit einer Flussrate von 9 l/min belüftet. Das Fermentationsmedium wurde mit abzentrifugierter Biomasse aus vier 1 l-EMM-Kulturen von CAD302 beimpft, die drei Tage inkubiert worden waren. Nach einer Biomasseanzuchtsphase von ca. 21 h wurden 80 mmol (90,8 g) in 500 ml dH₂O vorgelöstes β -Cyclodextrin und im Anschluss daran 80 mmol (25 g) Dihydrogesteron, vorgelöst in 500 ml Ethanol, zugegeben. Damit betrug die Substratkonzentration zu Beginn der Biotransformation ca. 3,6 mM. Die Fermentation wurde über einen Zeitraum von 132 h fortgeführt, was einer Gesamtlaufzeit von 156 h entspricht. Das *feeding* der Kultur erfolgte mit FM1 mit 0,01 % (w/v) Adenin. In der Biomasseanzuchtsphase wurde die Glucosekonzentration im Medium zwischen 0,1 und 3 g/l eingestellt. Nach der Substratzugabe wurde die Glucosekonzentration auf einen Bereich zwischen 0,5 und 7,5 g/l erhöht. Eine detaillierte Übersicht über die Entwicklung der Prozessführungs- und *feeding*-Strategien sowie genaue Angaben zu Zeitpunkt und Umfang manueller Nachregelungen finden sich im Anhang. Die Daten der ersten Biotransformation von Dihydrogesteron im Pilot-Fermentationsmaßstab sind in Abbildung 48 gezeigt.

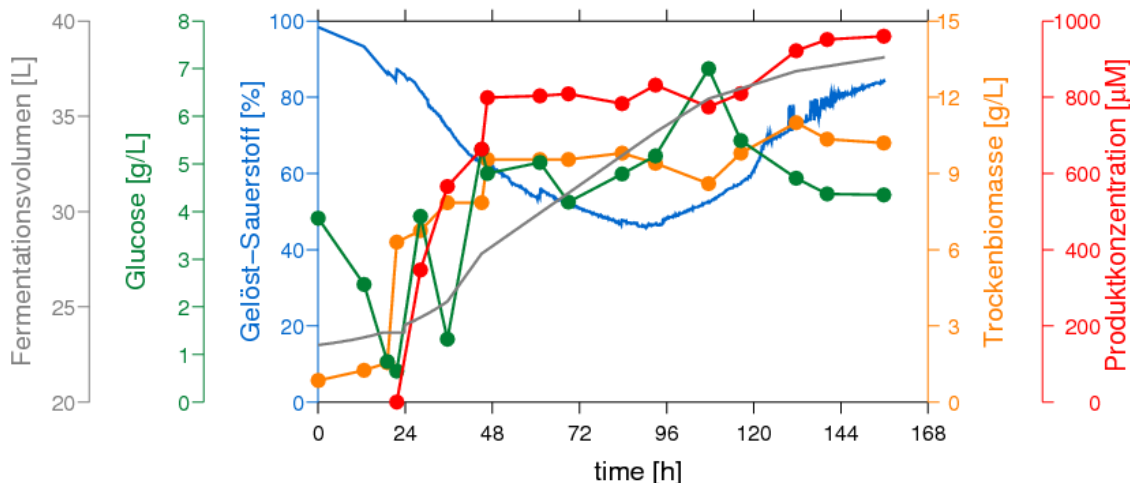


Abbildung 48: Erste Biotransformation von Dydrogesteron im 70 l-Fermenter. *Fed-batch*-Kultur des Produktionsstamms CAD302 in DM1 bei 30 °C. 25 g Dydrogesteron als Substrat wurden nach 24 h Biomasseanzucht zugegeben. Der pH-Wert und Gelöst-Sauerstoff wurden kontinuierlich gemessen. Proben wurden regelmäßig entnommen und bezüglich Glucosekonzentration, Trockenbiomasse und Produktbildung untersucht.

Die ersten 48 h der Fermentation wiesen die stärkste Biomassezunahme auf (von etwa 0,9 g/l auf 9,6 g/l Trockenbiomasse) bei gleichzeitigem kontinuierlichem Abfall der Sauerstoffsättigung im Kulturmedium auf ca. 60 %. Die Biotransformationsphase zeigte eine relativ konstante Biomassekonzentration (ca. 9 g/l) bei zuerst weiter sinkendem Sauerstoffgehalt (bis 50 % Sauerstoffsättigung). Ab etwa 96 h Fermentationsdauer stieg der Gelöst-Sauerstoff im Kulturmedium wieder langsam an. Dieses Verhalten ist durch steigenden Fermenterinnendruck aufgrund zunehmenden Zusetzens des Abluftfilters durch Schaumbildung während des Prozesses erklärbar. Die 20 α -DHD-Produktion verlief im Biotransformationszeitraum nicht kontinuierlich, sondern lässt sich in drei Phasen unterteilen: In den ersten 24 h der Biotransformation zeigte sich die bei weitem stärkste Umsatzaktivität (ca. 800 μ M/d). Auf diese Phase folgte ein Zeitraum von etwa 72 h, in denen die Produktkonzentration unter Berücksichtigung des mit der Zeit zunehmenden Kulturvolumens in etwa stagnierte. In den letzten 48 h der Biotransformation stieg die Umsatzaktivität erneut auf einen Wert um 80 μ M/d an. Für den gesamten Biotransformationszeitraum von 132 h ergibt sich so eine durchschnittliche Produktionsrate von 175 μ M/d (oder 2,1 g/d). Die Produktkonzentration betrug am Ende der Biotransformation 960 μ M, was bezogen auf das Fermentationsendvolumen von etwa 38 l, einer Produktmenge von 11,5 g entspricht.

Bei der optimierten Biotransformation von Dydrogesteron mit CAD302 im 1 l-Maßstab (siehe 3.4.4.2) konnte bei einer Umsatzrate von ca. 195 μ M/d eine Produktivität von 55 mg/d erreicht werden. Ziel dieses Experiments war die Übertragung des im 1 l-Fermentationsmaßstab optimierten 20 α -DHD-Produktionsprozesses auf den Pilotmaßstab. Obwohl sich bei diesem Schritt die Produktivität pro Volumeneinheit in geringem Maße reduzierte wurde bereits im ersten Fermentationsdurchlauf mit 2,1 g/d

eine Produktionsrate erreicht, die als guter Ausgangswert für weitere Verbesserungen in der Produktion größerer Mengen an 20α -DHD angesehen werden konnte.

3.4.5.2 Verbesserung der 20α -DHD-Produktion – Prozessführung H

Ausgehend von den Ergebnissen der ersten Dydrogesteronbiotransformation im Pilotmaßstab mit Prozessführung G wurden einzelne Parameter bei ansonsten weitestgehend gleichbleibenden Bedingungen verändert, um deren Optimum weiter einzugrenzen. So wurde die eingesetzte Substratmenge im Bereich zwischen 15 g und 25 g variiert, um ein möglichst gutes Produkt:Substrat-Verhältnis sowie genügend große Produktmengen zu erhalten. Dabei blieb das Verhältnis zwischen eingesetzter Substrat- und β -Cyclodextrinmenge jedoch stets unverändert. Weiterhin wurde die Anfangsbiomassekonzentration erhöht, indem das Fermentationsmedium mit abzentrifugierter Biomasse aus sechs statt wie zuvor aus vier CAD302-1 l-Kulturen beimpft wurde. Um das Fermentationsvolumen noch weiter zu reduzieren, was die anschließende Produktaufreinigung erleichtert, wurde der FM1-*feed* zudem doppelt konzentriert. In einem für dieses Stadium des Optimierungsprozesses beispielhaften Biotransformationsexperiment erfolgte das *feeding* der Kultur über 42 h mit einer automatisch geregelten, wachstumsratenangepassten *feed*-Strategie mit FM1, danach konstant mit nach Bedarf manuell angepassten Flussraten. Nach 23 h wurden 56 mmol (63,6 g) in 400 ml dH₂O vorgelöstes β -Cyclodextrin und im Anschluss daran 56 mmol (17,5 g) Dydrogesteron vorgelöst in 400 ml Ethanol zugegeben. Damit betrug die Substratkonzentration zu Beginn der Biotransformation nur noch ca. 2,5 mM (statt 3,6 mM wie zuvor). Die Fermentation wurde bis zu einer Gesamtfermentationszeit von 160 h fortgeführt. Die Belüftungsrate wurde nach 89 h auf 12 l/min erhöht, um den Gelöst-Sauerstoff stets über 20 % zu halten. Eine detaillierte Übersicht über die Entwicklung der Prozessführungs- und *feeding*-Strategien sowie genaue Angaben zu Zeitpunkt und Umfang manueller Nachregelungen finden sich im Anhang. Die Daten dieser verbesserten 20α -DHD-Produktion werden in Abbildung 49 gezeigt.

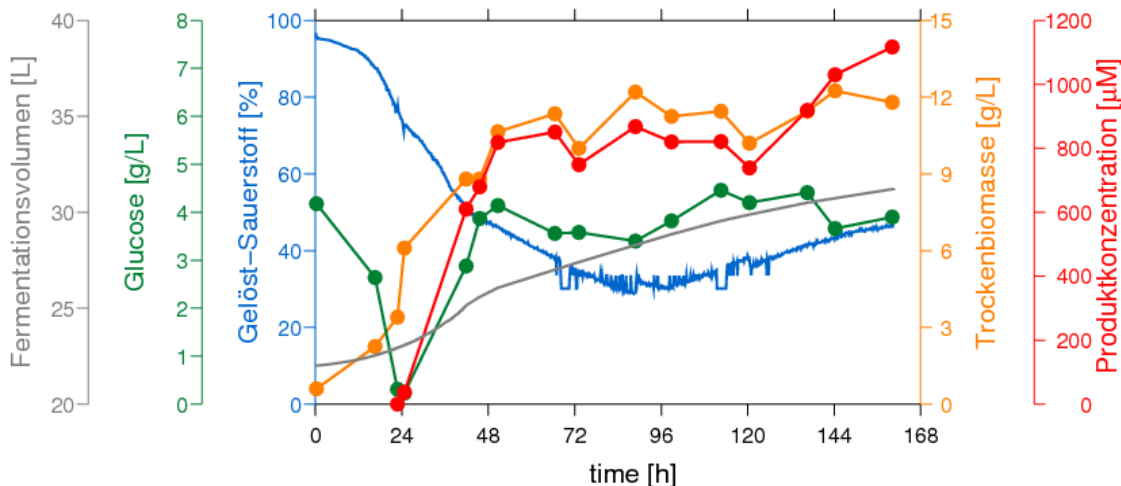


Abbildung 49: Biotransformation von Dydrogesteron im 70 l-Fermenter unter optimierten Bedingungen. *Fed-batch*-Kultur des Produktionsstamms CAD302 in DM1 bei 30 °C. 17,5 g Dydrogesteron als Substrat wurden nach 24 h Biomasseanzucht zugegeben. pH-Wert und Gelöst-Sauerstoff wurden kontinuierlich gemessen. Proben wurden regelmäßig entnommen und bezüglich Glucosekonzentration, Trockenbiomasse und Produktbildung untersucht.

Die ersten 48 h der Fermentation wiesen auch unter diesen Bedingungen die stärkste Biomassezunahme auf (von 0,6 g/l auf ca. 9,5 g/l Trockenbiomasse), bei gleichzeitigem kontinuierlichem Abfall der Sauerstoffsättigung im Kulturmedium auf ca. 50 %. Die weitere Biotransformationsphase zeigte eine leicht zunehmende Biomassekonzentration (bis 12,3 g/l) und sinkenden Sauerstoffgehalt. Ohne die nachträgliche Erhöhung der Belüftungsrate wäre eine ausreichende Sauerstoffversorgung nicht gewährleistet gewesen. Das Ansteigen des Gelöst-Sauerstoffs nach etwa 96 h ist wiederum auf steigenden Fermenterinnendruck aufgrund zunehmenden Zusetzens des Abluftfilters durch Schaumbildung zurückzuführen. Durch eine verbesserte automatisierte *feed*-Strategie war es möglich, die Glucosekonzentration in der Biomasseanzuchtsphase im engen Bereich zwischen 0,2 und 4 g/l, sowie während der Biotransformation im erhöhten Bereich von 0,2 bis 4,5 g/l konstant zu halten. Die 20 α -DHD-Produktion kann auch in diesem Prozess in drei Phasen unterteilt werden: In den ersten 24 h der Biotransformation zeigte sich die stärkste Umsatzaktivität von ca. 750 μ M/d. Darauf folgte ein Zeitraum von etwa 72 h in dem die Produktkonzentration unter Berücksichtigung des mit der Zeit zunehmenden Kulturvolumens in etwa stagnierte. In den letzten 48 h stieg die Umsatzaktivität erneut auf einen Wert um 150 μ M/d an. Durch die Optimierung des 20 α -DHD-Produktionsverfahrens im 70 l-Bioreaktor konnte so für den gesamten Biotransformationszeitraum von 136 h eine mittlere Produktionsrate von 197 μ M/d erreicht werden, was verglichen mit der ersten 20 α -DHD-Produktion in diesem Maßstab (siehe 3.4.5.1) eine Steigerung um fast 15 % und damit einen mit der optimierten Produktion im 1 l-Maßstab (siehe 3.4.4.2) vergleichbaren Wert darstellt. Die Produktkonzentration betrug am Ende der Biotransformation 1,12 mM, was einer Produktmenge von 10,6 g entspricht. Die Produktionsrate ist also mit 1,86 g/d nicht größer als im ersten Produktionsdurchlauf im Pilotmaßstab, bei dem 2,1 g/d erreicht

wurden. Generell lässt sich festhalten, dass bei geringeren eingesetzten Substratmengen zwar ein prozentual höherer Umsatz erfolgt, wobei allerdings die Gesamtproduktausbeute sinkt. Es stellte sich heraus, dass mit dem Einsatz von 20 g Dydrogesteron, also einer Substratanfangskonzentration von etwa 2,9 mM, ein zufriedenstellendes Gleichgewicht zwischen gutem Umsatz und ausreichender Produktmenge erzielt wird. Die in diesem Fermentationsexperiment angewandte *feed*-Strategie stellte sich ebenfalls als auf das System passend heraus und wurde daher in folgenden Biotransformationen so beibehalten.

3.4.5.3 20 α -DHD-Produktionsprozess – Prozessführung I

Basierend auf Prozessführung H und der Vielzahl von Erkenntnissen und Erfahrungen, die in verschiedenen Experimenten zu optimierter Biotransformation von Dydrogesteron mit CAD302 im Pilotmaßstab gewonnen wurden, ergab sich letztendlich ein effizienter Prozess für die technische Produktion von 20 α -DHD. Nachdem sich eine eingesetzte Substratmenge von 20 g für diesen Produktionsprozess als optimal erwies, wurde eine weitere Steigerung der Umsatzaktivität durch die weitere Erhöhung der Anfangsbiomassekonzentration angestrebt. Das *feeding* der Kultur erfolgte über 42 h mit einer automatisch geregelten, wachstumsratenangepassten *feed*-Strategie mit 2xFM1, danach konstant mit nach Bedarf manuell angepassten Flussraten. Nach 89 h wurde 2xFM1 dabei durch konzentrierte Glucoselösung (600 g/l) ersetzt. Der endgültige, optimierte Produktionsprozess, der mehrfach erfolgreich bei der Produktion von 20 α -DHD im g-Maßstab eingesetzt wurde, verlief wie unter 2.2.3.6 beschrieben. Eine detaillierte Übersicht über die Entwicklung der Prozessführungs- und *feeding*-Strategien sowie genaue Angaben zu Zeitpunkt und Umfang manueller Nachregelungen finden sich im Anhang. Beispielhafte Daten einer entsprechenden optimierten Produktions-Biotransformation sind in Abbildung 50 gezeigt.

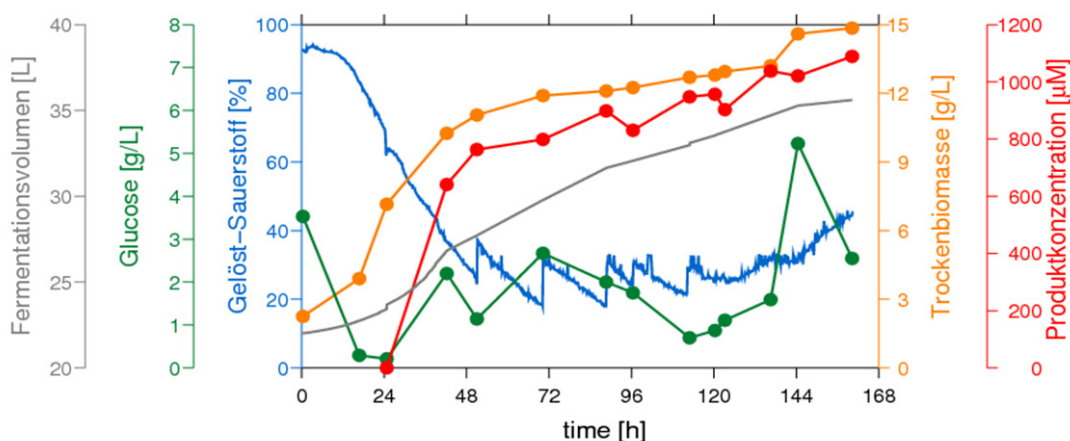


Abbildung 50: Optimierte 20 α -DHD-Produktion durch Ganzzell-Biotransformation im 70 l-Fermenter. *Fed-batch*-Kultur des Produktionsstamms CAD302 in DM1 bei 30 °C. 20 g Dydrogesteron als Substrat wurden nach 24 h Biomasseanzucht zugegeben. pH-Wert und Gelöst-Sauerstoff wurden kontinuierlich gemessen. Proben wurden regelmäßig entnommen und bezüglich Glucosekonzentration, Trockenbiomasse und Produktbildung untersucht.

Durch das bestmögliche Zusammenspiel der einzelnen Fermentationsparameter und insbesondere durch ein optimal angepasstes *feeding* war es möglich, eine stetige Zunahme der Biomassekonzentration während der gesamten Fermentationszeit zu erreichen. Die Metabolitenbildung verlief dabei annähernd parallel. Die ersten 24 h der Biotransformation blieben die Phase der stärksten Umsatzaktivität (um 700 $\mu\text{M}/\text{d}$). Im fertiggestellten, optimierten 20α -DHD-Produktionsverfahren im 70 l-Bioreaktor war es jedoch möglich, die in früheren Biotransformationen in diesem Maßstab vorhandene, ca. 72-stündige Plateauphase bei der Produktbildung zu umgehen. Damit konnte im gesamten Biotransformationszeitraum zwischen 24 h und 136 h eine durchschnittliche Produktionsrate von etwa 190 $\mu\text{M}/\text{d}$ reproduzierbar erreicht werden. Es ergab sich eine Produktivität des Systems von ca. 2,1 g/d, was 12 g produziertem 20α -DHD pro Fermentation entspricht. Mit der Gesamtdauer von 160 h pro Dihydrogesteron-Biotransformationsprozess war es möglich, im Dauerbetrieb jede Woche eine Pilotfermentation durchzuführen. Insgesamt wurde dieser Prozess viermal hintereinander auf identische Weise durchgeführt. Dabei wiesen die einzelnen Produktionen eine äußerst hohe Reproduzierbarkeit hinsichtlich Fermentationsverlauf und Produktbildung auf.

Nach der Biotransformation wurde das Produkt, welches sich am Ende der Fermentationen in einem Kulturvolumen von etwa 35 bis 40 l befand, in einem mehrstufigen Verfahren aus der Fermentationskultur extrahiert und gereinigt. Die Reinigung des produzierten 20α -DHDs war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sondern wurde parallel von Dr. Andy Zöllner entwickelt und betreut. Im Reinigungsprozess wurden die Hefezellen vor der Extraktion durch Zentrifugation aus der Fermentationskultur entfernt. Dabei wurde ein Großteil des nicht umgesetzten Substrats abgetrennt. Die Produktextraktion aus dem Überstand sowie aus den Zellen erfolgte dann jeweils getrennt in einem Flüssig-flüssig-Extraktionsverfahren mit Ethylacetat. Das Verhältnis von Fermentationskultur zu Ethylacetat betrug dabei 3:1. Nach der gründlichen Durchmischung beider Flüssigkeiten wurde die organische Phase (ca. 16 l) von der wässrigen Phase getrennt und bis auf ein Volumen von etwa 500 ml eingedampft. Die Extraktionseffizienz betrug laut HPLC-Analyse ca. 90 %. Es folgte eine erste Grobreinigung mit handelsüblichen Kieselgelsäulen, um störende Substanzen, die ebenfalls aus der Fermentationskultur extrahiert wurden und eine große Affinität zur Kieselgelmatrix aufweisen (z.B. Glucose), abzutrennen. Bei der anschließenden Säulenchromatografie wurden Produkt und Substrat mit einem Ethylacetat/n-Hexan-Gemisch im Verhältnis 3:1 getrennt. Fraktionen, die bei 290 nm eine Absorption aufwiesen, wurden gesammelt und erneut auf ein Volumen von ca. 300-400 ml eingedampft. In diesem Schritt gingen etwa 2-5 % des Produkts verloren, er trug jedoch zu einer deutlich größeren Effektivität bei der anschließenden Endreinigung bei. Diese wurde ebenfalls mit Hilfe von Kieselgelsäulen und dem bereits zuvor verwendeten Ethylacetat:n-Hexan (3:1) als Fließmittel durchgeführt. Die vorgereinigten Extrakte wurden manuell auf die Chromatographiesäulen geladen und das Substrat wurde bei einem kontinuierlichen Fluss von 70 ml/min nach ca. 7-8 min eluiert, während das

Produkt nach etwa 9-13 min die Säule verlies. Die Produktfraktionen wurden gesammelt und bis zur vollständigen Trockenheit eingedampft.

Die Reinigungsausbeute aus einer Biotransformation im 70 l-Bioreaktor lag zwischen 80 und 85 %, wobei 100 % dem am Ende der Biotransformation in der Fermentationskultur vorhandenen Produkt entsprechen. Etwa 7,5-13 g 20α -DHD, abhängig von der Umsatzrate, wurden aus einer einzelnen Biotransformationskultur aufgereinigt. Abbildung 51 zeigt eine HPLC-Analyse des gereinigten Produkts.

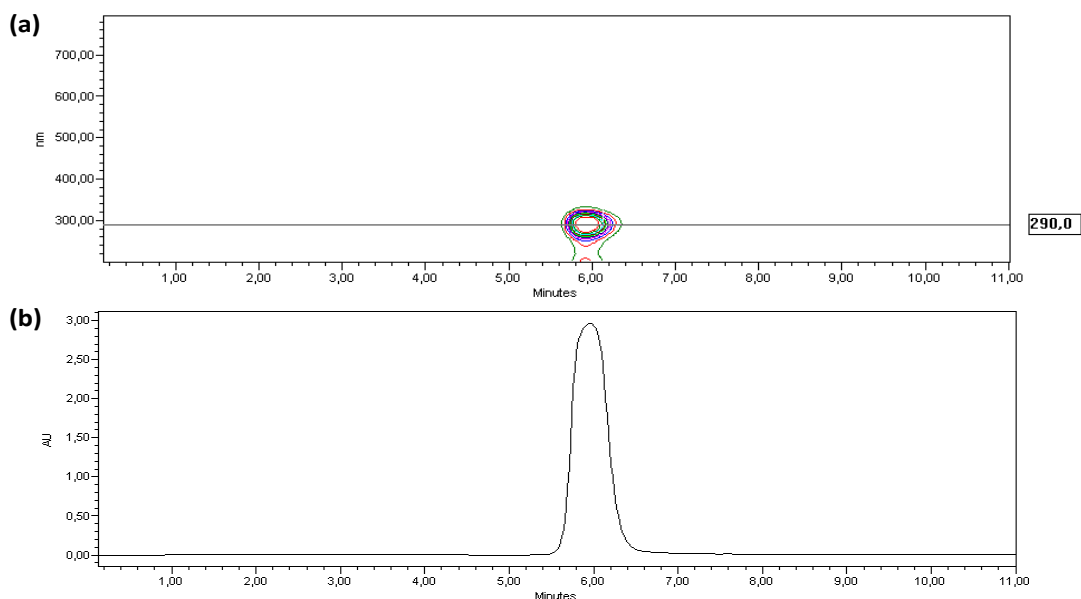


Abbildung 51: HPLC-Analyse von gereinigtem 20α -DHD (1 mg/ml). Abbildung (a) zeigt ein Wellenlängenraster im Bereich von 200 – 700 nm. Abbildung (b) zeigt das bei 290 nm Wellenlänge extrahierte HPLC-Chromatogramm.

Wie in Abbildung 51 zu sehen ist waren bei dieser Analyseverfahren keine signifikanten Verunreinigungen detektierbar. Die Produktreinheit betrug laut HPLC-Analyse ca. 99 %. Die Qualität des produzierten 20α -DHDs wurde darüberhinaus von Dr. Josef Messinger (Solvay Pharmaceuticals GmbH) in NMR-Analysen überprüft. Diese Analysen bestätigten die hohe Produktqualität.

Ein Hauptziel dieser Arbeit war die effiziente und ökonomische AKR1C1-abhängige Reduktion von Dydrogesteron im Gramm-Maßstab. Im vorliegenden Teil wurde zunächst die Optimierung einzelner, im Produktionsprozess wichtiger Parameter beschrieben. Erste Biotransformationen von Dydrogesteron mit CAD302 im *fed-batch*-Verfahren wurden im 1 l-Bioreaktor durchgeführt und weitere prozesstechnische Verbesserungen im Labormaßstab erfolgten. Dann wurde das Verfahren erfolgreich auf den großtechnischen Maßstab übertragen und noch weiter entwickelt. Damit wurde ein zuverlässiges, effizientes und ökonomisches Ganzzell-Biotransformationsverfahren mit rekombinanten *S. pombe*-Zellen im Pilotmaßstab etabliert und bezüglich hoher Produktivität und Umsatzrate optimiert. Durch die Veränderung vieler Parameter, wie

beispielsweise Wachstumsbedingungen der Vorkulturen, automatisierter *feeding*-Strategie, Substratkonzentration, Erhöhung der Substratlöslichkeit usw., konnte ein Prozess aufgebaut werden, der 50 bis 75 % Umsatz von 20 g Substrat innerhalb von 136 h ermöglicht. In Kombination mit einem effektiven und verlässlichen Reinigungsverfahren, das die Wiederfindung von etwa 80 % der theoretischen Menge des Produkts aus der Fermentationskultur erlaubt, wurde eine kontinuierliche Produktionsrate von ca. 7,5 bis 13 g 20 α -DHD pro Woche erzielt. Durch die mehrfache Anwendung des neu etablierten Produktionsprozesses wurden insgesamt mehr als 120 g 20 α -DHD im Kundenauftrag hergestellt.

3.4.6 *Fed-batch*-Produktion von 20 α -DHP im 70 l-Bioreaktor – Prozessführung J

Nachdem ein großtechnischer Prozess zur effizienten Herstellung von 20 α -DHD basierend auf der Ganzzell-Biotransformation mit *S. pombe*-Stamm CAD302 entwickelt und mehrfach erfolgreich angewandt worden war folgte die analoge Durchführung mit Progesteron, dem natürlichen Substrat der AKR1C1. Vorrangiges Ziel war dabei, grundlegende Erkenntnisse über die Möglichkeit der Übertragung des gesamten Prozesses auf ein anderes Substrat zu erlangen. Zweites Ziel war die exemplarische Produktion des kommerziell schwer erhältlichen 20 α -DHP im Gramm-Maßstab mit möglichst geringem Aufwand. Alle bei der 20 α -DHD-Produktion gewonnenen Erkenntnisse und optimierten Parameter wurden dabei unverändert eingesetzt. Damit entspricht die hier durchgeführte Prozessführung J, abgesehen vom Substratunterschied, exakt Prozessführung I (siehe 3.4.5.3; Anhang). Das *feeding* der Kultur erfolgte über 44 h mit einer automatisch geregelten, wachstumsratenangepassten *feed*-Strategie mit FM1, danach konstant mit nach Bedarf manuell angepassten Flussraten. Nach 93 h wurde FM1 dabei durch konzentrierte Glucoselösung (600 g/l) ersetzt. Eine detaillierte Übersicht über die Entwicklung der Prozessführungs- und *feeding*-Strategien sowie genaue Angaben zu Zeitpunkt und Umfang manueller Nachregelungen finden sich im Anhang. Die Daten der großtechnischen 20 α -DHP-Produktion mit dem für Dydrogesteron als Substrat optimierten Prozess sind in Abbildung 52 dargestellt.

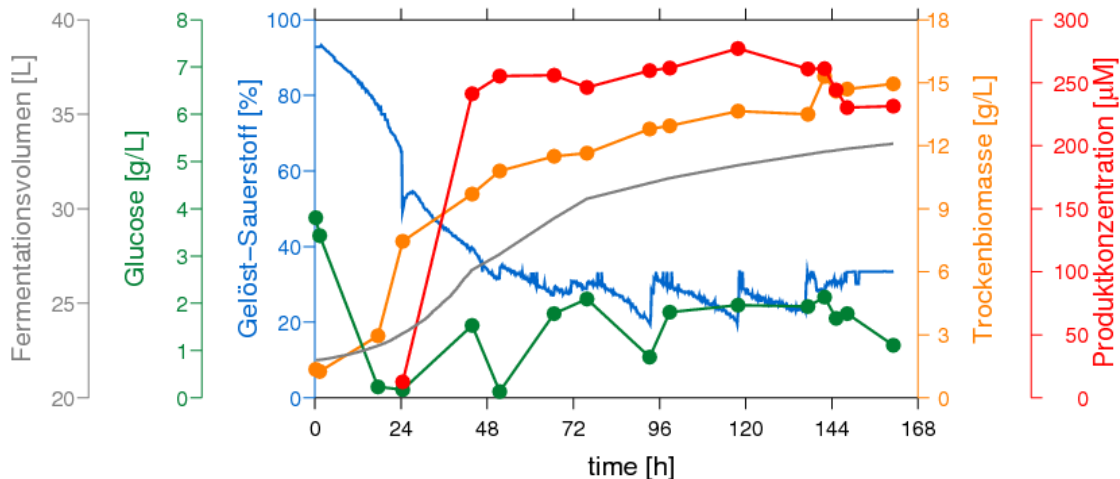


Abbildung 52: 20 α -DHP-Produktion durch Ganzzell-Biotransformation im 70 l-Fermenter. *Fed-batch*-Kultur des Produktionsstamms CAD302 in DM1 bei 30 °C. 20 g Progesteron als Substrat wurden nach 24 h Biomasseanzucht zugegeben. pH-Wert und Gelöst-Sauerstoff wurden kontinuierlich gemessen. Proben wurden regelmäßig entnommen und bezüglich Glucosekonzentration, Trockenbiomasse und Produktbildung untersucht.

Aus Abbildung 52 ist zu erkennen, dass die ersten 24 h der Biotransformation die bei weitem stärkste Umsatzaktivität (um 230 $\mu\text{M}/\text{d}$) aufwiesen. Im gesamten Biotransformationszeitraum von 137 h betrug die durchschnittliche Produktionsrate etwa 41 $\mu\text{M}/\text{d}$. Damit wurde eine Produktkonzentration von ca. 235 μM (74 mg/l) erreicht, was einem Umsatz von 12,4 % der eingesetzten 20 g Progesteron entspricht. Die Produktmenge in der Fermentationskultur betrug dementsprechend etwa 2,75 g. Die Biomassekonzentration zeigte einen annähernd parallelen Verlauf. Sie nahm während der gesamten Fermentationszeit stetig zu (von 1,3 g auf 14,95 g/l), wenn auch mit fortschreitender Dauer immer langsamer. Die Glucosekonzentration lag nach der Biomasseanzuchtsphase konstant im engen Bereich zwischen 0,13 und 2,13 g/l. Der Gelöst-Sauerstoff nahm innerhalb der ersten 48 h der Fermentation rasch ab und wurde danach durch mehrmalige Erhöhung der Belüftungsrate bei etwa 30 % gehalten. Damit war der gesamte Fermentationsverlauf, abgesehen von der um etwa 80 % geringeren Umsatzrate, dem optimierten 20 α -DHD-Produktionsprozess äußerst ähnlich.

Um das 20 α -DHP aus der Fermentationskultur zu reinigen wurde ein substanzspezifischer Aufarbeitungsprozess entwickelt, der weitgehend an die 20 α -DHD-Reinigung angelehnt ist. Der Reinigungsfortschritt und die Qualität des produzierten 20 α -DHPs wurden während des gesamten Prozesses stets durch HPLC-Analysen überwacht. Zunächst erfolgte die Isolation der Steroide aus der Kultur in einem Flüssig-flüssig-Extraktionsverfahren. Dabei wurde die Kulturflüssigkeit zunächst für 5 min bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde einmal mit Ethylacetat im Volumenverhältnis 1:1 in 2,5 l-Scheidetrichtern extrahiert. Die Zellen wurden dreimal mit Ethylacetat im Volumenverhältnis 1:1 extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (55-60 °C, 200-280 mbar) auf etwa 400 ml eingengt. Dieses Konzentrat enthielt unlösliche Flocken, deren Identität durch

HPLC-Analysen nicht aufgeklärt werden konnte. Um diese weitestgehend zu entfernen, wurde das Konzentrat auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt, anschließend für 10 min bei 12000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert und auf Eis filtriert. Der Filterkuchen wurde mit Ethylacetat gewaschen um enthaltene Steroide zu lösen. Das geklärte Ethylacetat wurde nun mit eisgekühltem dH_2O extrahiert und dann für die weitere Aufarbeitung eingesetzt.

In DC-Experimenten wurden vorab Fließmittel bestimmt, mit denen eine effiziente Trennung von Progesteron und 20α -DHP möglich ist. Diese Parameter wurden für die quantitative Trennung per Niederdruck-Flüssigkeits-Chromatografie übernommen. Der vorbehandelte Extrakt wurde mit einem *n*-Hexan:Ethylacetat-Gemisch im Verhältnis 11:9 (v/v) fraktioniert. Die Produktfraktion wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers eingedampft. Nach vollständiger Trocknung ergaben sich 3,2 g 20α -DHP mit einer Reinheit von 90 % (siehe Abbildung 53), was 80 % der theoretischen Gesamtproduktmenge entspricht.

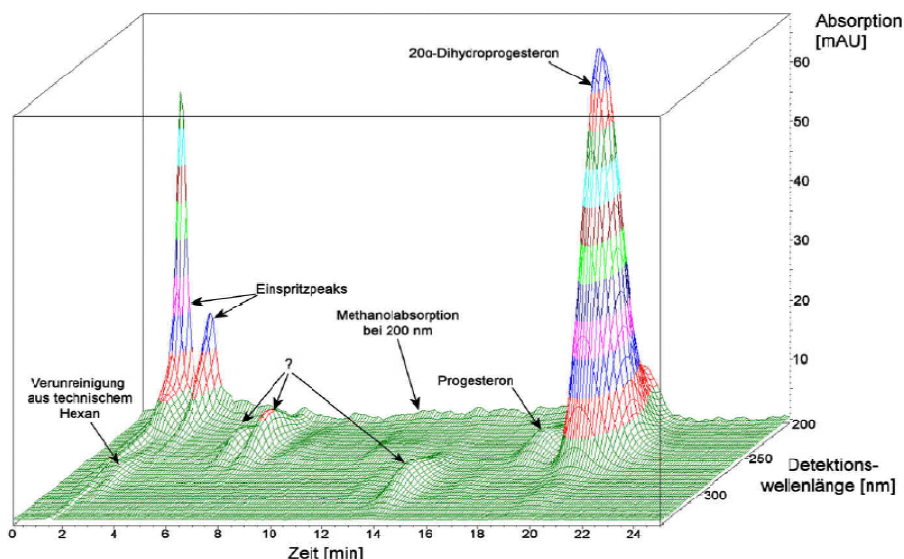


Abbildung 53: HPLC-Qualitätsanalyse von gereinigtem 20α -DHP. Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 200 – 340 nm (Laufmittel: 53 % MeOH, 47 % dH_2O (v/v); Flussrate: 1 ml/min; Säule: LiChroCART® 125-4, LiChrospher® 100 RP-8 (5 μm), Macherey-Nagel, Cat. 1.50942).

Damit wurde auch die angestrebte Produktion von 20α -DHP im Gramm-Maßstab erreicht, indem der für das Substrat Dydrogesteron optimierte Biotransformationsprozess ohne weitere Anpassungen direkt auf das Substrat Progesteron übertragen wurde. Die Produktion von 20α -DHP im Pilotmaßstab und die Produktaufarbeitung wurden im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von Jan Bechmann durchgeführt und ausgewertet.

4 Diskussion und Ausblick

Steroidhormone regulieren im menschlichen und tierischen Organismus grundlegende biologische Funktionen. Viele Steroidhormonderivate weisen anabole, antihormonelle, antiinflammatorische, antirheumatische, kontrazeptive oder sedative Wirkungen auf. Sie haben daher enorme Bedeutung als Medikamente und stellen heutzutage einen großen Bereich der pharmazeutischen Industrie dar. Die überwältigende Nachfrage nach Steroiden hat die Verfügbarkeit dieser Substanzen aus natürlichen Quellen seit Jahrzehnten bei weitem überstiegen. Dementsprechend besteht ein großer Bedarf an chemischen und enzymatischen Prozessen, die regio- und stereospezifische Veränderungen des Steroidrückgrats ermöglichen. Unter den Enzymen, die bekanntermaßen solche Reaktionen katalysieren, befinden sich einige Mitglieder der CYP- und der AKR- Enzymfamilien.

Meist werden Steroide technisch durch partielle Synthese hergestellt, die eine Kombination chemischer und biotechnologischer Reaktionsschritte umfasst. Letztere basieren immer noch hauptsächlich auf natürlichen Mikroorganismen, welche die gewünschten Aktivitäten aufweisen (Bureik & Bernhardt, 2007). Die Steroidmodifizierung durch Biotransformationen mit natürlichen Mikroorganismen wird in der Steroid-Industrie in einem sehr großen Maßstab (hunderte Tonnen pro Jahr) angewandt. Aufgrund des großen und immer weiter wachsenden Weltmarkts für Steroide hat in den letzten Jahren auch die Forschung an Steroidbiotransformationen, die von rekombinanten Mikroorganismen katalysiert werden, enorm zugenommen. Stehen für die Synthese von Steroiden mit speziellen Veränderungen am Steroidgerüst keine entsprechenden natürlichen Mikroorganismen zur Verfügung oder ist deren chemische Synthese zu aufwändig oder unmöglich, so können rekombinante Expressionssysteme zu einer wirtschaftlich sinnvollen Alternative werden.

Für die enzymatische Anwendung eignen sich dabei entweder (teilweise) isolierte Enzyme oder Ganzzell-Systeme. Mühsame Reinigungsschritte, mangelnde langfristige Stabilität der Aktivität und die Verwendung von teuren Kofaktoren wie NADPH (oder die nur kurzfristige Funktion von Kofaktor-regenerierenden Systemen) stellen die größten Probleme der *in vitro*-Anwendungen dar. Der klare Vorteil von Ganzzell-Biotransformationen ist dementsprechend die einfachere Handhabung, da sowohl die Enzymexpression als auch die Kofaktorregenerierung vom Organismus selbst übernommen werden. Daher sind in der Regel Ganzzell-Anwendungen in biotechnologischen Prozessen verbreiteter (Straathof, *et al.*, 2002). Die relevanten Expressionssysteme umfassen hauptsächlich aufgrund ihrer vergleichsweise einfachen und kostengünstigen Kultivierung und (zumindest prinzipiell) hoher Expressionslevel genetisch veränderte Bakterien und Hefen. Obwohl diese bereits heute äußerst beliebte

und vielversprechende Expressionssysteme für steroidverändernde Enzyme darstellen, können ihre Anwendungsmöglichkeiten durch Weiterentwicklung und fortschreitende Problembewältigung (z.B. bezüglich der Bildung von Nebenprodukten oder unbeständiger Ausbeuten) deutlich erweitert werden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die Möglichkeit der biotechnologischen Nutzung von heterolog in der Spaltheefe *S. pombe* exprimierten Steroid-Dehydrogenasen zur Steroidmodifizierung zu untersuchen. Als Modellenzym wurde die humane 20 α -HSD AKR1C1 ausgewählt. Dieses Enzym katalysiert in Säugetieren die regio- und stereoselektive Reduktion von Progesteron zu 20 α -DHP. Es sollte ein Spalthefebasiertes Ganzzell-Biotransformationsverfahren etabliert werden, das eine effiziente 20 α -HSD-Reaktion ermöglicht und im technischen Maßstab mit einer ökonomisch sinnvollen Raum-Zeit-Ausbeute anwendbar ist.

Bisher steht bei der Entwicklung neuer biotechnologischer Synthesewege für die Steroidproduktion hauptsächlich die Steroidmodifizierung durch CYPs im Mittelpunkt des Interesses. Es wurde bereits eine Reihe von Ganzzell-Biotransformationsreaktionen unter Verwendung von Spalthefestämmen beschrieben, die humane P450-abhängige Steroidhydroxylasen wie CYP11B1 (Bureik, *et al.*, 2004, Dragan, *et al.*, 2005), CYP11B2 (Bureik, *et al.*, 2002), CYP17 (Dragan, *et al.*, 2006) oder CYP21 (Dragan, *et al.*, 2006) rekombinant exprimieren. Obwohl auch AKRs eine sehr erfolgversprechende Enzymgruppe zur Ausführung spezifischer Steroidmodifizierung darstellen, werden diese gegenwärtig noch nicht im industriellen Maßstab biotechnologisch eingesetzt.

Der gegenwärtige Höhepunkt der Anwendung von rekombinanten Mikroorganismen in der biotechnologischen Steroidproduktion ist die totale Biosynthese von Steroiden aus einfachen Kohlenstoffquellen mit genetisch veränderten Hefen (Szczebara, *et al.*, 2003). Die Verwendung von Designer-Hefen zur chemiefreien Steroidproduktion entspricht nicht nur dem neusten Stand der Technik, sondern erfüllt auch die heutigen Anforderungen bezüglich Umweltfreundlichkeit, Ressourcenschonung und Nachhaltigkeit. Daher ist davon auszugehen, dass in den nächsten Jahren genetisch veränderte Mikroorganismen die langjährige Vorherrschaft natürlicher Mikroben in der Steroidindustrie beenden werden.

Obwohl der gegenwärtige Stand der Hefe-Expressionstechnologie weitreichende Möglichkeiten zur Produktion pharmakologischer Proteine und einer Vielzahl industriell relevanter Enzyme eröffnet und genetisch veränderte Hefen in zunehmendem Maße zur industriellen Produktion von Steroiden eingesetzt werden, ist die Verwendung von *S. pombe* zu diesem Zweck bisher nur sehr selten beschrieben. Für die Wahl, die Eignung dieser Hefe als Wirtsorganismus für die Expression rekombinanter AKRs und die sich daraus ergebenden biotechnologischen Anwendungsmöglichkeiten zu untersuchen, sprechen jedoch mehrere Faktoren. *S. pombe* ist ein bewährtes Modell zur Untersuchung der Genfunktion und -regulation höherer Eukaryoten und wird zunehmend zur Expression und funktionellen Charakterisierung von Säugerproteinen

verwendet (Takegawa, *et al.*, 2009). Aufgrund der jahrzehntelangen Grundlagenforschung stehen umfangreiche molekularbiologische und genetische Instrumente für diesen Organismus zur Verfügung (Moreno, *et al.*, 1991, Alfa, *et al.*, 1993). Das Genom von *S. pombe* ist komplett sequenziert (Wood, *et al.*, 2002) und DNA-Mikroarray-, Proteom- und Transkriptomanalysen wurden durchgeführt. Expressionsvektoren, mit denen hohe Expressionslevel erreicht werden, sind für die Spaltheefe entwickelt worden (Maudrell, 1993, Giga-Hama, *et al.*, 1994). Viele Fremdproteine, darunter auch industriell relevante Proteine und solche, die mit anderen Mikroorganismen nicht funktionell exprimiert werden können, wurden bereits erfolgreich exprimiert. Rekombinante Spaltheefe-Systeme eignen sich hervorragend zur Biotransformation von Steroiden (Bernhardt, 2006) und zur biotechnologischen Produktion von Wirkstoffmetaboliten (Peters, *et al.*, 2007, Peters, *et al.*, 2009, Peters, *et al.*, 2009). Die Möglichkeit der Anwendung als Ganzzell-Biotransformations-System stellt dabei einen entscheidenden Vorteil dar. Spezielle Hoch-Zelldichte-Fermentationsverfahren sind bereits etabliert (Jansen, *et al.*, 2006, Zhang, *et al.*, 2007). Darüberhinaus können rekombinante *S. pombe*-Zellen zur Inhibitor-Testung eingesetzt werden (Dragan, *et al.*, 2006). Zum Aufbau neuer biotechnologischer Prozesse ist *S. pombe* oftmals anderen industriell relevanten Hefen wie *S. cerevisiae* oder *Pichia pastoris* durch ihre weitreichende technologische Patentfreiheit überlegen. Damit stellt *S. pombe* eine wertvolle Alternative zu den gängigen rekombinanten Expressionssystemen dar, woraus sich ein großes Potential neuer biotechnologischer Anwendungen für diesen Mikroorganismus ergibt.

4.1 Funktionelle Expression von AKR1C1 in Spaltheffen

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die Expressionsplasmide pCAD1-AKR1C1 und pREP1-AKR1C1 kloniert, welche die codonoptimierte cDNA-Sequenz der humanen AKR1C1 enthalten (Abbildung 5, Abbildung 7). Durch Transformation des Spalthefestamms NCYC2036 mit pCAD1-AKR1C1 bzw. von NCYC1913 mit pREP1-AKR1C1 entstanden die AKR1C1-Expressionsstämme JMN7 und JMN8 (Abbildung 8). Diese neuen Stämme zeigten beide eine effektive Progesteron-Biotransformationsaktivität ohne eine detektierbare Bildung von Nebenprodukten, wobei der Stamm JMN8 unter gleichen Versuchsbedingungen das Produkt effizienter bildete als JMN7 (Abbildung 9). Eine schwache Umsatzaktivität, die wahrscheinlich auf der endogenen 20 α -HSD in *S. pombe* beruht (Pajic, *et al.*, 1999), wurde auch bei den Elternstämmen beobachtet. Die Identität des Produkts wurde durch NMR-Strukturanalyse eindeutig als 20 α -DHP bestätigt (Anhang B). Nachdem die funktionelle Expression der humanen AKR1C1 in den Spalthefestämmen JMN7 und JMN8 erstmals durch die erfolgreiche Ganzzell-Biotransformation von Progesteron zu 20 α -DHP nachgewiesen worden war, folgten zunächst Untersuchungen zu grundsätzlichen physikochemischen Eigenschaften des Systems.

Da in der vorliegenden Arbeit Steroide mit Hilfe eines Flüssig-flüssig-Extraktionsverfahrens aus Kulturmedien isoliert werden sollten, wurden verschiedene organische Lösemittel bezüglich ihrer Eignung für die Extraktion von Progesteron und 20α -DHP untersucht, um diesen Arbeitsschritt später möglichst effizient und ressourcenschonend zu gestalten. Chloroform, Cyclohexan, *tert*-Butylmethylether, Dichlormethan bzw. Ethylacetat wurden bezüglich extrahierbarer Produktmenge, Anteil des Produkts an der Gesamtstoffmenge im Extrakt und Verunreinigung des Produkts mit Fremdsubstanzen verglichen. Dabei zeigte sich, dass sich unabhängig vom Extraktionsmittel aus der gesamten Zellsuspension etwa 40 % mehr 20α -DHP extrahieren lässt als aus dem zellfreien Überstand (Abbildung 10 (a)). Dies deutet darauf hin, dass das Produkt in der Kultur nicht vollständig gelöst vorliegt, sondern Mikrokristalle vorhanden sind, die sich durch Zentrifugation sedimentieren lassen. Der Anteil des Produkts an der Gesamtsubstanzmenge (*Ratio*) betrug ca. 7 % in der Zellsuspension und etwa 45 % im Kulturüberstand (Abbildung 10 (b)). Dies zeigt einerseits, dass sich Produkt und Substrat mit jedem der getesteten Extraktionsmittel in gleichem Verhältnis zueinander extrahieren lassen und andererseits, dass sich erwartungsgemäß das Verhältnis von Produktmenge zu Substratmenge durch die Zentrifugation stark in Richtung des Produkts verlagert, da das hydroxylierte Produkt im wässrigen Kulturmedium besser löslich ist. Cyclohexan, *tert*-Butylmethylether und Ethylacetat eignen sich für die rein quantitative Extraktion von 20α -DHP aus der Biotransformationskultur am besten (Abbildung 10 (a)). Die Verwendung von Cyclohexan, Chloroform und Dichlormethan als Extraktionsmittel verhindert weitestgehend das Auftreten eines Matrixpeaks, der als Indikator für die Verunreinigung der Extrakte mit Fremdsubstanzen angesehen wird (Abbildung 10 (c)). Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass Cyclohexan das am besten geeignete Lösemittel für die Extraktion von möglichst reinem 20α -DHP ist. Für eine rein quantitative Extraktion sind *tert*-Butylmethylether und Ethylacetat grundsätzlich ebenso gut geeignet. Da aber die Lösemittelkosten ein weiterer wichtiger Faktor bei der Wahl eines Extraktionsmittels, besonders im Hinblick auf spätere Produktionsprozesse in größerem Maßstab, sind, ist *tert*-Butylmethylether aufgrund seines verhältnismäßig hohen Preises für Extraktionen mit großen Volumina nicht geeignet. Ethylacetat ist das aus ökonomischer Sicht sinnvollste Lösemittel für diese Extraktion. Cyclohexan ist wegen seines etwa vierfach höheren Preises besser in kleinen Volumina einzusetzen. Daher wurde in dieser Arbeit entweder Cyclohexan oder Ethylacetat als Extraktionsmittel verwendet.

Neben der Polarität des Lösemittels spielt auch das Volumenverhältnis von wässriger und organischer Phase eine wichtige Rolle bei der Flüssig-flüssig-Extraktion. Da der Diffusionswiderstand aufgrund einer geringeren Stoffkonzentration niedriger ist, wirkt sich ein großes Volumen an organischem Lösemittel positiv aus. Aus ökologischen und ökonomischen Gründen ist es jedoch wünschenswert, diese Volumina möglichst gering zu halten. Daher wurde das kleinstmögliche Volumenverhältnis zwischen dem am besten geeigneten Extraktionsmittel Cyclohexan und dem Kulturmedium bestimmt, bei

dem eine möglichst quantitative Extraktion erfolgen kann (Abbildung 10 (d)). Es zeigte sich, dass selbst bei einem Cyclohexan:Zellsuspension-Verhältnis von 1:10 noch gleichgroße Substanzmengen extrahiert werden können wie mit größeren Verhältnissen, was eine große Lösemittelsparung in großtechnischen Produktionsprozessen ermöglicht.

Die Steroid-Biotransformationsaktivität eines Systems ist unter anderem wesentlich von der Substratkonzentration und damit von der maximalen Substratlöslichkeit im Reaktionsmedium abhängig. Generell weisen Steroide, die wenige polare Gruppen besitzen, nur sehr geringe Löslichkeit in wässrigen Lösungen auf. Daher wurde die maximale Löslichkeit von Progesteron und 20α -DHP in EMM bestimmt. Beide Stoffe zeigten eine maximale Löslichkeit in EMM von unter $100\ \mu\text{M}$ (Abbildung 11). Der Extraktionsverlust belief sich dabei auf ca. 25 % für Progesteron und 15 % für 20α -DHP. So konnte die Substratlöslichkeit auch in Biotransformationen im Rahmen dieser Arbeit einen limitierenden Faktor darstellen und das Erreichen einer maximalen Umsatzgeschwindigkeit in Biotransformationen mit höherer Substratkonzentration ist daher möglicherweise eher auf die erreichte maximale Substratlöslichkeit als auf das Erreichen der höchstmöglichen Umsatzkapazität der Zellen zurückzuführen.

Nachdem einige grundlegende physikochemische Eigenschaften des Systems betrachtet worden waren folgte die Charakterisierung des Biotransformations- und Wachstumsverhaltens der Expressionsstämme. Aus einer Reihe verschiedener Klone der Stämme JMN7 und JMN8 wurde nach der Transformation der jeweils aktivste Klon selektiert und von diesem Zeitpunkt an ausschließlich weiter verwendet. Dabei wurden auch die beiden Stämme untereinander bezüglich ihrer Progesteron-Umsatzaktivität verglichen. JMN8-Zellen bildeten unter gleichen Versuchsbedingungen 20α -DHP stets effizienter als Zellen von JMN7 (Abbildung 12). Der aktivste Klon von JMN8 wies mit einer spezifischen Progesteron-Biotransformationsaktivität von $98\ \mu\text{mol/g}$ mehr als die doppelte Aktivität des aktivsten JMN7-Klons mit $41\ \mu\text{mol/g}$ auf. Dies bestätigte die bereits in den ersten Umsatzversuchen erlangten Hinweise. Möglicherweise ist dieses Verhalten auf einen Gendosiseffekt zurückzuführen. Bei pCAD1-AKR1C1 handelt es sich um ein Integrationsplasmid. Daher liegt pro JMN7-Zelle genau eine Kopie des AKR1C1-Gens integriert ins Genom vor, die exprimiert wird. Das Expressionsplasmid pREP1-AKR1C1 hingegen repliziert autosomal. Im Falle von JMN8 könnten daher mehrere Plasmide und damit Kopien des AKR1C1-Gens in einer Zelle vorkommen, wodurch womöglich eine höhere Expressionsrate erreicht werden könnte. Aufgrund seiner deutlich höheren Progesteron-Biotransformationsaktivität wurde zunächst nur der Stamm JMN8 weiter betrachtet.

In Wachstumskinetiken wurde das Wachstumsverhalten von JMN8 im Vergleich zum Elternstamm NCYC1913 untersucht. Dabei zeigte sich, dass obwohl der Phänotyp des AKR1C1-exprimierenden Stamms JMN8 vergleichbar mit dem des Elternstamms ist (nicht gezeigt), JMN8-Zellen überraschenderweise mit einer etwa dreifach höheren

spezifischen Wachstumsrate μ ($0,2 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$ für JMN8; $0,07 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ für NCYC1913) zu deutlich schnellerem Wachstum fähig sind als NCYC1913-Zellen (Abbildung 13).

Um zweifellos zu beweisen, dass das AKR1C1-Gen im Stamm JMN8 unter der Kontrolle des durch Thiamin reprimierbaren Promotors *nmt1* steht, wurde sein Biotransformationsverhalten in An- und Abwesenheit von Thiamin im Kulturmedium betrachtet. Wie erwartet konnte dabei gezeigt werden, dass die starke Aktivität des rekombinanten AKR1C1-Enzyms in JMN8 erst durch die Abwesenheit von Thiamin zum Kulturmedium induziert wird und die AKR1C1-Aktivität durch Thiamin bis auf die sehr schwache Basisaktivität der *S. pombe*-eigenen 20α -HSD reprimiert wird (Abbildung 14). Damit war eindeutig gezeigt, dass die im Vergleich zum Elternstamm NCYC1913 stark erhöhte Progesteron-Biotransformationsaktivität von JMN8 nicht auf andere Unterschiede zwischen den beiden Stämmen als das Vorhandensein des korrekten pREP1-AKR1C1-Expressionskonstrukts zurückzuführen ist.

Im Laufe der Prozessoptimierung wurden Biotransformationen mit variablen Biomassekonzentrationen durchgeführt, um den Einfluss der Zelldichte auf die Metabolitenbildung zu untersuchen. Dabei wurden Anfangszelldichten zwischen 5×10^6 und 1×10^9 Zellen/ml gewählt, also in einem Bereich, der auch für Biotransformationsexperimente in Schüttelkolben, MTPs oder Bioreaktoren typisch ist. Grundsätzlich war anzunehmen, dass sich eine gesteigerte Anzahl von Biokatalysatoren positiv auf die Umsatzrate auswirken würde. Wie erwartet wurde eine annähernd lineare Beziehung zwischen Zelldichte und 20α -DHP-Bildung festgestellt (Abbildung 15). Allerdings korrelieren diese beiden Parameter nicht ganz im Verhältnis 1:1, was möglicherweise auf ein stärkeres Zellwachstum während des Experiments in den Ansätzen mit niedrigerer Anfangszelldichte zurückzuführen ist. Da es keinen Hinweis auf einen negativen Einfluss hoher Zelldichten auf die Produktbildung gab wurden alle weiteren Biotransformationen mit einer möglichst hohen Zelldichte durchgeführt, um eine größtmögliche Umsatzaktivität zu erzielen.

Es wurde weiterhin untersucht, ob eine Erhöhung der Inkubationstemperatur von $30 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ zu einer gesteigerten AKR1C1-Aktivität in JMN8 führt. Dieses Verhalten konnte bereits bei einigen CYP-Enzymen im Spalthefe-Expressionssystem beobachtet werden (Drăgan *et al.*, unveröffentlicht). Der Temperaturparameter hat aber nur sehr geringen Einfluss auf die Umsatzaktivität von JMN8 (Abbildung 16). Eine erhöhte Inkubationstemperatur schien bei längerer Inkubationsdauer einen leicht negativen Effekt zu haben. Eine solche Temperaturerhöhung bedeutet für die Zellen einen enormen Stress. Nach einer Temperaturerhöhung von $30 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $39 \text{ }^\circ\text{C}$ werden in *S. pombe* mehr als 550 Gene, deren entsprechende Proteine unter anderem am Kohlenhydratstoffwechsel, an der Transkriptionsregulation oder an der Proteinfaltung beteiligt sind, mindestens doppelt so stark induziert; ungefähr 40 davon sind spezifisch für Hitzestress (Chen, *et al.*, 2003). Da die Temperaturerhöhung einen so starken Einfluss auf den gesamten Zellmetabolismus hat ist es naheliegend, dass sich dieser Stress auch

negativ auf die Umsatzaktivität eines rekombinant exprimierten Proteins auswirken kann. Alle folgenden Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden daher bei 30 °C durchgeführt.

Steroide gelangen hauptsächlich über Diffusion durch die Zellmembran in die Zellen (Mendel, 1989). Die Diffusionsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von den Eigenschaften der Zellmembran sowie der Steroidkonzentration, und damit verbunden der maximalen Substratlöslichkeit, im Reaktionsmedium. Der Substrattransport in die Zelle kann dementsprechend prinzipiell durch eine Erhöhung der Substratkonzentration im Medium verstärkt werden. Daher wurde die Abhängigkeit der Biotransformationsaktivität von der Substratkonzentration untersucht. Ein Kurzzeitexperiment mit vergleichsweise niedrigen Progesteronkonzentrationen bis 500 µM lieferte eine maximale Umsatzrate von etwa 37 µM/h, die bereits mit Substratkonzentrationen im Bereich von 250 µM erreicht wurde (Abbildung 17). Dennoch erwies sich dieses Experiment zeitlich als zu kurz und der untersuchte Substratkonzentrationsbereich als zu klein, um definitive Aussagen über die Charakteristika in Langzeitexperimenten mit hohen Substratkonzentrationen, wie sie für erfolgreiche Produktionsprozesse benötigt werden, treffen zu können. Daher wurde untersucht, ob eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration möglicherweise einen negativen Effekt auf die Produktbildung zur Folge haben könnte. In einem 24 h-Experiment mit Progesteronkonzentrationen von 0,1 bis 1,5 mM hatte die weitere Erhöhung der Substratkonzentration keinen Effekt auf die Produktbildungsrate (Abbildung 18). Es konnte weder eine Steigerung noch ein Abfall der Biotransformationsaktivität festgestellt werden, was möglicherweise durch das Erreichen der maximal löslichen Substratkonzentration zu erklären ist. Bemerkenswert ist, dass die Metabolitenbildungsrate immer nach wenigen Stunden abnahm.

Die Glucoseverfügbarkeit stellt häufig eine Limitierung in Ganzzell-Biotransformationsprozessen dar. Um herauszufinden, ob dies auch auf die AKR1C1-abhängige Biotransformation zutrifft, wurde die Aktivität von JMN8 unter dem Einfluss verschiedener Glucosekonzentrationen im Inkubationsmedium untersucht. Wie zu erwarten war nimmt die Glucosekonzentration in JMN8-Biotransformationskulturen mit der Zeit rasch ab (Abbildung 19). Die Biotransformationsaktivität ist stark auf die Anwesenheit von Glucose im Medium angewiesen. Die Produktbildung kommt sofort zum Erliegen sobald die Glucose verbraucht ist. Die anfänglichen Produktionsraten unterscheiden sich allerdings nicht, was darauf hindeutet, dass höhere Glucosekonzentrationen keine erhöhten Biotransformationsaktivitäten bewirken. Es ist anzunehmen, dass die AKR1C1-Aktivität ohne Glucoseverfügbarkeit verschwindet, da in diesem Fall die Kofaktor-Regenerierung durch den Hefemetabolismus nicht ausreichend ist. Diese Annahme wird durch theoretische Überlegungen unterstützt: Für eine AKR-abhängige Reduktion werden grundsätzlich Elektronen benötigt. Es ist bekannt, dass die AKR1C1 sowohl von NADH als auch von NADPH reduziert werden kann (Penning, *et al.*, 2000). Im Stoffwechsel der Zellen wird das NADH/NAD⁺-Verhältnis im Wesentlichen durch die Glykolyse und den Citratzyklus erhöht. Beide Stoffwechselwege sind nur dann

aktiv, wenn Glucose vorhanden ist. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Aktivität des NADPH-bildenden Pentose-Phosphat-Wegs in *S. pombe* sehr schwach ist (Dragan, *et al.*, 2006). Dementsprechend zeigte eine aktuelle Untersuchung, dass die NADH-Konzentration im Cytosol der Spalthefe in etwa zehnfach höher ist als die von NADPH (Zehentgruber, *et al.*, Manuskript eingereicht). Betrachtet man all diese Gegebenheiten, so ist die Annahme begründet, dass NADH den wesentlichen Kofaktor für die AKR1C1-abhängige Biotransformation in *S. pombe* darstellt.

HSDs wie die AKR1C1 wirken generell als molekulare Schalter, welche die Rezeptorbelegung und -aktivierung regulieren, indem sie die Umwandlung wirksamer Steroidhormone zu den jeweiligen inaktiven Gegenstücken und auch umgekehrt katalysieren; dies macht sie zu wichtigen Medikationszielen (Penning, 1997, Penning, 2003, Penning, *et al.*, 2004). Progesteron ist für die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft unerlässlich. Daher ist eine erhöhte AKR1C1-Aktivität und der dadurch verstärkte Umsatz von Progesteron zum inaktiven Metaboliten, 20 α -DHP, verbunden mit Frühgeburten, die Säuglingsmorbidity und erhöhte -sterblichkeit zur Folge haben (Lewis, *et al.*, 2004, Piekorz, *et al.*, 2005). Außerdem führt eine erhöhte Aktivität von AKR1C1 im Endometrium und in Brustgeweben zur Bildung von tumorfördernden Metaboliten und zur Entwicklung von Endometriose, Endometrialkrebs und Brustkrebs (Wiebe, 2005, Wiebe, *et al.*, 2005, Rizner, *et al.*, 2006). Die AKR1C1 spielt auch eine wichtige Rolle bei der Gehirnfunktion, wo sie die Belegung der γ -Aminobuttersäure-Typ A (GABA_A) Rezeptoren durch ihre 3 α - und 20 α -HSD-Aktivität moduliert (Lambert, *et al.*, 1995). Die AKR1C1 steht dadurch im Zusammenhang mit neurologischen und psychischen Zuständen wie katamenialen Epilepsien oder Depressionen (Lambert, *et al.*, 1995, Griffin, *et al.*, 2001, Nobel, *et al.*, 2001). Die AKR1C1 reduziert darüberhinaus neuroaktive Steroide (3 α ,5 α -Tetrahydroprogesteron und 5 α -Tetrahydrodeoxycorticosteron) sowie deren Vorläufer (5 α -Dihydroprogesteron und Progesteron) zu den jeweiligen inaktiven 20 α -Hydroxysteroiden (Nobel, *et al.*, 2001). Die Eliminierung dieser neuroaktiven Steroide durch die AKR1C1 ist verbunden mit Symptomen des prämenstruellen Syndroms (PMS) und anderen neurologischen Funktionsstörungen (Griffin, *et al.*, 2001). Daher ist es von enormem Interesse, selektive und wirkungsvolle Inhibitoren der AKR1C1 zu identifizieren, die dazu beitragen könnten, einem überhöhten Progesteronmetabolismus vorzubeugen und entgegenzuwirken. Dementsprechend werden Anstrengungen unternommen, selektive und potente Inhibitoren der AKR1C1 zu identifizieren. Usami *et al.* fanden heraus, dass Benzodiazepine, insbesondere Diazepam und Medazepam, wirkungsvolle Inhibitoren der AKR1C1 sind. Unter Verwendung dieser Inhibitoren wurden bei der Oxidation von 1 mM S-Tetralol IC₅₀-Werte im niedrigen mikromolaren Bereich festgestellt (Usami, *et al.*, 2002). Später identifizierte die gleiche Gruppe Benzbromaron und 3',3'',5',5''-Tetrabromophenolphthalein als selektive und stärkere Inhibitoren mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich (Higaki, *et al.*, 2003). Danach entdeckten Bauman *et al.* eine Gruppe von nichtsteroidalen antiinflammatorischen

Wirkstoffanalogons als Inhibitoren der AKR1C1; der stärkste Inhibitor der Oxidation von 100 μM 1-Acenaphthenol war 5-Methyl-*N*-phenylantranilsäure mit einem IC_{50} von 3.2 μM und K_i von 0.88 μM (Bauman, *et al.*, 2005). Brožič *et al.* untersuchten die inhibitorische Wirkung von Phytoöstrogenen auf den AKR1C1-abhängigen Umsatz von Progesteron und identifizierten dabei 7-Hydroxyflavon mit einem IC_{50} -Wert im niedrigen mikromolaren Bereich als den stärksten Inhibitor (Brozic, *et al.*, 2006). Dhagat *et al.* identifizierten bei der Oxidation von 1 mM S-Tetralol 3,5-Diiodosalicylsäure als potenten Inhibitor der AKR1C1 mit einem IC_{50} -Wert ebenfalls im nanomolaren Bereich (99 ± 6 nM). Untersuchungen mit 5β -pregnan-3 α ,20 α -diol als Substrat lieferten einen K_i -Wert von 9 ± 1.2 nM. Dieser K_i -Wert ist vergleichbar mit denen von Benzbromaron und 3',3'',5',5''-Tetrabromophenolphthalein, die bis zu diesem Zeitpunkt die stärksten bekannten Inhibitoren der AKR1C1 darstellten. Aber auch Salicylsäure und Acetylsalicylsäure sind wirkungsvolle AKR1C1-Inhibitoren mit IC_{50} -Werten von $7,8 \pm 0,3$ bzw. 21 ± 2 μM (Dhagat, *et al.*, 2007).

Für die Bewertung der Enzyminhibierung durch verschiedenste neue potenzielle Inhibitorsubstanzen werden Testsysteme benötigt, die einfach und ohne allzu großen Zeitaufwand anzuwenden sind und darüberhinaus die Testung einer großen Vielfalt an Substanzen zulassen. Tests mit aufgereinigten rekombinanten humanen Enzymen sind oftmals sehr aufwändig in der Durchführung sowie zeit- und kostenintensiv. Im Bereich der P450-Inhibierung wurde bereits mehrfach gezeigt, dass Testsysteme, die auf *S. pombe*-Zellen basieren, welche humane Enzyme exprimieren, eine passende Alternative darstellen können (Ehmer, *et al.*, 2002, Bureik, *et al.*, 2004, Ulmschneider, *et al.*, 2005, Dragan, *et al.*, 2006). Es lag also nahe, zu untersuchen, ob sich AKR1C1-exprimierende *S. pombe*-Zellen möglicherweise auch als Testsystem für die Suche nach neuen AKR1C1-Inhibitoren eignen. Dazu wurden vier verschiedene literaturbekannte AKR1C1-Inhibitoren bezüglich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die JMN8-Biotransformationsaktivität untersucht: 7-Hydroxyflavon, Acetylsalicylsäure, Salicylsäure und 3,5-Diiodosalicylsäure. Bei der Auswahl der Inhibitoren wurde einerseits darauf geachtet, dass die bekannten IC_{50} -Werte möglichst niedrig und andererseits die jeweiligen Substanzen kommerziell leicht erhältlich sind. Die inhibitorischen Effekte dieser Substanzen wurden bei der Reduktion des physiologischen Substrats Progesteron untersucht. Dabei wurden die Testbedingungen so nahe wie möglich an den Bedingungen der Tests mit isoliertem Enzym orientiert. In Vorversuchen wurde herausgefunden, dass bei Verwendung von 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit 50 g/l Glucose bei dem physiologischen pH-Wert von 7,4 als Inkubationsmedium anstelle von EMM, welches bei den meisten anderen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten MTP-Experimenten Verwendung fand, Progesteron-Umsatzraten erreicht werden, die für die Entwicklung eines Inhibitionsassays geeignet sind (Daten nicht gezeigt). Unter den gegebenen Testbedingungen und bei Inhibitorkonzentrationen zwischen 25 μM und 1 mM bewirkte jedoch keine der vier getesteten Substanzen eine nennenswerte Inhibierung der AKR1C1-abhängigen Biotransformation von Progesteron mit JMN8

(Abbildung 20). Lediglich die Zugabe vergleichsweise hoher Konzentrationen von 3,5-Diiodosalicylsäure (über 500 μM) führte zu einem sehr schwachen inhibitorischen Effekt. Da in geeigneten Inhibitor-testsystemen möglichst nah an den physiologischen Bedingungen gearbeitet werden muss und daher eine möglichst starke inhibitorische Wirkung bereits bei sehr geringen mikromolaren, besser nanomolaren, Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors auftreten sollte, sind Testsysteme, bei denen solch hohe Inhibitor-konzentrationen nötig sind um eine Wirkung zu erreichen, eher uninteressant. Die aus der Literatur bekannten Daten zur Wirkung von AKR1C1-Inhibitoren auf die humane AKR1C1 beruhen auf *in-vitro*-Assays mit aufgereinigtem, rekombinantem Enzym. Im Gegensatz dazu wurde hier die Wirkung auf ein Ganzzell-System untersucht. Daher ist es nur bedingt möglich, Vergleiche anzustellen. Drăgan *et al.* zeigten kürzlich, dass bei P450-abhängigen Biotransformationen der pH-Wert als bedeutender Parameter die Biotransformationsaktivität von rekombinanten *S. pombe*-Zellen beeinflussen kann (Manuskript in Vorbereitung). Unter Umständen gelangen die untersuchten Inhibitorsubstanzen, die bei dem am Blutplasma orientierten pH-Wert von 7,4 im Medium überwiegend als geladene Moleküle vorliegen (Salicylsäure, Acetylsalicylsäure und 3,5-Diiodosalicylsäure), unter den hier verwendeten Bedingungen kaum oder gar nicht durch die unpolare Zellmembran in die Zelle und damit zu ihrem eigentlichen Wirkort. Möglicherweise wäre durch eine Variation des Medium-pH-Werts eine bessere Zellwand- und Membrangängigkeit dieser Inhibitoren zu erreichen und damit ein inhibitorischer Effekt messbar. 7-Hydroxyflavon hingegen ist unpolar und kann daher vermutlich die Zellwand und -membran einfacher durchdringen. Allerdings ist es mit einem log *P*-Wert von 3,6 (Cheng, *et al.*, 2007) in wässrigem Medium nur schwach löslich. Es ist daher anzunehmen, dass ein großer Teil dieser Inhibitorsubstanz im Testansatz ausgefallen ist und insbesondere die Inhibitor-konzentration von 1 mM nur als „nominell“ zu bezeichnen ist. Höchstwahrscheinlich ist die tatsächlich gelöste Konzentration deutlich geringer und damit womöglich zu gering um in diesem Testsystem eine inhibitorische Wirkung zu erzielen. Unter den hier getesteten Bedingungen und mit den untersuchten Inhibitoren eignet sich JMN8 also nicht ohne Weiteres für den Aufbau eines Inhibitor-testsystems. Da die Testung von AKR1C1-Inhibitoren nicht der eigentliche Gegenstand dieser Arbeit war wurde an dieser Stelle auf die weitere Entwicklung eines JMN8-basierten Testsystems verzichtet.

Nachdem gezeigt worden war, dass die AKR1C1-Expressionsstämme JMN7 und JMN8 in der Lage sind, die 20-Ketogruppe des natürlichen AKR1C1-Substrats Progesteron zu reduzieren, wurde im weiteren Verlauf untersucht, ob diese Stämme ebenfalls in der Lage sind, das aus kommerzieller Sicht als Substrat interessante synthetische Progestogen Dydrogesteron in gleicher Weise zu transformieren. Erste Biotransformationsversuche zeigten einen zeitabhängigen Dydrogesteronumsatz mit beiden AKR1C1-exprimierenden Stämmen (Abbildung 21). Auch hier war die Produktbildungsrate von JMN8 deutlich höher als die von JMN7. Die Identität des gebildeten

Produkts konnte durch NMR-Strukturanalysen eindeutig als 20α -DHD bestätigt werden (Anhang B). Aufgrund seiner höheren Biotransformationsaktivität wurde daraufhin auch für die weiteren Dydrogesteron-Umsätze der Stamm JMN8 verwendet.

Im Folgenden wurde dann das Substratspektrum des Systems näher untersucht. Dazu wurde die Biotransformationsaktivität von JMN8 bezüglich sieben weiterer strukturverwandter Steroide, die ebenfalls eine 20-Ketogruppe enthalten (Pregnenolon, 17α -Hydroxyprogesteron, 11-Deoxycortisol, Cortisol, 11-Deoxycorticosteron, Corticosteron, und Aldosteron), im Vergleich zu Progesteron und Dydrogesteron betrachtet. Interessanterweise katalysierte JMN8 unter den getesteten Bedingungen lediglich die Reduktion von Progesteron und Dydrogesteron zu den jeweiligen 20α -Hydroxyprodukten effektiv, während alle anderen Substanzen unverändert blieben (Abbildung 24). Im Dydrogesteronmolekül befinden sich das Wasserstoffatom am C-9 in der β -Position und die Methylgruppe am C-10 in der α -Position, eine Umkehrung der Progesteron-Struktur. Darüberhinaus enthält Dydrogesteron eine zweite Doppelbindung zwischen C-6 und C-7 (die 4,6-dien-3-on-Konfiguration). Es ist bemerkenswert, dass Dydrogesteron trotz dieser bedeutenden Veränderungen im Steroidrückgrat ein AKR1C1-Substrat darstellt, während dies bei anderen Steroiden mit einem Progesteron-Rückgrat und zusätzlichen Hydroxygruppen nicht der Fall ist. Das synthetische Dydrogesteron ist mit einer Ganzzell-Biotransformationsrate von $244 (\pm 93) \mu\text{M/d}$ sogar ein noch besseres Substrat für das in JMN8 rekombinant exprimierte AKR1C1-Enzym als das physiologische Progesteron mit einer 20α -DHP-Bildungsrate von $90 (\pm 26) \mu\text{M/d}$. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die humane AKR1C1 unter Steroiden ein sehr enges Substratspektrum bzw. große Substratspezifität aufweist, was ihre biotechnologischen Anwendungsmöglichkeiten in diesem Bereich natürlich einschränkt. Diese hohe Steroid-Substratspezifität war insbesondere nicht zu erwarten, da für die AKR1C1 auch verschiedene Substrate, deren Struktur stark von der Steroidstruktur abweicht (wie z.B. S-Tetralol und 1-Acenaphthenol), bekannt sind. Es ist also durchaus denkbar, dass es noch weitere Substanzen gibt, die Substrate für die AKR1C1 darstellen und bisher noch nicht als solche identifiziert wurden. Obwohl es sich bei der AKR1C1 in erster Linie um eine 20α -HSD handelt wurde für dieses Enzym auch eine schwache 3α -HSD-Aktivität beschrieben (Deyashiki, *et al.*, 1994). In der vorliegenden Untersuchung konnte jedoch kein Beweis für eine solche Aktivität erlangt werden. Auch die Bildung anderer Nebenprodukte wurde nicht festgestellt. Die in *S. pombe* rekombinant exprimierte AKR1C1 arbeitet also sehr regio- und stereoselektiv und ermöglicht die Produktion von 20α -DHP oder 20α -DHD in völliger Enantiomerenreinheit. Beim Versuch 20α -DHD durch einen herkömmlichen chemischen Produktionsprozess herzustellen, wird im Gegensatz zum biotechnologischen Ansatz aus Dydrogesteron prädominant 20β -DHD gebildet und die Bildung des 20α -Enantiomers liegt unterhalb der Nachweisgrenze (Dr. Josef Messinger, persönliche Mitteilung). Dies ist wiederum ein typischer Vorteil der Biotechnologie gegenüber der Chemie, der für die biotechnologische Verwendung der AKR1C1 spricht.

4.2 Prozessentwicklung mit dem Stamm JMN8

Da sich gezeigt hat, dass Dydrogesteron mit höherer Aktivität umgesetzt wird als Progesteron, sowie aufgrund des höheren kommerziellen Interesses am Produkt, wurde zunächst die Produktion von 20 α -DHD mit JMN8 optimiert, bevor 20 α -DHP produziert wurde. In Wachstumskinetiken (Abbildung 25) zeigte sich, dass Dydrogesteron auf das Wachstum von JMN8 einen deutlich negativen Einfluss hat ($\mu = 0,1 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$ statt $0,2 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$ ohne Substrat), während es sich kaum auf das Wachstum des Elternstamms auswirkt ($\mu = 0,1 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$ statt $0,07 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$). Offenbar ist die unterschiedliche Reaktion der Stämme auf die Aktivität der AKR1C1 zurückzuführen. Bei der AKR1C1-abhängigen Reduktion von Dydrogesteron verbrauchen die *S. pombe*-Zellen NAD(P)H als Kofaktor. Bereits bei den Untersuchungen zur Relevanz der Glucoseverfügbarkeit gab es Hinweise darauf, dass die Kofaktor-Regenerierung durch den Hefemetabolismus unter bestimmten Umständen nicht ausreichend ist. Eine denkbare Erklärung für die verminderte Wachstumsrate des AKR1C1-Expressionstamms, nicht jedoch des Elternstamms, unter Substrateinfluss wäre also, dass diese Zellen Energie in Form von NAD(P)H in die Biotransformation investieren, die dann nur noch vermindert für das Zellwachstum zur Verfügung steht.

In Analogie zu den Biotransformationen mit Progesteron wurde auch die Abhängigkeit der Biotransformationsaktivität von der Dydrogesteronkonzentration untersucht. Es zeigte sich, dass der Umsatz von Dydrogesteron mit JMN8 mit dem Progesteronumsatz vergleichbare Charakteristika aufweist (Abbildung 26). Die maximale Umsatzrate für Dydrogesteron wird ebenfalls bereits bei Substratkonzentrationen zwischen 100 und 500 μM erreicht, ist aber mit etwa 300 $\mu\text{M/d}$ höher als für Progesteron (max. 140 $\mu\text{M/d}$). Damit zeigt sich erneut, dass Dydrogesteron schneller und effektiver von JMN8 umgesetzt werden kann. Auch in diesem Experiment nahm die Metabolitenbildungsrate nach drei bis vier Stunden ab, bis es letztlich zu keiner weiteren Produktbildung mehr kam. Diese beiden Phasen können wie folgt interpretiert werden: Während der frühen Phase der Inkubation (Phase 1) tritt das Substrat, angetrieben vom Gradienten zwischen extra- und intrazellulärer Substratkonzentration, durch Diffusion sehr schnell in die Zellen ein. Die konstanten Umsatzraten in dieser Phase könnten durch ein Gleichgewicht zwischen der Menge an Substrat, die durch Diffusion in die Zelle gelangt und der umgesetzten Substratmenge erklärt werden. Alternativ wären auch konstante Raten zu erwarten, wenn die intrazelluläre Substratkonzentration ausreichend hoch geworden ist um das Enzym abzusättigen. Der Abfall der Umsatzraten in Phase 2 ist schwieriger zu erklären. Nachlassende katalytische Aktivitäten der Zellen in der Langzeitinkubation könnten diesen Sachverhalt begründen. Eine weitere mögliche Erklärung wären abnehmende, in die Zellen diffundierende Substratmengen aufgrund von abnehmenden extrazellulären Substratkonzentrationen. Allerdings scheint dies recht unwahrscheinlich, da die Substratkonzentrationen in dieser Phase immer noch sehr hoch waren. Ein anderer Grund für nachlassende Biotransformationsraten könnte die

fortgeschrittene Glucoseverarmung im Reaktionsmedium darstellen. Die wichtige Rolle der Glucoseverfügbarkeit bei der AKR1C1-abhängigen Biotransformation in *S. pombe* wurde bereits diskutiert. Letztlich könnten abfallende Umsatzraten auch durch eine Produktinhibierung erklärt werden. Hinweise darauf, dass die in *S. pombe* exprimierte AKR1C1 durch 20 α -DHD inhibiert wird, wurden im späteren Verlauf dieser Arbeit erlangt. Aus den gewonnenen Daten kann nicht eindeutig geschlossen werden ob und in wie fern ein einzelner oder eine Kombination mehrerer dieser Faktoren diesen Sachverhalt begründen. Wahrscheinlich ist im Wesentlichen die fortgeschrittene Glucoseverarmung im Reaktionsmedium für die Abnahme der Biotransformationsrate verantwortlich. Die enorme Bedeutung von Glucose für dieses Biotransformationssystem konnte bereits dargestellt werden. Außerdem wurde in weiteren Untersuchungen unter kontrollierten Fermentationsbedingungen anstelle von *batch*-Ansätzen ein fast vollständiger Substratumsatz erreicht. Dabei war selbst längere Zeit nach Vollumsatz keine Rückreaktion feststellbar. Dies ist eher überraschend, wenn man bedenkt, dass der AKR1C1-abhängige Steroidumsatz prinzipiell eine Gleichgewichtsreaktion darstellt. Theoretisch wäre denkbar, dass die NAD(P)H-Regeneration über die Rückreaktion erfolgen könnte. Hier konnte allerdings kein Hinweis auf einen solchen Effekt gefunden werden, was aus verfahrenstechnischer Sicht sehr vorteilhaft für die AKR1C1-abhängige Biotransformation mit *S. pombe* ist.

Aufbauend auf der Bewertung diverser, die AKR1C1-Reaktion beeinflussender Parameter wurde JMN8 für die Produktion von 20 α -DHD und 20 α -DHP im Laborfermenter-Maßstab eingesetzt. Ziel der ersten Biotransformationsexperimente im Bioreaktor war in erster Linie, die Reaktionsprodukte in ausreichenden Mengen für eine anschließende Strukturanalyse zu gewinnen. Darüberhinaus konnten wichtige Hinweise für den weiteren Aufbau eines effektiven Produktionssystems im größeren Maßstab erlangt werden. Bei den ersten Biotransformationen im Bioreaktor diente noch gewöhnliches EMM als Kulturmedium, eine Verbesserung der Medienzusammensetzung erfolgte erst später im Laufe dieser Arbeit. Das *feeding* der Kulturen erfolgte anfänglich durch manuelle punktuelle Zugabe einer konzentrierten Glucoselösung. Im Laufe der Prozessoptimierung wurden spätere Fermentationen automatisch und kontinuierlich mit einem reichhaltigeren *feed*-Medium (FM1) versorgt. Um ein zufriedenstellendes Gleichgewicht zwischen hohem Umsatz und ausreichenden Produktmengen zu erreichen, wurden vergleichbar hohe Substratkonzentrationen (0,5 bis 2 mM) eingesetzt. Damit war die initiale Substratkonzentration bei weitem höher als die Löslichkeit. Dies gewährleistete, unter Bedingungen zu arbeiten, die für die Biotransformation mit maximaler Umsatzrate benötigt werden. Zudem zeigten vorangegangene Experimente, dass Substratkonzentrationen in diesem Bereich den Umsatz nicht negativ beeinflussen.

Die erste Biotransformation von Dydrogesteron erfolgte mit Prozessführung A im 2 l-Fermenter. Dabei wurde eine ca. 24-stündige Biomasseanzuchtsphase im reinen *batch*-Verfahren durchgeführt, bevor das Substrat zugegeben wurde. In allen nachfolgenden Fermentationen im Labormaßstab wurde auf diesen Schritt verzichtet, da sich

herausstellte, dass eine Biomasseanzucht ohne Substrateinfluss keine Vorteile gegenüber der Biomasseanzucht mit Substratzugabe bei Fermentationstart hat. Bei diesem Dihydrogesteronumsatz mit JMN8 im Bioreaktor wurde über die Gesamtbiotransformationszeit von 75 h eine durchschnittliche 20α -DHD-Produktionsrate von ca. $97 \mu\text{M/d}$ ($31 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) erreicht (Abbildung 27). Die 20α -DHD-Bildungsraten, die zuvor bei Biotransformationen in MTPs oder Schüttelkolben maximal erreicht worden waren (244 bzw. $300 \mu\text{M/d}$), waren also im Fermenter-Maßstab unter diesen Bedingungen nicht reproduzierbar. Die Übertragung der Biotransformation vom Schüttelkolben- auf den Fermentermaßstab bedeutet stark veränderte Prozessbedingungen. Die enorme Veränderung vieler physikalischer Parameter bei der Maßstabsveränderung macht meist eine separate Prozessentwicklung und -optimierung für jeden Maßstab notwendig (Schmidt, 2005). Es ist zu bedenken, dass es sich bei dieser Biotransformation im Bioreaktor um ein erstes Experiment zur Orientierung handelte und keinerlei Erfahrung mit diesem System in diesem Maßstab vorhanden war. Im Gegensatz dazu wurde in Schüttelkolben zuvor bereits eine Reihe von Versuchen unter verschiedenen Bedingungen mit JMN8 durchgeführt, so dass die dafür geeigneten Parameter bekannt waren. Vielmehr konnte diese erste Fermentation dazu dienen, Kenntnisse über mögliche Ansatzpunkte für Verbesserungen zu erlangen. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass die angegebenen Umsatzraten in MTPs und Schüttelkolben lediglich in einem Zeitraum von 24 Stunden gemessen wurden, während der Transformationszeitraum im Bioreaktor mehr als drei Tage umfasste. Es wurden in der vorliegenden Arbeit bereits in einigen Experimenten Hinweise darauf erlangt, dass die Umsatzgeschwindigkeit von Ganzzell-Biotransformationsreaktionen oftmals aus verschiedenen Gründen bereits nach wenigen Stunden deutlich nachlässt.

Nach der Biotransformation wurde das Produkt erfolgreich aus der Fermentationskultur isoliert. Die Gesamtausbeute von ca. 5 mg ($16 \mu\text{mol}$) Produkt entspricht etwa 16 % der theoretischen Maximalausbeute von 20α -DHD. Dieser Wert erscheint zunächst eher gering. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass keine angepasste Isolierungs- und Reinigungsmethode verwendet wurde, sondern lediglich gängige Zentrifugations- und Extraktionsschritte bei der Produktisolierung Anwendung fanden. Die Produktmenge war dennoch für die NMR-Strukturanalyse ausreichend, welche die Bestätigung seiner Identität als 20α -DHD erlaubte (Anhang B). Da in einem effizienten Produktionsprozess jedoch höhere Produktmengen erreicht werden mussten, bedurfte es noch weiterer prozesstechnischer Verbesserungen.

Der folgende Schritt war daher die Maßstabsvergrößerung der *fed-batch*-Produktion von 20α -DHD mit JMN8 auf den 10 l-Maßstab. Ziel dabei war es, erste Hinweise auf Verhalten und Veränderungen des vorhandenen Systems in einem größeren Herstellungsmaßstab zu erhalten. Bei der Fermentation von JMN8 im 10 l-Bioreaktor mit Prozessführung B wiesen die ersten 24 h die stärkste Biomassezunahme (von etwa 1,7 g/l auf 5,6 g/l Trockenbiomasse) und Produktbildung (ca. $350 \mu\text{M/d}$) auf (Abbildung 29). Die weitere Biotransformation zeigte eine relativ konstante Biomassekonzentration

bei kontinuierlicher Produktionsrate um $67 \mu\text{M}/\text{d}$. Für den gesamten Biotransformationszeitraum von 68 h ergab sich so eine durchschnittliche Produktionsrate von ca. $175 \mu\text{M}/\text{d}$ (oder $485 \text{ mg}/\text{d}$). Die 20α -DHD-Bildungsrate, die zuvor im 2 l-Bioreaktor erreicht wurde, konnte also im 10-fach höheren Volumen unter ansonsten gering veränderten Fermentationsbedingungen nicht nur reproduziert werden, sondern wurde fast verdoppelt. Dies war nicht unbedingt zu erwarten, da die veränderten geometrischen und physikalischen Bedingungen in größeren Maßstäben eine schlechtere Durchmischung und eine Beeinträchtigung der physiologischen Reaktionsbedingungen bewirken, was wiederum zu einer verringerten Prozesskonstanz und -reproduzierbarkeit, zu verminderten spezifischen Ausbeuten sowie zu geringerer Produktqualität führen kann. Eine Beibehaltung oder sogar Erhöhung der spezifischen Produktausbeute und -qualität bei einer maßstabgerechten Erhöhung des Fermentationsvolumens um eine oder mehrere Größenordnungen ist daher oft schwierig (Schmidt, 2005). Die in Biotransformationen von Dydrogesteron mit JMN8 erreichte Produktausbeute war dennoch zu gering für ein effizientes 20α -DHD-Produktionsverfahren. Es war jedoch davon auszugehen, dass die Produktionsrate sowohl durch molekularbiologische als auch durch prozesstechnische Verbesserungen weiter gesteigert werden könnte.

Die für das Substrat Dydrogesteron erlangten prozesstechnischen Erfahrungen konnten auch für die *fed-batch*-Produktion von 20α -DHP mit dem Produktionsstamm JMN8 im 1,5 l-Bioreaktor erfolgreich genutzt werden. Ziel dabei war es, das kommerziell nur schwer erhältliche 20α -DHP in ausreichender Menge für die Verwendung als Referenzstandard zu produzieren sowie seine Identität durch NMR-Strukturanalyse eindeutig zu beweisen. Die ersten 30 Stunden der Fermentation können als Biomasseanzuchtsphase beschrieben werden. Sie zeigt die stärkste bisher erreichte Biomassezunahme (auf mehr als $14 \text{ g}/\text{l}$ Trockenbiomasse; Abbildung 31). Dafür wurde die Glucosekonzentration in einem niedrigen Bereich gehalten, um die das Hefezellwachstum hemmende Ethanolbildung soweit wie möglich zu vermeiden. Die zweite Phase der Fermentation kann als Biotransformationsphase bezeichnet werden. Charakteristisch ist die zumindest anfänglich hohe 20α -DHP-Produktionsaktivität zusammen mit konstant hoher Biomasse- und niedriger Sauerstoffkonzentration. Um hohe Biotransformationsraten zu erreichen musste die Glucosekonzentration in dieser Phase erhöht werden. In diesem *fed-batch*-Experiment unter optimierten Reaktionsbedingungen wurde eine durchschnittliche 20α -DHP-Produktionsrate von ca. $171 \mu\text{M}/\text{d}$ über die gesamte Biotransformationszeit von 72 h ermittelt. Das bedeutet, die relative Menge 20α -DHP, die durch die Biotransformation in MTPs produziert wurde (etwa $90 \mu\text{M}/\text{d}$), war im Fermentationsmaßstab überraschenderweise nicht bloß reproduzierbar, sondern es konnten sogar noch höhere Produktmengen erzielt werden. Letztlich konnte eine 20α -DHP-Produktivität von etwa 100 mg ($500 \mu\text{M}$, $0,65 \text{ l}$) erreicht werden. Neben zweitrangigen Faktoren (wie z.B. der pH-Regelung), lässt sich diese Verbesserung am wahrscheinlichsten auf die konstante Glucoseversorgung der Kultur durch das *feeding* zurückführen. Nach der Biotransformation wurde das Produkt erfolgreich aus der

Fermentationskultur isoliert. Die Gesamtausbeute von etwa 30 % (30 mg) der theoretischen Maximalausbeute von 20α -DHP ist beachtlich, wenn man bedenkt, dass auch hier eine eher allgemeine anstelle einer angepassten Isolierungs- und Aufreinigungsmethode verwendet wurde. Die Produktmenge war für weitere JMN8-Charakterisierungsexperimente sowie für die NMR-Strukturanalyse ausreichend. Die Strukturaufklärung bewies eindeutig, dass es sich bei der produzierten Substanz um 20α -DHP handelte (Anhang B).

In den vielfältigen Biotransformationsexperimenten unter Verwendung des Stamms JMN8 wurden somit grundlegende Erfahrungen und Erkenntnisse für die Produktion von 20α -DHD und 20α -DHP mit AKR1C1-exprimierenden Spalthefezellen gesammelt. Im Fermentationsverfahren wurden erstmals größere Mengen dieser Metabolite hergestellt sowie wichtige Hinweise auf mögliche Ansatzpunkte für die weitere Prozessoptimierung erlangt, welche die Basis für weitere Umsatzsteigerungen darstellten. Da für den Aufbau eines effizienten und ökonomisch sinnvollen Produktionsverfahrens für 20α -Hydroxysteroiden noch eine deutliche Erhöhung der Produktionsrate erforderlich war zielten die folgenden Experimente auf die Stamm- (siehe 3.3) und Prozessoptimierung (siehe 3.4) ab.

4.3 Stammoptimierung

Bereits beim Aktivitätsvergleich der Stämme JMN8 und JMN7 wurde ein Gendosiseffekt aufgrund einer möglicherweise unterschiedlichen Anzahl von AKR1C1-Expressionskassetten vermutet (siehe oben). Dementsprechend war es naheliegend zu untersuchen, ob Stämme mit mehreren AKR1C1-Expressionseinheiten zu noch höherer Aktivität fähig sind. Der AKR1C1-Zweifachexprimierer JMN9 entstand durch Transformation von JMN7 mit dem bereits für die Konstruktion von JMN8 eingesetzten Expressionsplasmid pREP1-AKR1C1. Durch Transformation des Spalthefestamms ATCC96115 mit pREP1-AKR1C1 und dem neu klonierten Expressionsplasmid pREP1_{ura}-AKR1C1 entstand weiterhin der Stamm CAD300, der wie JMN9 zwei AKR1C1-Expressionskonstrukte enthält. CAD300 wurde dann mit dem ebenfalls neu konstruierten Expressionsplasmid pMWIK2-AKR1C1 transformiert und so der AKR1C1-Dreifachexprimierer CAD302 konstruiert (Abbildung 34).

In einer Aktivitätsuntersuchung der neu hergestellten Stämme wurde deren Progesteron-Biotransformationsaktivität bewiesen und von jedem einzelnen Stamm der Klon mit der größten Umsatzaktivität identifiziert und als einziger weiter verwendet (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Aktivität der AKR1C1-Mehrfachexprimierer untereinander und mit JMN8 verglichen. Der Stamm CAD300 zeigte fast dreifache Umsatzaktivität, CAD302 sogar fast vierfache spezifische 20α -DHP-Bildungsaktivität im Vergleich zu JMN8 (Abbildung 35). JMN9, der eine AKR1C1-Expressionseinheit ins Genom integriert hat und eine weitere autosomale enthält, wies hingegen

überraschenderweise eine im Vergleich zu JMN8 um mehr als 50 % verringerte spezifische Aktivität auf. Dies ist unerwartet, denn es war anzunehmen, dass er mindestens die gleiche Aktivität aufweist. Möglicherweise sind die Unterschiede in der Aktivität der Stämme nicht nur durch die verschiedenen Expressionsplasmide mit denen sie transformiert wurden, sondern auch durch den verschiedenen Stammhintergrund zu begründen. Es wird vermutet, dass sich die in dieser Arbeit eingesetzten Elternstämme NCYC2036, NCYC1913 und ATCC96115 genotypisch in mehr als nur den bekannten Markergenen unterscheiden. So scheint sich NCYC2036, welcher der Ausgangstamm von JMN7 und JMN9 ist, schlechter für die rekombinante Expression der AKR1C1 zu eignen als die Elternstämme von JMN8, CAD300 und CAD302. Wenn diese Hypothese stimmt, müsste theoretisch der durch Transformation von NCYC2036 mit pREP1ura-AKR1C1 entstehende Stamm geringere Biotransformationsaktivität als der vergleichbare Stamm JMN8 aufweisen. Anhand der vorliegenden Daten wurde der AKR1C1-Dreifachexprimierer CAD302 als der vielversprechendste Stamm für den Aufbau eines effizienten Systems für den Umsatz von 20-Ketosteroiden zu den entsprechenden 20 α -Hydroxymetaboliten angesehen und daher in allen folgenden Experimenten verwendet.

4.4 Prozessentwicklung mit dem Stamm CAD302

Die folgenden Experimente zielten auf die Optimierung einzelner, wichtiger Parameter im Fermentationsverfahren zur Herstellung von 20 α -DHD ab. Mit dem Ziel, im späteren Produktionsprozess ein möglichst starkes Zellwachstum und damit hohe Biomassekonzentration zu erreichen, wurden Wachstumskinetiken von CAD302 unter dem Einfluss verschiedener äußerer Parameter (Substrat- und Glucoseeinfluss) untersucht. Zunächst wurde analog zu vorherigen Experimenten mit JMN8 das Wachstumsverhalten in EMM unter Substrateinfluss betrachtet. Obwohl das phänotypische Erscheinungsbild von CAD302 vergleichbar mit dem von JMN8 ist (nicht gezeigt), wachsen die CAD302-Zellen mit einer spezifischen Wachstumsrate μ von $0,04 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ bedeutend langsamer (Abbildung 36). Die Substratzugabe hat unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei diesem Stamm überraschenderweise keinen offensichtlichen Effekt auf das Wachstumsverhalten. Das sehr langsame Wachstum von CAD302 mit sehr langen Generationszeiten bedingt wahrscheinlich die verhältnismäßig großen Standardfehler in den ermittelten wachstumskinetischen Daten. Die Schwankungsbreite der Daten ließe sich womöglich reduzieren, wenn die Kinetik über einen noch längeren Zeitraum untersucht würde. Die Ergebnisse des Stammvergleichs und die Daten der Wachstumskinetiken deuten zusammen genommen darauf hin, dass es durchaus einen deutlichen Gendosis-effekt bei Biotransformationen mit AKR1C1-Exprimierern gibt. Allerdings wirkt sich eine Erhöhung der Gendosis nicht in jedem Fall förderlich auf die spezifische Transformationsaktivität aus, wie die verringerte Aktivität von JMN9 trotz höherer Gendosis beweist. Die Expression eines rekombinanten Proteins kann sich auch negativ auf den gesamten Zellmetabolismus auswirken. Es scheint wahrscheinlich, dass die im

Vergleich zu JMN8 erhöhte Anzahl der AKR1C1-Genkopien verantwortlich für das schlechtere Wachstum von CAD302 ist. Somit ist anzunehmen, dass eine theoretisch mögliche weitere Erhöhung der Genkopien keine weitere Steigerung der Umsatzaktivität bewirkt, sondern der zytotoxische Effekt überwiegt. Dementsprechend wird generell die für einen Produktionsstamm mögliche und sinnvolle Anzahl der Genkopien pro Zelle nicht allein von der Anzahl der im Ausgangsstamm vorhandenen Auxotrophiemarkergene limitiert, sondern auch vom Ausmaß der zytotoxischen Wirkung des Genprodukts. Bei der Konstruktion neuer Produktionsstämme ist somit nicht allgemein vorhersehbar, welcher Ausgangsstamm und welche Kombination und Anzahl von Expressionsplasmiden für möglichst hohe Umsatzaktivität optimal sind. Diese Parameter müssen für jeden Stamm spezifisch herausgefunden werden. Je nach limitierendem Faktor ist jedoch grundsätzlich anzunehmen, dass mehrere Genkopien zu mehr exprimiertem Protein und damit zu größerer Aktivität führen.

Auch die Auswirkung verschiedener Dydrogesteronkonzentrationen im Kulturmedium auf das Wachstum von CAD302 wurde näher betrachtet, um mögliche konzentrationsabhängige Effekte aufzudecken. Um die Versuchsbedingungen dabei möglichst eng an den Bedingungen des zeitlich parallel in einer Reihe von Parametern verbesserten 20 α -DHD-Produktionsprozesses im Bioreaktor auszurichten wurde hierbei DM1 mit 20 g/l Glucose statt EMM als Medium eingesetzt. In den Testansätzen wurden Konzentrationen im Bereich zwischen 0 und 3 mM gewählt und jeweils äquimolare Mengen β -Cyclodextrin zugesetzt. Unter diesen Bedingungen wird ohne Substrateinfluss mit $0,2 \text{ h}^{-1}$ eine deutlich größere spezifische Wachstumsrate μ ermittelt als zuvor in EMM-Medium (Abbildung 37), was darauf hindeutet, dass die hier verwendeten Bedingungen für effizientes Zellwachstum besser geeignet sind. Die Wachstumsrate nimmt dann aber bei steigender Dydrogesteronkonzentration stark ab. Das Substrat belastet also in diesem Experiment den Metabolismus der Hefezellen und hat dadurch eine deutliche inhibitorische Wirkung auf das Zellwachstum. Wie bereits für Stamm JMN8 diskutiert wurde, ist möglicherweise eine durch die Biotransformationsaktivität der AKR1C1-Expriemierer reduzierte Gesamtenergiebilanz in den Zellen für die unter Dydrogesteroneinfluss verminderten Wachstumsraten verantwortlich. Aufgrund dieser Ergebnisse erschien es sinnvoll, Fermentationsprozesse im Pilotmaßstab bei denen mit hohen Substratkonzentrationen gearbeitet wird, in eine Biomasseanzuchtsphase ohne Substratzugabe und eine anschließende Biotransformationsphase zu unterteilen.

Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener Glucosekonzentrationen im Bereich von 0 bis 20 g/l im DM1-Kulturmedium auf das Wachstum von CAD302 untersucht. Die spezifische Wachstumsrate μ wurde für die ersten 4 h der Inkubation bestimmt, um Hinweise zu einer angepassten Glucosekonzentration im Medium während der Zellanzuchtsphase in Bioreaktoren zu erlangen. Dabei zeigte sich, dass die Wachstumsrate weitgehend unabhängig von der Glucosekonzentration ist (Abbildung 38). Wenn Glucose im Medium verfügbar ist findet deutliches Zellwachstum statt und eine Erhöhung der Glucosekonzentration bewirkt keine signifikante Steigerung. Niedrige

Anfangsglucosekonzentrationen im (Fermentations-)Medium reichen also für eine zufriedenstellende Biomassezunahme aus.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Umsatzgeschwindigkeit in Steroidbiotransformationen unter anderem abhängig von der Substratkonzentration im Reaktionsmedium ist. Die maximale Löslichkeit von Progesteron und Dydrogesteron in EMM liegt unter 100 μM ; die theoretischen $\log P$ -Werte betragen 3,9 bzw. 3,8 (Cheng, *et al.*, 2007). Dementsprechend schien die Substratlöslichkeit und damit verbunden die Substratverfügbarkeit ein weiterer wichtiger limitierender Faktor dieses Biotransformationsprozesses zu sein. Demzufolge erschien eine Erhöhung der Substratlöslichkeit, die beispielsweise durch die Zugabe von sogenannten *Cosolvents* oder Cyclodextrinen zum Reaktionsmedium möglich ist, als äußerst vielversprechend, um eine Steigerung der Produktivität zu erreichen. Daher wurde bestimmt, wie sich die Verwendung verschiedener β -Cyclodextrinkonzentrationen auf die Löslichkeit von Dydrogesteron im Medium auswirkt. Es zeigte sich, dass sich optimale Dydrogesteronlöslichkeit durch Dydrogesteron: β -Cyclodextrin-Verhältnisse im Bereich 1:1 bis 1:2 erzielen lässt (Abbildung 39). Höhere β -Cyclodextrin-Mengen vermindern hingegen wieder die Substratlöslichkeit. Höchstwahrscheinlich bilden die an sich ebenfalls nur begrenzt wasserlöslichen Cyclodextrin-Moleküle ab gewissen Konzentrationen verstärkt Aggregate aus und präzipitieren. Aufgrund dieser Ergebnisse und aus wirtschaftlichen Gründen wurde in folgenden Biotransformationen sowie bei der Metabolitenproduktion im Bioreaktor β -Cyclodextrin im äquimolaren Verhältnis zum Substrat zum Kulturmedium gegeben.

Es wurde weiterhin untersucht, wie sich die Verwendung von β -Cyclodextrin in unterschiedlicher Konzentration auf die Umsatzrate auswirkt. β -Cyclodextrinkonzentrationen wurden im Bereich zwischen 0 und 10 mM und damit im Molaritätsverhältnis zum Substrat zwischen 1:1 und 1:10 gewählt. Dabei zeigte sich, dass bei Zugabe von β -Cyclodextrin im einfachen und zweifachen molaren Verhältnis zum Substrat die Umsatzrate um ca. 20 bis 50 % erhöht wird (Abbildung 40). Dabei gab es keine Substanzumverteilung zwischen Zellsediment und Kulturüberstand, was zeigt, dass sich unter diesen Bedingungen tatsächlich eine höhere Umsatzaktivität erreichen ließ und nicht lediglich größere Produktmengen in gelöster Form vorlagen als ohne β -Cyclodextrin. Höhere β -Cyclodextrinkonzentrationen wirken sich hingegen negativ auf den Dydrogesteronumsatz aus. Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand ist die bereits als Grund für die verringerte Substratlöslichkeit bei hohen β -Cyclodextrinkonzentrationen vermutete Aggregatbildung der Cyclodextrine. Eine weitere Ursache könnte sein, dass eine hohe β -Cyclodextrinkonzentration im Umfeld der *S. pombe*-Zellen zytotoxisch wirkt, da bestimmte andere Stoffwechselwege in Mitleidenschaft gezogen werden. Die zytotoxische Wirkung von β -Cyclodextrin in hoher Konzentration ist aus *in vitro*-Untersuchungen an Säugetierzelllinien bekannt (Leroy-Lechat, *et al.*, 1994). Als dritter Grund kommt in Betracht, dass hohe β -Cyclodextrinkonzentrationen zu osmotischem Stress für die Zellen führen. Es ist daher anzunehmen, dass sich der

Einsatz von β -Cyclodextrin in höherer Konzentration auch negativ auf das Zellwachstum auswirkt. Demnach war auch aus diesem Grund bei Fermentationsansätzen, bei denen mit sehr hoher Substrat- und damit β -Cyclodextrinkonzentration gearbeitet wurde, eine Teilung des Prozesses in Biomasseanzucht- und Biotransformationsphase sinnvoll, denn so wurde die β -Cyclodextrin-Zugabe erst nach dem Biomassewachstum erforderlich.

Mit dem Ziel, die Dydrogesteron-Biotransformationsrate und die Raum-Zeit-Ausbeute des Systems im späteren Produktionsprozess zu verbessern, wurden wie bereits zuvor für JMN8 Umsatzkinetiken mit CAD302 unter dem Einfluss verschiedener Parameter erstellt. Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Substratkonzentrationen untersucht. Die spezifische Umsatzrate erreichte dabei ihren Maximalwert bereits ab verhältnismäßig geringen Dydrogesteronkonzentrationen im Bereich zwischen 0 und 1 mM (Abbildung 41). Eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration auf bis zu 3 mM hatte keinen Effekt. Mit einer Substratkonzentration von 250 μ M wird unter diesen Bedingungen in den ersten vier Stunden der Inkubation eine Raum-Zeit-Ausbeute von 54,1 μ M/h erreicht. Diese verhält sich analog zur Umsatzrate und steigt mit der Substratkonzentration auf Werte bis ca. 80 μ M/h ab 1 mM Dydrogesteronkonzentration. Das bedeutet, dass die Dydrogesteronbiotransformation mit CAD302 in diesem Punkt vergleichbar mit der von JMN8 ist und vermutlich weitgehend den gleichen Einflüssen und Limitierungen unterliegt wie sie bereits für JMN8 diskutiert wurden.

Danach wurde in einem analogen Versuch die Abhängigkeit der Umsatzrate von der Glucosekonzentration untersucht. Dabei zeigte sich, dass auch die Daten über die Glucoseabhängigkeit des Dydrogesteronumsatzes mit CAD302 sehr ähnlich den für JMN8 ermittelten sind (Abbildung 42): Die Biotransformationsrate ist nur bedingt von der Glucosekonzentration abhängig; wenn Glucose im Kulturmedium vorhanden ist zeigen sich bei den untersuchten Glucosekonzentrationen im Bereich zwischen 1 und 20 g/l keine signifikanten Unterschiede der spezifischen Umsatzrate.

Auch der Einfluss verschiedener Produktkonzentrationen auf die Biotransformationsrate von CAD302 wurde in einem analogen Versuch näher betrachtet. Dieser Parameter war nicht außer Acht zu lassen, da es in Produktionsprozessen mit hohen Substratkonzentrationen, wie sie hier eingesetzt wurden, unter Umständen auch zu hohen Produktkonzentrationen kommen kann, die dann ihrerseits die Umsatzrate ebenfalls stark beeinflussen können. Bereits eine 20 α -DHD-Anfangskonzentration von 250 μ M hatte einen deutlich negativen Effekt auf die Umsatzrate (Abbildung 43). Bei einer Produkthanfangskonzentration von 1 mM wurden noch ca. 30 %, bei 2 mM nur noch etwa 15 % der maximalen Umsatzrate von 17,5 μ mol \cdot g⁻¹ \cdot h⁻¹ ohne Produkteinfluss erreicht. Das heißt, die Biotransformation von Dydrogesteron wurde stark durch das gebildete Produkt inhibiert. Die Einstellung eines Reaktionsgleichgewichts, bei welchem die Rate der Rückreaktion gleich der der Hinreaktion ist, kann als Begründung für diesen Effekt weitestgehend ausgeschlossen werden, da die AKR1C1 *in vivo* vorzugsweise als

Reduktase wirkt, wobei die Oxidationsreaktion durch niedrige Konzentrationen des Kofaktors NAD(P)H beschränkt wird (Penning, *et al.*, 2000, Zhang, *et al.*, 2000). Es gibt nur sehr wenige Untersuchungen zum Kofaktor-Gleichgewicht in *S. pombe*. Zehentgruber, *et al.* zeigten jedoch, dass in Spaltheferzellen sowohl NAD⁺ und NADH als auch NADP⁺ und NADPH untereinander jeweils fast im gleichen Konzentrationsverhältnis vorliegen, wenn auch die NADH-Konzentration in etwa 10-fach höher ist als die NADPH-Konzentration (Zehentgruber, *et al.*, Manuskript eingereicht). Ob die Reduktionsäquivalente in CAD302-Zellen unter den gegebenen Prozessbedingungen in ähnlichen Konzentrationsverhältnissen vorliegen lässt sich ohne weitere Untersuchungen nicht klären. Demnach ist an dieser Stelle mit dem vorhandenen Wissen nicht zu erklären, warum im Ganzzell-Biotransformationsprozess offensichtlich keine Rückreaktion stattfindet. Im Hinblick auf eine weitere Prozessoptimierung wäre eine Quantifizierung aller vier Kofaktoren in CAD302, möglichst zu verschiedenen Zeitpunkten im Laufe einer Biotransformation im Bioreaktor, interessant und hilfreich, da eine erhöhte Verfügbarkeit von NAD(P)H die Umsatzrate möglicherweise steigern könnte. Eine naheliegende Erklärung für den inhibitorischen Effekt des Produkts könnte sein, dass Substrat und Produkt um die Bindestelle am Enzym konkurrieren, wobei die Affinität des Produkts zur Bindestelle höher ist als die des Substrats. Bedenkt man die experimentellen Rahmenbedingungen und erhaltenen Daten, so wird diese These gestützt. Eine gleiche Affinität der beiden Stoffe zum Enzym sollte bei einem äquimolaren Verhältnis von Substrat und Produkt theoretisch eine um 50 % reduzierte Umsatzrate zur Folge haben, da unter den genannten Umständen annähernd gleich viele Enzymmoleküle im Komplex mit Substrat oder Produkt vorliegen. Die Inhibierung ist mit einer unter diesen Bedingungen um 85 % reduzierten Umsatzrate jedoch weitaus stärker. Eine exakte kinetische Analyse dieser Enzymreaktion und ihrer Hemmung durch das Produkt könnte durch vergleichbare Experimente *in vitro* erreicht werden.

Diese Ergebnisse hatten erhebliche Konsequenzen für den Produktionsprozess. Obwohl sich eine hohe Substratkonzentration nicht negativ auf den Umsatz auswirkt, war es nicht sinnvoll bei der 20 α -DHD-Produktion im Bioreaktor beliebig hohe Substratkonzentrationen einzusetzen, da bereits eine Produktkonzentration von 1 mM eine Inhibierung der Umsatzrate um etwa 70 % zur Folge hatte. Es wäre aufgrund dieser starken Produktinhibierung höchstwahrscheinlich nicht möglich, größere Mengen an eingesetztem Substrat in einem angemessenen Zeitrahmen vollständig oder annähernd vollständig umzusetzen. Daher wurde im Produktionsprozess die Anfangssubstratkonzentration (die sich im Laufe der Fermentation wegen fortschreitender Biotransformation und auch aufgrund des steigenden Kulturvolumens reduziert) auf weniger als 3 mM beschränkt und so ein zufriedenstellendes Produkt:Substrat-Verhältnis erzielt.

Die Produktinhibierung verhindert eine Produktion von 20 α -DHD in höherer Konzentration ohne den Einsatz von besonderen prozesstechnischen Maßnahmen, die eine Senkung der Produktkonzentration im Bioreaktor bewirken. Für eine weitere Produktionsoptimierung wären daher mehrere Ansätze denkbar, die eine Inhibierung der

Produktbildung durch das Produkt verhindern, indem das Produkt aus der Fermentationsflüssigkeit entfernt wird. Bei biologischen Prozessen, die eine Produktinhibierung aufweisen, kann grundsätzlich über eine kontinuierliche Fermentation nachgedacht werden. Kontinuierlich betriebene Bioreaktoren erfordern jedoch einen erheblichen apparativen und steriltechnischen Aufwand, was ihre Nutzung sehr zeit- und kostenintensiv macht. Darüberhinaus stellt das Auswaschen der Zellen ein Hindernis in kontinuierlichen Prozessen dar. Dieses Problem kann zwar durch eine Immobilisierung der Hefezellen gelöst werden (Verbelen, *et al.*, 2006), jedoch wird die kommerzielle Einführung eines solchen Prozesses durch eine Vielzahl an Problemen, nicht zuletzt bei der Maßstabsvergrößerung, erheblich erschwert. Die Produktkonzentration im Bioreaktor kann auch durch eine ins Fermentersystem integrierte Produktabtrennung gering gehalten und so eine Produktinhibierung verhindert werden. Demnach könnte die Bindung des Produkts an selektive Adsorbensmaterialien ein weiterer Lösungsansatz sein. Denkbar wäre z.B., die Kulturflüssigkeit in einem externen Kreislauf durch eine Adsorbensäule und wieder zurück in den Bioreaktor zu pumpen. Dabei müssen die Zellen beispielsweise mit Hilfe einer *Cross-flow*-Filtrationseinheit im Bioreaktor zurückgehalten werden. Außerdem ist es wichtig, dass das ganze System incl. Säulenmaterial autoklavierbar ist, damit die Sterilität gewährleistet werden kann. Die integrierte Produktseparation durch reaktive Extraktion kann auch erfolgen, indem das Adsorbensmaterial direkt in der wässrigen Phase im Bioreaktor vorliegt. Diese Methode wird unter anderem bei der Bioproduktion des Aromastoffs 2-Phenylethanol durch *Kluyveromyces marxianus* und *Saccharomyces cerevisiae* angewandt (Stark, *et al.*, 2003, Gao & Daugulis, 2009). Häufiger wird ein solches Verfahren bei der Extraktion organischer Säuren, z.B. in der Milchsäureproduktion mit *Lactobacillus ssp.* (Yabannavar & Wang, 1991, Honda, *et al.*, 1995, Patel, *et al.*, 2008) oder der Zitronensäureproduktion mit *Aspergillus niger* (Wieczorek & Brauer, 1998, Wieczorek & Brauer, 1998) eingesetzt. Weiterhin erfolgt die Abtrennung von L-Phenylalanin in einem *fed-batch*-Prozess mit *E. coli* auf diese Weise (Maass, *et al.*, 2002). Auch die integrierte Separation und Veresterung von Ethanol mit *S. cerevisiae* (zusammen mit einer immobilisierten Lipase) wurde beschrieben (Oliveira, *et al.*, 1997). Die Maßstabsvergrößerung der meisten dieser Prozesse ist allerdings nur bedingt möglich. Daher bedürfen sie noch einiger Entwicklung bis zu ihrer Anwendbarkeit im industriellen Maßstab. Ein anderer Ansatz ist die *in-situ*-Extraktion in einem zweiphasigen Kultursystem, bei der das Produkt im Bioreaktor aus dem wässrigen Kulturmedium in eine mit Wasser nicht mischbare flüssige Phase übertritt. Diese Methode stellt eine alternative Technologie dar, um die Produktivität zu erhöhen, wie beispielsweise bei der Produktion des Aromastoffs 6-Pentyl- α -pyron durch *Trichoderma harzianum* gezeigt wurde (Serrano-Carreón, *et al.*, 2002). Eine große Schwierigkeit bei der Anwendung dieses Verfahrens besteht in der Auswahl eines geeigneten Extraktionsmittels. Die Verwendung organischer Lösemittel kann zu physikalischen, morphologischen und biochemischen Veränderungen des Mikroorganismus führen. Wenig-polare und gleichzeitig hoch-molekulargewichtige Lösemittel

weisen geringere Toxizität auf (Brink & Tramper, 1985, Laane, *et al.*, 1987). Darüberhinaus hängt die Lösemittel-Bioverträglichkeit mit dem Logarithmus der Verteilungskoeffizienten ($\log P$) des Lösemittels in einem Standard-Oktanol-Wasser-System (1:1 v/v) zusammen. Lösemittel mit einem $\log P > 4$ wirken nur schwach toxisch und sind daher potentiell für die Anwendung in einem solchen System geeignet (Laane, *et al.*, 1987, Yabannavar & Wang, 1991). Darüberhinaus sollte das Lösemittel möglichst selektiv das Produkt aus dem komplexen Kulturmedium extrahieren. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist ihre relativ gute Größenanpassungsfähigkeit, die sie auch für großtechnische Produktionsprozesse interessant macht. Neben der Unterdrückung der Produktinhibierung kann die kontinuierliche Entfernung des Produkts auch durch die Verschiebung des chemischen Gleichgewichts der Reaktion zugunsten des Produkts eine Erhöhung der erzielbaren Produktmenge bewirken.

Nachdem durch eine Vielzahl von Experimenten im Schüttelkolben-Maßstab eine Reihe von Parametern näher betrachtet worden war und dort deren optimale Werte näher eingegrenzt werden konnten, wurden die gewonnenen Erkenntnisse auf den Bioreaktor übertragen. Dort erfolgte dann die weitere Optimierung des Produktionsprozesses insbesondere im Hinblick auf eine dem Fermentationsverlauf angepasste *feed*-Strategie.

In der ersten Fermentation mit CAD302 im 1 l-Labormaßstab (Prozessführung C) wurde als Medium EMM mit einem Glucosegehalt von 50 g/l eingesetzt und eine Anfangssubstratkonzentration von 1 mM eingestellt. Ausreichende Glucoseversorgung der Kultur während der Fermentation wurde durch einmalige manuelle Zugabe einer konzentrierten Glucoselösung gewährleistet. Mit einer Biomassekonzentration von maximal 3 g/l wurde über den gesamten Biotransformationszeitraum, der allerdings nur 50 h betrug, eine mittlere Umsatzaktivität von 115 $\mu\text{M}/\text{d}$ aufrecht erhalten (Abbildung 44). Im vergleichbaren Dydrogesteron-Umsatzexperiment mit JMN8 (Prozessführung A) wurde eine Umsatzrate von ca. 98 $\mu\text{M}/\text{d}$ erreicht. Dementsprechend konnte die signifikante Steigerung der Ganzzell-Biotransformationsaktivität mit CAD302 im Vergleich zu JMN8, die in MTP-Experimenten beobachtet wurde, im Fermentationsmaßstab bestätigt werden. Die folgende Optimierung der Biotransformation von Dydrogesteron im 1 l-Labormaßstab zielte auf die weitere Steigerung der Umsatzrate ab.

Die ersten Änderungen der Fermentationsparameter wurden hauptsächlich auf eine Verbesserung des *feedings* ausgerichtet, um eine optimale Versorgung der Kulturen mit Glucose während des gesamten Prozesses zu ermöglichen. Bei der Prozessführung D erfolgte das *feeding* der Kultur erstmals mit einer automatisch geregelten, wachstumsratenangepassten *feed*-Strategie mit FM1 statt manuell mit Glucoselösung, welche die ausreichende Versorgung der Biotransformationskultur mit Glucose über den gesamten Fermentationszeitraum bewirkte. FM1 enthält neben Glucose als Kohlenstoffquelle auch eine leicht verfügbare Stickstoffquelle ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Da die Konzentration der Glucose in FM1 nur einem Viertel der Konzentration in der zuvor verwendeten reinen Glucoselösung entsprach, wurde im Laufe der Fermentation kontinuierlich ein größeres

feed-Volumen zugeführt, was mit der Zeit eine deutliche Zunahme des Kulturvolumens zur Folge hatte (Abbildung 46). In 116 h Fermentationsdauer wurde mit einer Trockenbiomasse von bis zu 6,6 g/l eine mittlere Umsatzaktivität von ca. 97 $\mu\text{M}/\text{d}$ erreicht, wobei nur über ca. 100 h eine Umsatzaktivität aufrecht erhalten werden konnte. Betrachtet man lediglich die Phase der erfolgreichen Biotransformation, so beträgt die Umsatzrate 116 $\mu\text{M}/\text{d}$. Dieser Wert liegt noch im Bereich des durch manuelles *feeding* erreichten Werts. Die *feed*-Strategie sollte im Folgenden noch weiter auf die Bedürfnisse einer CAD302-Umsatzkultur angepasst werden, um so eine weitere Steigerung der Umsatzrate zu erreichen.

Da inzwischen in unserer Arbeitsgruppe bekannt geworden war, dass *S. pombe*-Zellen in phthalatfreiem Medium zu höheren Zelldichten heranwachsen können als in EMM, wurde bei der Prozessführung E der Dydrogesteronumsatz bei Verwendung eines entsprechenden Fermentationsmediums (DM1) untersucht. DM1 enthält auch keine Glucose, die Glucoseversorgung der Zellen musste also ab Fermentationsstart durch das *feeding* gewährleistet werden. Außerdem wurde β -Cyclodextrin im molaren Verhältnis von 1:1 zum Substrat eingesetzt. Die Anfangssubstratkonzentration wurde mit 2 mM recht hoch gewählt. Durch das automatisch geregelte *feeding* mit manueller Anpassung wurde die Glucoseversorgung der Fermentationskultur im gesamten Biotransformationszeitraum von 51 h aufrecht erhalten. Unter diesen Bedingungen wurden erstmals Trockenbiomassewerte dieses Stamms von mehr als 10 g/l erreicht (Abbildung 47). Obwohl keine Hinweise auf einen Einfluss der Sauerstoffverfügbarkeit auf die AKR1C1-abhängige Biotransformation von Dydrogesteron erkennbar waren, wurde die Belüftungsrate stets so gewählt, dass der Gelöst-Sauerstoffwert nicht unter 30 % fällt. Denn es ist nicht auszuschließen, dass Biotransformationsreaktionen mit *S. pombe* in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit, d.h. vom Gelöst-Sauerstoff im Kulturmedium, unterschiedliche Geschwindigkeiten aufweisen. Die durchschnittliche 20 α -DHD-Produktionsrate mit dieser Prozessführung betrug etwa 195 $\mu\text{M}/\text{d}$ wobei die Produktbildung während der gesamten Fermentation stattfand. Da sich also unter Verwendung dieser neuen Parameter eine weitere deutliche Steigerung der Umsatzaktivität um fast 70 % erreichen ließ, wurde in allen folgenden Biotransformationen DM1 als Fermentationsmedium eingesetzt, welches vor Substratzugabe mit β -Cyclodextrin im molaren Verhältnis von 1:1 zum Substrat versetzt wurde.

Neben der Erhöhung der Umsatzaktivität wurde auch das Fermentationsvolumen enorm vergrößert um die Produktmenge so weit zu steigern, dass Metabolitmengen im Gramm-Maßstab ökonomisch sinnvoll produziert werden können. Die Produktion von 20 α -DHD sollte im „Labor-Pilot“ Bioreaktor im 70 l-Maßstab erfolgen. Aus diesem Grund erfolgten die weiteren Biotransformationen von Dydrogesteron in diesem Maßstab. Die weitere Optimierung des Produktionsverfahrens zielte auf die Produktion in solchen technischen Bioreaktoren ab. Prozessführung G basierte auf Prozessführung E und berücksichtigte die bisherigen Untersuchungsergebnisse zu verschiedenen, die AKR1C1-abhängige Steroidreduktion beeinflussenden Parametern, insbesondere

Fermentations- und *feed*-Medium sowie *feed*-Strategie. Das *feeding* der Kultur erfolgte hier über 36 h automatisch geregelt, danach wurde die Glucoseversorgung der Umsatzkultur mit konstanten Flussraten erreicht. Um auch in diesem Maßstab eine möglichst hohe Zelldichte zu erreichen, was sich wie gezeigt wurde positiv auf die Umsatzrate auswirkt, wurde der Fermentationsprozess in eine 24-stündige Zellanzuchtsphase und eine anschließende Biotransformationsphase unterteilt. In der Biomasseanzuchtsphase wurde für effizientes Spalthefewachstum eine niedrige Mediumglucosekonzentration zwischen 0,1 und 3 g/l eingestellt. Die Tatsache, dass eine anfänglich niedrige Glucosekonzentration hilfreich für starke Biomassezunahme ist, lässt sich durch eine reduzierte Ethanolbildung bei niedriger Glucosekonzentration erklären. Hohe Glucosekonzentrationen im Medium führen zum bekannten Crabtree-Effekt (Crabtree, 1928), der besagt, dass Hefe normalerweise bei höheren Glucosekonzentrationen zu alkoholischer Gärung übergeht und dabei den Biomassertragskoeffizienten für Glucose Y_{Xg} erniedrigt. Weiterhin zeigten De Jong-Gubbels *et al.*, dass Ethanol selbst für die Spaltheefe nur ein sehr geringwertiges Substrat darstellt und Y_{Xg} weiter einschränkt (de Jong-Gubbels, *et al.*, 1996). Hier wurde in der Biotransformationsphase die Glucosekonzentration auf einen Bereich zwischen 0,5 und 7,5 g/l erhöht, da, wie in den Vorexperimenten gezeigt wurde, eine gewisse Glucosekonzentration im Medium notwendig ist, um die effiziente AKR1C1-abhängige Biotransformation zu gewährleisten. Ohne den Einfluss von Dihydrogesteron und β -Cyclodextrin konnten in der Anzuchtsphase unter diesen Bedingungen Zelldichten erreicht werden, die mit denen im 1,5 l-Maßstab vergleichbar waren. Auch nach der Substratzugabe fand trotz der sehr hohen Substratanfangskonzentration von 3,6 mM ein weiteres Zellwachstum statt (Abbildung 48). Die Substratkonzentration wurde so gewählt, dass eine möglichst hohe Produktausbeute erreicht werden konnte. Sie stellte einen Kompromiss dar, denn einerseits lieferten vorangegangene Experimente keinen Hinweis auf einen direkten negativen Einfluss von hohen Dihydrogesteronkonzentrationen auf die Umsatzaktivität, andererseits haben aber hohe Substratkonzentrationen auch hohe Produktkonzentrationen zur Folge, die dann zu einer starken Produktinhibierung führen. Für den gesamten Biotransformationszeitraum von 132 h ergab sich so eine mittlere 20 α -DHD-Produktionsrate von 175 μ M/d (oder 2,1 g/d). Bei der optimierten Biotransformation von Dihydrogesteron mit CAD302 im 1 l-Maßstab mit Prozessführung E wurde eine Umsatzrate von ca. 195 μ M/d erreicht. Es ist überraschend, dass sich bei der anspruchsvollen Maßstabsvergrößerung des Prozesses um etwa den Faktor 40 die Produktivität pro Volumeneinheit in nur sehr geringem Maße reduzierte. Damit war das Ziel der Übertragung des 20 α -DHD-Produktionsprozesses auf den technischen Maßstab erreicht. Die theoretische Produktionsrate von 2,1 g/d stellte einen guten Ausgangswert für weitere Verbesserungen in der Produktion größerer Mengen an 20 α -DHD dar.

Im Verlauf der Prozessoptimierung wurden einzelne Parameter, die sich als wichtig erwiesen, bei ansonsten zu Prozessführung G weitestgehend identischen Bedingungen verändert, um deren optimale Werte herauszufinden. Mit dem Ziel, sowohl ein

möglichst gutes Produkt:Substrat-Verhältnis als auch genügend große Produktmengen zu erhalten, wurde die eingesetzte Substratmenge im Bereich zwischen 15 g und 25 g variiert. Es zeigte sich, dass bei geringeren Substratmengen zwar ein prozentual höherer Umsatz erfolgt, allerdings die Gesamtausbeute sinkt. Mit dem Einsatz von 20 g Dydrogesteron, also einer vergleichsweise hohen Substratanfangskonzentration von etwa 2,9 mM wurde ein optimales Gleichgewicht zwischen zufriedenstellendem Umsatz und ausreichender Produktmenge erzielt. Daher wurde diese Substratkonzentration im optimierten Produktionsprozess gewählt. Weiterhin wurde das Fermentationsmedium erst mit 50 %, später mit 100 % mehr Biomasse beimpft, um die Anfangsbiomassekonzentration zu erhöhen. Um Fermentationsvolumen zu reduzieren, was die anschließende Produktreinigung erleichterte, wurde der FM1-*feed* zudem doppelt konzentriert verwendet.

In einer für dieses Stadium des Optimierungsprozesses beispielhaften Biotransformation mit Prozessführung H wurden nach der Biomasseanzuchtsphase 56 mmol (17,5 g) Dydrogesteron zugegeben, was einer Substratkonzentration von nur noch ca. 2,5 mM (statt 3,6 mM bei Prozessführung G) entsprach. Durch Verbesserungen der automatisierten *feed*-Strategie war es möglich, die Glucosekonzentration sowohl während der Biomasseanzuchtsphase als auch während der Biotransformation in einem immer engeren Bereich konstant zu halten (Abbildung 49). Da sich die in diesem Fermentationsexperiment angewandte *feed*-Strategie damit als auf das System passend herausstellte wurde sie in folgenden Biotransformationen so beibehalten. Die 20 α -DHD-Produktion mit Prozessführung H kann ebenso wie bei Prozessführung G in drei Phasen unterteilt werden: Die Phase der stärksten Biotransformation innerhalb der ersten 24 h nach Substratzugabe, eine etwa 72-stündige Plateauphase in der die Produktkonzentration im Medium nicht weiter steigt und eine Phase erneut höherer Aktivität in den letzten 48 h der Biotransformation. Dabei schienen sich die Phasen starker Umsatzaktivität (am Anfang und am Ende der Biotransformation) exakt mit denen der stärksten Biomassezunahme zu überlagern. Dies könnte bedeuten, dass Zellen, die sich in der Wachstumsphase befinden, höhere Biotransformationsaktivität aufweisen als Zellen in der stationären Phase. In verschiedenen Wachstumsphasen gibt es Unterschiede im Stoffwechsel der Hefezellen (Rustici, *et al.*, 2004). In diesem Fall könnte sich die Stoffwechselsituation der wachsenden Zellen möglicherweise förderlich auf die AKR1C1-Aktivität auswirken. Die auch nach langer Fermentationszeit anhaltende Umsatzaktivität der Zellen weist zudem darauf hin, dass mit dieser Prozessführung im gegebenen Zeitraum offensichtlich keine Limitierungen auftreten. Im gesamten Biotransformationszeitraum wurde eine durchschnittliche Produktionsrate von 197 μ M/d erreicht, was verglichen mit Prozessführung G eine Steigerung um fast 15 % und so einen mit der optimierten Produktion im 1 l-Maßstab (Prozessführung E) vergleichbaren Wert bedeutet.

Aus der Vielzahl von Erkenntnissen und Erfahrungen, die in verschiedenen Experimenten zur Biotransformation von Dydrogesteron mit CAD302 im 1 l- und

Pilotmaßstab gewonnen wurden, ergab sich letztendlich ein effizienter optimierter Prozess für die technische Produktion von 20 α -DHD (Prozessführung I). Das *feeding* der Kultur erfolgte hier über knapp 2 Tage mit einer automatisch geregelten, wachstumsratenangepassten *feed*-Strategie und danach konstant mit manuell angepassten Flussraten. Der Glucoseverbrauch der Kulturen nahm mit der Zeit trotz steigender Biomassekonzentrationen ab. Auch die Umstellung des *feeds* von 2xFM1 auf konzentrierte Glucoselösung im späteren Verlauf der Biotransformationsphase beeinträchtigte die Umsatzaktivität nicht. Dies kann auf einen Rückgang der allgemeinen Zellaktivität hindeuten. Die Zellen scheinen große Teile ihres Metabolismus und damit ihren Bedarf mit der Zeit herunterzuregulieren, dabei aber ihre AKR1C1-abhängige Umsatzaktivität weitgehend aufrecht zu erhalten, wozu sie lediglich etwas Glucose benötigen. Insgesamt konnte die Zellaktivität jedoch während des Optimierungsprozesses erhöht bzw. über immer längere Zeiträume aufrecht erhalten werden. Dies zeigte sich einerseits am steigenden *feed*-Verbrauch, was höhere Kulturvolumina zur Folge hatte und andererseits am zeitlichen Verlauf des Gelöst-Sauerstoffs. Unter optimalen Bedingungen fiel dieser Wert bereits früh sehr stark ab und dementsprechend häufig musste die Belüftungsrate nachträglich erhöht werden, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Dieses Verhalten ist wahrscheinlich auf die gut angepasste *feed*-Strategie zurückzuführen. Ebenso, dass die maximale Biomasse, die in Fermentationen im Pilotmaßstab erreicht wurde, im Verlauf der Prozessoptimierung um ca. 50 % gesteigert werden konnte, was als weiterer entscheidender Parameter bei der Steigerung der Biotransformationsrate angesehen werden kann. Während bei Prozessführung G etwa 10 g/l Trockenbiomasse erzeugt wurden, was den durch Prozessführung E im 1 l-Maßstab erreichten bis dahin höchsten Werten entspricht, wurden mit Prozessführung H Trockenbiomassen um 12 g/l und mit Prozessführung I, dem fertiggestellten Produktionsprozess, schließlich 15 g/l erzielt (Abbildung 50). Durch das bestmögliche Zusammenspiel der einzelnen Fermentationsparameter, insbesondere durch ein optimal angepasstes *feeding* der Produktionskulturen war es möglich, dass die Metabolitenbildung während der gesamten Biotransformation stetig zunahm, wenn auch mit fortschreitender Dauer immer langsamer und eine Plateauphase der Umsatzaktivität umgangen wurde. Mit dem optimierten 20 α -DHD-Produktionsverfahren im 70 l-Bioreaktor konnte reproduzierbar eine durchschnittliche Produktionsrate von etwa 190 μ M/d erreicht werden. Vergleicht man diese Daten mit denen der Dydrogesteronbiotransformationen vor der molekularbiologischen und prozesstechnischen Optimierung des Produktionsverfahrens (Prozessführung A), wo die 20 α -DHD-Produktionsrate bei 97 μ M/d mit einer Produktivität von ca. 30 mg/d lag, so konnte die Umsatzrate durch diverse Optimierungsmaßnahmen in etwa verdoppelt werden. Durch diese Steigerung sowie die enormen Erhöhungen der Substratkonzentration und des Fermentationsvolumens ergab sich letztlich eine theoretische Produktivität des Systems von ca. 2,1 g/d, was 12 g produziertem 20 α -DHD pro Fermentation entspricht. Mit der Gesamtdauer von 160 h pro Prozess war es möglich im Dauerbetrieb jede Woche einen Produktionsdurchgang anzufertigen. Insgesamt wurde

der fertiggestellte Prozess viermal hintereinander auf identische Weise durchgeführt. Dabei wiesen die einzelnen Produktionen eine sehr hohe Reproduzierbarkeit hinsichtlich Fermentationsverlauf und Produktbildung auf. In Abbildung 54 ist die Entwicklung der Rate des Umsatzes von Dydrogesteron zu 20α -DHD mit AKR1C1-exprimierenden *S. pombe*-Zellen im Verlauf der gesamten Produktionsoptimierung veranschaulicht. Zusätzlich sind im Diagramm auch die Umsatzraten von Progesteron zu 20α -DHP dargestellt, die durch die Übertragung der für die 20α -DHD-Herstellung erlangten prozesstechnischen Erfahrungen erreicht wurden (3.2.5 und 3.4.6). Die mit den verschiedenen Prozessführungen erreichten Biotransformationsraten werden in der Reihenfolge der Anpassungen und der Maßstabsvergrößerung dargestellt. Eine Übersicht der einzelnen Prozessführungen und ihrer Unterschiede findet sich im Anhang.

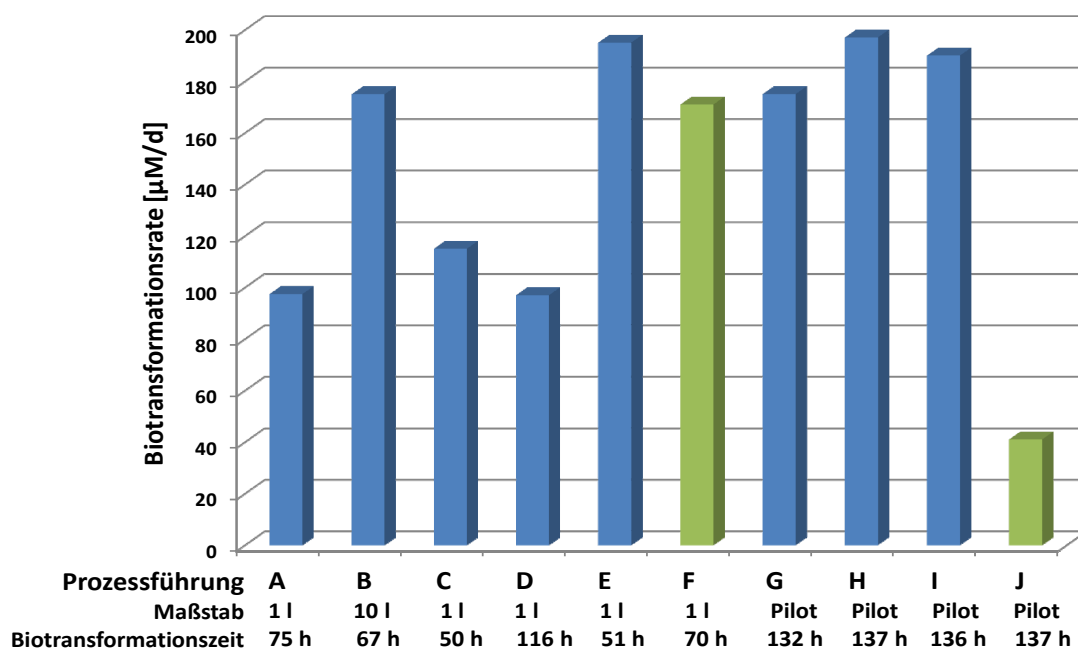


Abbildung 54: Entwicklung der Dydrogesteron- und Progesteron-Biotransformationsrate im Verlauf der Optimierung des Produktionsprozesses. Die Dydrogesteron-Biotransformationsraten sind blau, die Progesteron-Biotransformationsraten grün dargestellt. Die einzelnen Prozessführungen werden im Anhang detailliert aufgeführt.

Die Übersicht verdeutlicht noch einmal die Verdopplung der Biotransformationsrate von Dydrogesteron im Laufe der Prozessentwicklung und -optimierung. Bei der letztendlichen Produktion im Pilotmaßstab wurden gleiche oder sogar höhere Umsatzraten erreicht wie im 1 l- und 10 l-Maßstab während des Prozessaufbaus, allerdings konnte im Produktionsmaßstab die hohe Aktivität über weit längere Zeit aufrecht erhalten werden. Durch diese vielfältigen Verbesserungen konnten immer größere Produktausbeuten erzielt werden. Im Fall von Progesteron konnte im kleinen Fermentationsmaßstab eine Umsatzaktivität erreicht werden, die mit der für Dydrogesteron vergleichbar ist. Bei der 20α -DHP-Produktion im Pilotmaßstab kam es aber zu einem Einbruch der Biotransformationsrate, der wahrscheinlich hauptsächlich auf die bei Prozessführung J deutlich

größere Substratkonzentration zurückzuführen ist. Die Produktion von 20 α -DHP im Pilotmaßstab wird unter 4.5 diskutiert.

In der Literatur existieren nur sehr wenige Daten zur Raum-Zeit-Ausbeute von Biotransformationen mit AKR1C1. Diese wurden in *in vitro*-Experimenten mit isolierten, rekombinant in *E. coli* hergestellten Enzymen gewonnen; die Verwendung des Enzyms in Ganzzell-Ansätzen, wie in dieser Arbeit, wurde bisher nicht beschrieben. Für den Umsatz von 1-Acenaphthenol ist eine spezifische AKR1C1-Aktivität von 2,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ bekannt (Burczynski, *et al.*, 1998, Jin, *et al.*, 2009). Die große Mehrzahl der Untersuchungen an AKR1C1 wurde nicht mit dem Ziel angefertigt, biotechnologisch angepasste Systeme zu erhalten, sondern bezog sich auf Fragen der Enzymcharakterisierung oder -inhibierung. Hohe Biotransformationsraten werden eventuell in der Industrie erzielt, die jedoch in der Regel ihre interessantesten Ergebnisse nicht publiziert. Die unterschiedlichen Expressionssysteme, die erhebliche Variation im Versuchsaufbau und die verschiedenen eingesetzten Substrate machen einen sinnvollen Vergleich der Umsatzaktivitätszahlen problematisch, wenn nicht sogar unmöglich. Aus diesen Gründen wird an dieser Stelle auf den Vergleich der in dieser Arbeit erreichten Biotransformationsaktivitäten mit Literaturdaten verzichtet.

Hefesysteme sind in der Produktion industrieller und pharmazeutischer Proteine weit verbreitet. Die Hochzelldichte-Fermentation ist dabei bekanntermaßen einer der effektivsten Produktionsprozesse in der biotechnologischen Industrie. *S. pombe* wächst fakultativ fermentativ und weist einen „Kurz-“ und einen „Langzeit-Crabtree-Effekt“ auf. Der „Langzeit-Crabtree-Effekt“ ist verantwortlich für den respiro-fermentativen Metabolismus bei hohen Wachstumsraten, der unabhängig von den Kulturbedingungen (z.B. Wachstum unter Glucose-Limitierung oder bei Glucose-Überschuss) ist (Petrik, *et al.*, 1983, Postma, *et al.*, 1989). Der „Kurzzeit-Crabtree-Effekt“ beschreibt die alkoholische Fermentation, die sofort nach dem Wechsel von aeroben Zuckerlimitierten Kulturen zum Zuckerüberschuss einsetzt (Rieger, *et al.*, 1989, Van Urk, *et al.*, 1990). Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* ist *S. pombe* nicht in der Lage, Ethanol als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen und kann das Ethanol, das unweigerlich in *batch*-Kulturen produziert wird, kaum abbauen (de Jong-Gubbels, *et al.*, 1996). Dies ist möglicherweise durch das Fehlen der Isozitrattyase und der Malatsynthese begründet (Fiechter, *et al.*, 1981, McDonald & Tsai, 1989). Daher zeigt *S. pombe* unter nicht-Glucose-limitierten Fermentationsbedingungen einen hohen Umsatz von Glucose zu Ethanol verbunden mit relativ niedrigen Wachstumsraten. Dieser Effekt ist ein grundlegendes Problem bei industriell anwendbaren Fermentationen, bei denen die mikrobielle Biomasseausbeute direkt proportional zur Produktausbeute ist. Da *S. pombe* aufgrund vieler Vorzüge ein vielversprechendes Modellsystem zur Proteinproduktion ist, sollte die Hoch-Zell-dichte-*fed-batch*-Fermentation mit Spalthefen etabliert bzw. weiter vorangetrieben werden. Bisher ist nur sehr wenig zur *fed-batch*-Kultivierung von *S. pombe* bekannt. Alle vorhandenen Beschreibungen beziehen sich auf die rekombinante Proteinproduktion. Daher ist auch hier keine Diskussion der in dieser

Arbeit erreichten Biotransformationsraten möglich. Allerdings können die in den verschiedenen Prozessen erreichten Trockenbiomassen verglichen werden. Es wurde gezeigt, dass die Biomasse in direktem Zusammenhang mit der Umsatzaktivität steht. Sie kann daher als Aktivitätsindikator betrachtet werden. In einer *fed-batch*-Produktion der humanen lysosomalen sauren Lipase wurden Trockenbiomassen von bis zu 50 g/l erreicht (Ikeda, *et al.*, 2004). Allerdings wurde dort statt eines definierten synthetischen Mediums ein Kulturmedium verwendet, das Hefeextrakt enthielt und damit zwar das Biomassewachstum begünstigt, aber bei Verwendung thiaminregulierbarer Promotoren ungeeignet ist. Jansen *et al.* erzielten bei der Maltase-Produktion mit 83 g/l die höchste bisher beschriebene Trockenbiomasse (Jansen, *et al.*, 2006). Dort wurde die Fermentationskultur mit relativ viel Biomasse (4,5 g/l Trockenbiomasse) beimpft, die im Chemostat bereits aufwändig unter Glucoselimitierung herangezogen worden war. Die jüngste beschriebene *fed-batch*-Fermentation von *S. pombe* diente der Produktion von Ubiquinon und lieferte eine Trockenbiomasse von 57 g/l (Zhang, *et al.*, 2007). Diese literaturbekannten *fed-batch*-Prozesse nutzen im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit etablierten Produktionsprozess alle eine direkte *feedback*-Strategie zur Kontrolle der Glucose-*feed*-Rate. Dabei erfolgt die Berechnung der optimalen *feed*-Rate nach der Überwachung verschiedener Parameter. Die Ethanolkonzentration kann als empfindliche Variable effektiv gemessen werden und so als wichtige Stellgröße für die *feedback*-Kontrolle der *feeding*-Rate herangezogen werden. Die Online-Überwachung der Glucosekonzentration sowie indirekter Parameter wie Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxydentwicklung und respiratorischem Quotient (bestimmt nach Abgas-Analyse) während der Fermentation sind ebenfalls bedeutende Variablen, die eine sorgfältige Regulierung benötigen. Allerdings macht eine solche *feedback*-Steuerung den Produktionsprozess apparativ sehr aufwändig.

Im hier beschriebenen Biotransformationsprozess mit AKR1C1-exprimierenden Spaltheften wurde die *feed*-Rate während des automatisierten *feedings* mit einer *feed-forward*-Strategie reguliert. Dabei wurde die Anpassung der *feed*-Rate im Verlauf der Fermentation anhand empirischer Daten berechnet, wobei die zeitabhängige spezifische Wachstumsrate simuliert und dann ebenfalls berücksichtigt wurde. Dazu bedurfte es keiner Abgasanalyse oder online-Glucosemessung. Mit dieser Art der aeroben, Glucose-limitierten *fed-batch*-Kultur wurde eine Hoch-Zelldichte bis 15 g/l erreicht. Damit wurde die Produktion von AKR1C1-Metaboliten mit Hilfe rekombinanter *S. pombe*-Zellen durch die strikte Kontrolle des Glucose-*feedings* begünstigt. Die bisher beschriebenen Hoch-Zelldichte-Fermentationen im *fed-batch*-Verfahren sind technisch höchst aufwändig. Allerdings sind deren Biomasseausbeuten unter Berücksichtigung dieses beträchtlichen Mehraufwands nur geringfügig besser. Trotzdem können die direkte Überwachung der Ethanolkonzentration und die indirekte Bestimmung des respiratorischen Quotienten als die entscheidenden Techniken zur Kontrolle des Zellwachstums angesehen werden.

Nach der erfolgreichen Biotransformation wurde das Produkt in einem angepassten, mehrstufigen Verfahren aus der Fermentationskultur extrahiert und aufgereinigt. Die Reinigung des produzierten 20α -DHDs war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, sondern wurde von Dr. Andy Zöllner entwickelt und betreut. Die Reinigungsausbeute aus einer Biotransformation im 70 l-Bioreaktor lag zwischen 80 und 85 %, wobei 100 % dem am Ende der Biotransformation in der Kulturflüssigkeit vorhandenen Produkt entsprachen. Etwa 7,5-13 g 20α -DHD wurden aus einer einzelnen Biotransformationskultur aufgereinigt. Somit wurde die Produktausbeute auch durch enorme Verbesserungen im Reinigungsverfahren, welches anfänglich in keiner Weise optimiert wurde, deutlich gesteigert. HPLC- und NMR-Analysen bestätigten eine hohe Produktqualität und eine Produktreinheit von ca. 99 % (Abbildung 51, Anhang B).

4.5 20α -DHP-Produktion

Der neu etablierte, effiziente Produktionsprozess im Pilotmaßstab konnte ohne weitere Anpassungen auch erfolgreich zur Herstellung von 20α -DHP aus dem natürlichen AKR1C1-Substrat Progesteron eingesetzt werden. Dabei war der Fermentationsverlauf in allen die Zellen betreffenden Parametern, also Biomassewachstum, *feeding*, Glucose- und Sauerstoffbedarf vergleichbar mit der 20α -DHD-Produktion (Abbildung 52). Allerdings war die Progesteron-Umsatzrate deutlich geringer als die Produktionsrate für 20α -DHD. Die durchschnittliche 20α -DHP-Produktionsrate betrug etwa 41 $\mu\text{M}/\text{d}$, während bei der 20α -DHD-Produktion unter identischen Bedingungen fast fünffach höhere Biotransformationsraten erreicht wurden. Dies steht im Einklang mit zuvor durch Experimente im MTP- oder Schüttelkolben-Maßstab gewonnenen Daten, wo Dydrogesteron ebenfalls mit deutlich höherer Aktivität umgesetzt wurde als Progesteron. Im Vergleich zur 20α -DHP-Produktion mit JMN8 im 1,5 l-Fermentationsmaßstab (Prozessführung F) ist die Umsatzrate um 76 % und die Produktkonzentration um 53 % geringer (siehe auch Abbildung 54), was wohl hauptsächlich durch die mit 2,9 mM weit höhere Substratkonzentration (2 mM bei Prozessführung F) möglicherweise aber auch durch weitere Unterschiede der Prozessbedingungen zu begründen ist. Das daraus resultierende schlechtere Verhältnis von Produkt zu Substrat wirkte sich wahrscheinlich ungünstig auf die Reinigungseffizienz aus. Mit einem für 20α -DHP angepassten Reinigungsverfahren wurden 3,2 g Produkt mit einer Reinheit von 90 % gewonnen, was 80 % der theoretischen Gesamtproduktmenge entspricht. Es ist damit zu rechnen, dass sich durch den Einsatz geringerer Substratkonzentrationen mit dieser Prozessführung höhere Produktausbeuten erreichen lassen. Im vorliegenden Teil dieser Arbeit sollte jedoch der Produktionsprozess unverändert übertragen werden, um einerseits grundlegende Erkenntnisse über die Möglichkeit der Übertragung des gesamten Prozesses auf ein anderes Substrat zu erlangen und andererseits exemplarisch das kommerziell schwer erhältliche 20α -DHP im Gramm-Maßstab mit möglichst geringem Aufwand zu produzieren. Diese Ziele wurden uneingeschränkt erreicht. Der

hier für die 20 α -DHD-Produktion entwickelte Biotransformationsprozess eignet sich also grundsätzlich auch für den Umsatz anderer AKR1C1-Substrate.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Nach bestem Wissen ist dies die erste biotechnologische Verwendung einer heterolog in der Spalthefe *S. pombe* exprimierten AKR, wobei die humane 20 α -HSD AKR1C1 als Modellenzym gewählt wurde. In einem hochgradig glucoseabhängigen Ganzzell-Biotransformationsprozess wurde sowohl das physiologische Substrat Progesteron als auch das synthetische Progestogen Dydrogesteron an der Ketogruppe zum jeweiligen 20 α -Hydroxyprodukt reduziert. Diese Biotransformationsreaktion war nicht reversibel und höchst stereo- und regio-spezifisch. Andere untersuchte Steroide stellten unter den gegebenen Testbedingungen keine Substrate dar, was auf ein enges Substratspektrum dieses Systems in Bezug auf Steroide hindeutet.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer biotechnologischer Produktionsprozess entwickelt und hinsichtlich hoher Produktausbeuten optimiert. Dieser stellt ein erstes Beispiel für die erfolgreiche biotechnologische Anwendung von Hydroxysteroid-Dehydrogenasen dar, die in *S. pombe* heterolog exprimiert werden. Mit dem neuen zuverlässigen, teil-automatisierten *fed-batch*-Fermentationsprozess im Pilotmaßstab können im Dauerbetrieb verschiedene AKR1C1-Substrate im Gramm-Maßstab effizient und ökonomisch sinnvoll zum jeweiligen an der C-20-Position reduzierten Produkt umgesetzt werden. Darüberhinaus wurde ein effektives und verlässliches Verfahren für die Reinigung von 20 α -DHP von dem von Dr. Andy Zöllner entwickelten 20 α -DHD-Reinigungsverfahren abgeleitet und angewendet. Es ist anzunehmen, dass sich auch dieses Verfahren ohne großen Aufwand auf die Reinigung anderer (steroidaler) Produkte übertragen lässt.

Um die Produktivität dieses Produktionsprozesses zukünftig noch weiter zu steigern kann über verschiedene Verbesserungsmöglichkeiten nachgedacht werden. Zunächst ist grundsätzlich eine weitere Maßstabsvergrößerung der Hoch-Zelldichte-Fermentation bis hin zum industriellen Maßstab möglich. Durch Enzymoptimierung und Stammverbesserung ließe sich die Biotransformationsaktivität möglicherweise zusätzlich erhöhen. Ein naheliegender Punkt für die Stammverbesserung ist sicher die Optimierung der Kofaktor-Regeneration, die als mögliche Einschränkung der Reaktion in Betracht kommt. Darüberhinaus könnte durch verfahrenstechnische Anpassungen in Form einer *feedback*-Steuerung der *feed*-Rate die Biomassekonzentration und damit die Umsatzgeschwindigkeit sicherlich erhöht werden. Allerdings sind all diese Ansätze nur dann sinnvoll, wenn das Problem der Produktinhibierung durch passende technische Maßnahmen gelöst werden kann. Die Aufklärung limitierender Faktoren in dieser Arbeit bietet eine vielversprechende Basis für die weitere Entwicklung dieser Reaktion und gibt wichtige Hinweise für die Verbesserung anderer Steroid-Dehydrogenase-

katalysierter Biotransformationen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die humane AKR1C1, nicht zuletzt aufgrund der hier erreichten völligen Enantiomerenreinheit des Produkts, aus biotechnologischer Sicht zur Steroidmodifizierung interessant ist.

Auch wenn die hier durchgeführte Produktion von 20α -DHD im großtechnischen Maßstab von kommerziellem Interesse war, kann die Reduktion von Progesteron und Dihydrogesteron als grundlegendes Beispiel für die Anwendung von AKRs in diesem System betrachtet werden. Sie eröffnet großartige Möglichkeiten der Spaltheferung als biotechnologisches Produktionssystem für optisch aktive Alkohole, die industriell und kommerziell interessant sind, besonders für humane Metabolite und für Reaktionen, für die kein passendes mikrobielles Enzym bekannt oder verfügbar ist bzw. die chemische Synthese zu aufwändig oder unmöglich ist.

Durch diese Arbeit wurde das Repertoire an Möglichkeiten für biotechnologische Steroidmodifizierungen um ein vielversprechendes System erweitert. Spaltheferer, die rekombinant AKRs exprimieren, könnten in Zukunft erfolgreich biotechnologisch verwendet werden. Damit wäre die biotechnologische Nutzung von gentechnisch veränderten Spaltheferern nicht länger nur auf die Proteinproduktion und die CYP-abhängige Biotransformation beschränkt.

5 Literaturverzeichnis

Adamski J & Jakob FJ (2001) A guide to 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* **171**: 1-4.

Alfa C, Fantes P, Hyams J, McLeod M & Warbrick E (1993) *Experiments with fission yeast. A laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

Backer MH, Jr. (1962) Isopregnenone (Duphaston): a new progestational agent. *Obstet Gynecol* **19**: 724-729.

Bauman DR, Steckelbroeck S & Penning TM (2004) The roles of aldo-keto reductases in steroid hormone action. *Drug News Perspect* **17**: 563-578.

Bauman DR, Rudnick SI, Szewczuk LM, Jin Y, Gopishetty S & Penning TM (2005) Development of nonsteroidal anti-inflammatory drug analogs and steroid carboxylates selective for human aldo-keto reductase isoforms: potential antineoplastic agents that work independently of cyclooxygenase isozymes. *Mol Pharmacol* **67**: 60-68.

Bernhardt R (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol* **124**: 128-145.

Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.

Bohren KM, Grimshaw CE & Gabbay KH (1992) Catalytic effectiveness of human aldose reductase. Critical role of C-terminal domain. *J Biol Chem* **267**: 20965-20970.

Bohren KM, Bullock B, Wermuth B & Gabbay KH (1989) The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *J Biol Chem* **264**: 9547-9551.

Brink LE & Tramper J (1985) Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis. *Biotechnol Bioeng* **27**: 1258-1269.

Brozic P, Smuc T, Gobec S & Rizner TL (2006) Phytoestrogens as inhibitors of the human progesterone metabolizing enzyme AKR1C1. *Mol Cell Endocrinol* **259**: 30-42.

Brys R, Nelles L, van der Schueren E, Silvestre N, Huylebroeck D & Remacle JE (1998) Identical cis-acting elements and related trans-acting factors control activity of nonviral promoter in *Schizosaccharomyces pombe* and mammalian cells. *DNA Cell Biol* **17**: 349-358.

Burczynski ME, Harvey RG & Penning TM (1998) Expression and characterization of four recombinant human dihydrodiol dehydrogenase isoforms: oxidation of trans-7, 8-

dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene to the activated o-quinone metabolite benzo[a]pyrene-7,8-dione. *Biochemistry* **37**: 6781-6790.

Bureik M & Bernhardt R (2007) Steroid hydroxylation. *Modern Biooxidation*, Schmid RD & Urlacher V, ed.^eds., Wiley-VCH, Weinheim.

Bureik M, Lisurek M & Bernhardt R (2002) The human steroid hydroxylases CYP11B1 and CYP11B2. *Biol Chem* **383**: 1537-1551.

Bureik M, Jungbluth A, Drescher R & Wagner P (1997) Human p53 restores DNA synthesis control in fission yeast. *Biol Chem* **378**: 1361-1371.

Bureik M, Hübel K, Dragan C-A, Scher J, Becker H, Lenz N & Bernhardt R (2004) Development of test systems for the discovery of selective human aldosterone synthase (CYP11B2) and 11b-hydroxylase (CYP11B1) inhibitors. Discovery of a new lead compound for the therapy of congestive heart failure, myocardial fibrosis and hypertension. *Mol Cell Endocrinol* **217**: 249-254.

Burke JD & Gould KL (1994) Molecular cloning and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* his3 gene for use as a selectable marker. *Mol Gen Genet* **242**: 169-176.

Chappell TG & Warren G (1989) A galactosyltransferase from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol* **109**: 2693-2702.

Chen D, Toone WM, Mata J, *et al.* (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* **14**: 214-229.

Cheng T, Zhao Y, Li X, *et al.* (2007) Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge. *J Chem Inf Model* **47**: 2140-2148.

Chetrite GS, Thole HH, Philippe JC & Pasqualini JR (2004) Dydrogesterone (Duphaston) and its 20-dihydro-derivative as selective estrogen enzyme modulators in human breast cancer cell lines. Effect on sulfatase and on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17beta-HSD) activity. *Anticancer Res* **24**: 1433-1438.

Crabtree HG (1928) The carbohydrate metabolism of certain pathological overgrowths. *Biochem J* **22**: 1289-1298.

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**: 59-68.

Crosas B, Hyndman DJ, Gallego O, Martras S, Pares X, Flynn TG & Farres J (2003) Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. *Biochem J* **373**: 973-979.

da Fonseca EB, Bittar RE, Carvalho MH & Zugaib M (2003) Prophylactic administration of progesterone by vaginal suppository to reduce the incidence of spontaneous preterm birth in women at increased risk: a randomized placebo-controlled double-blind study. *Am J Obstet Gynecol* **188**: 419-424.

de Jong-Gubbels P, van Dijken JP & Pronk JT (1996) Metabolic fluxes in chemostat cultures of *Schizosaccharomyces pombe* grown on mixtures of glucose and ethanol. *Microbiology* **142**: 1399-1407.

Deyashiki Y, Ogasawara A, Nakayama T, Nakanishi M, Miyabe Y, Sato K & Hara A (1994) Molecular cloning of two human liver 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase isoenzymes that are identical with chlordecone reductase and bile-acid binder. *Biochem J* **299**: 545-552.

Dhagat U, Carbone V, Chung RP, Matsunaga T, Endo S, Hara A & El-Kabbani O (2007) A salicylic acid-based analogue discovered from virtual screening as a potent inhibitor of human 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Med Chem* **3**: 546-550.

Dragan C-A, Hartmann RW & Bureik M (2006) A fission yeast based test system for the determination of IC50 values of anti prostate tumor drugs acting on CYP21. *J Enzyme Inhib Med Chem* **21**: 547-556.

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

Dragan C-A, Blank LM & Bureik M (2006) Increased TCA cycle activity and reduced oxygen consumption during cytochrome P450-dependent biotransformation in fission yeast. *Yeast* **23**: 779-794.

Duport C, Spagnoli R, Degryse E & Pompon D (1998) Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nat Biotechnol* **16**: 186-189.

Ehmer PB, Bureik M, Bernhardt R, Muller 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**: 173-179.

Fiechter A, Fuhrmann GF & Käppeli O (1981) Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv Microb Physiol* **22**: 123-183.

Flynn TG (1982) Aldehyde reductases: monomeric NADPH-dependent oxidoreductases with multifunctional potential. *Biochem Pharmacol* **31**: 2705-2712.

Flynn TG, Green NC, Bhatia MB & el-Kabbani O (1995) Structure and mechanism of aldehyde reductase. *Adv Exp Med Biol* **372**: 193-201.

- Gao F & Daugulis AJ (2009) Bioproduction of the aroma compound 2-phenylethanol in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor system by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Bioeng* **104**: 332-339.
- Gibson CL, Gray LJ, Bath PM & Murphy SP (2008) Progesterone for the treatment of experimental brain injury; a systematic review. *Brain* **131**: 318-328.
- Giga-Hama Y & Kumagai H (1997) *Foreign Gene Expression in Fission Yeast Schizosaccharomyces pombe*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Giga-Hama Y, Tohda H, Okada H, Owada MK, Okayama H & Kumagai H (1994) High-level expression of human lipocortin I in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* using a novel expression vector. *Biotechnology (NY)* **12**: 400-404.
- Griffin LD & Mellon SH (1999) Selective serotonin reuptake inhibitors directly alter activity of neurosteroidogenic enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13512-13517.
- Griffin LD, Conrad SC & Mellon SH (2001) Current perspectives on the role of neurosteroids in PMS and depression. *Int Rev Neurobiol* **46**: 479-492.
- Gruber CJ & Huber JC (2005) The role of dydrogesterone in recurrent (habitual) abortion. *J Steroid Biochem Mol Biol* **97**: 426-430.
- Hakki T & Bernhardt R (2006) CYP17- and CYP11B-dependent steroid hydroxylases as drug development targets. *Pharmacol Ther* **111**: 27-52.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hensing MCM, Vrouvenvelder JS, Hellinga C, Van Dijken JP & Pronk JT (1995) Use of chemostat data for modelling extracellular-inulinase production by *kluyveromyces marxianus* in a high-cell-density fed-batch process. *J Ferment Bioeng* **79**: 54-58.
- Herbert D (1958) Some principles of continuous culture. *Recent Progress in Microbiology*, Tunevall G, ed. eds., p. pp. 381 - 396. Almqvist and Wiksell Stockholm.
- Higaki Y, Usami N, Shintani S, Ishikura S, El-Kabbani O & Hara A (2003) Selective and potent inhibitors of human 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1) that metabolizes neurosteroids derived from progesterone. *Chem Biol Interact* **143-144**: 503-513.
- Honda H, Toyama Y, Takahashi H, Nakazeko T & Kobayashi T (1995) Effective lactic acid production by two-stage extractive fermentation. *J Ferment Bioeng* **79**: 589-593.
- Hould FS, Fried GM, Fazekas AG, Tremblay S & Mersereau WA (1988) Progesterone receptors regulate gallbladder motility. *J Surg Res* **45**: 505-512.

Hyndman D, Bauman DR, Heredia VV & Penning TM (2003) The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem Biol Interact* **143-144**: 621-631.

Ikeda S, Nikaido K, Araki K, Yoshitake A, Kumagai H & Isoai A (2004) Production of recombinant human lysosomal acid lipase in *Schizosaccharomyces pombe*: development of a fed-batch fermentation and purification process. *J Biosci Bioeng* **98**: 366-373.

Ireland LS, Harrison DJ, Neal GE & Hayes JD (1998) Molecular cloning, expression and catalytic activity of a human AKR7 member of the aldo-keto reductase superfamily: evidence that the major 2-carboxybenzaldehyde reductase from human liver is a homologue of rat aflatoxin B1-aldehyde reductase. *Biochem J* **332**: 21-34.

Jansen ML, Krook DJ, De Graaf K, van Dijken JP, Pronk JT & de Winde JH (2006) Physiological characterization and fed-batch production of an extracellular maltase of *Schizosaccharomyces pombe* CBS 356. *FEMS Yeast Res* **6**: 888-901.

Jez JM, Flynn TG & Penning TM (1997) A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem Pharmacol* **54**: 639-647.

Jez JM, Bennett MJ, Schlegel BP, Lewis M & Penning TM (1997) Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem J* **326**: 625-636.

Jin Y & Penning TM (2007) Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 263-292.

Jin Y, Duan L, Lee SH, Kloosterboer HJ, Blair IA & Penning TM (2009) Human cytosolic hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-ketoreductase superfamily catalyze reduction of conjugated steroids: implications for phase I and phase II steroid hormone metabolism. *J Biol Chem* **284**: 10013-10022.

Jones RH, Moreno S, Nurse P & Jones NC (1988) Expression of the SV40 promoter in fission yeast: identification and characterization of an AP-1-like factor. *Cell* **53**: 659-667.

Kaufner NF, Simanis V & Nurse P (1985) Fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* correctly excises a mammalian RNA transcript intervening sequence. *Nature* **318**: 78-80.

Knight LP, Primiano T, Groopman JD, Kensler TW & Sutter TR (1999) cDNA cloning, expression and activity of a second human aflatoxin B1-metabolizing member of the aldo-keto reductase superfamily, AKR7A3. *Carcinogenesis* **20**: 1215-1223.

Kohli J, Hottinger H, Munz P, Strauss A & Thuriaux P (1977) Genetic Mapping in *Schizosaccharomyces pombe* by Mitotic and Meiotic Analysis and Induced Haploidization. *Genetics* **87**: 471-489.

- Kondo KH, Kai MH, Setoguchi Y, *et al.* (1994) Cloning and expression of cDNA of human delta 4-3-oxosteroid 5 beta-reductase and substrate specificity of the expressed enzyme. *Eur J Biochem* **219**: 357-363.
- Laane C, Boeren S, Vos K & Veeger C (1987) Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol Bioeng* **30**: 81-87.
- Lambert JJ, Belelli D, Hill-Venning C & Peters JA (1995) Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trends Pharmacol Sci* **16**: 295-303.
- Landau RL, Bergenstal DM, Lugibihl K & Kascht ME (1955) The metabolic effects of progesterone in man. *J Clin Endocrinol Metab* **15**: 1194-1215.
- Leroy-Lechat F, Wouessidjewe D, Andreux J-P, Puisieux F & Duchêne D (1994) Evaluation of the cytotoxicity of cyclodextrins and hydroxypropylated derivatives *International Journal of Pharmaceutics* **101**: 97-103.
- Lewis MJ, Wiebe JP & Heathcote JG (2004) Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. *BMC Cancer* **4**: 27.
- Losson R & Lacroute F (1983) Plasmids carrying the yeast OMP decarboxylase structural and regulatory genes: transcription regulation in a foreign environment. *Cell* **32**: 371-377.
- Maass D, Gerigk MR, Kreutzer A, Weuster-Botz D, Wubbolts M & Takors R (2002) Integrated L-phenylalanine separation in an E. coli fed-batch process: from laboratory to pilot scale. *Bioprocess Biosyst Eng* **25**: 85-96.
- Maundrell K (1990) nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* **265**: 10857-10864.
- Maundrell K (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**: 127-130.
- McCormack K, McCormack T, Tanouye M, Rudy B & Stuhmer W (1995) Alternative splicing of the human Shaker K+ channel beta 1 gene and functional expression of the beta 2 gene product. *FEBS Lett* **370**: 32-36.
- McDonald IJ & Tsai CS (1989) Continuous culture and intermediary carbon metabolism. *Molecular Biology of the fission yeast*, Nassim A, Young P & Johnson BF, ed.^eds., Academic Press, New York.
- Mead DA, Szczesna-Skorupa E & Kemper B (1986) Single-stranded DNA 'blue' T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. *Protein Eng* **1**: 67-74.
- Megges R, Müller-Frohne M, Pfeil D & Ruckpaul K (1990) Microbial Steroid Hydroxylation Enzymes in Glucocorticoid Production. *Molecular Mechanisms of*

Adrenal Steroidogenesis and Aspects of Regulation and Application, Vol. 3 (Ruckpaul K & Rein H, ed.^eds.), p.^pp. 204-243. Akademie-Verlag, Berlin.

Mendel CM (1989) The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev* **10**: 232-274.

Mindnich R, Moller G & Adamski J (2004) The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* **218**: 7-20.

Moreno S, Sanchez Y & Rodriguez L (1990) Purification and characterization of the invertase from *Schizosaccharomyces pombe*. A comparative analysis with the invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **267**: 697-702.

Moreno S, Klar A & Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**: 795-823.

Müller R (1994) Steroids. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, p. 309. Wiley-VCH.

Nobel S, Abrahmsen L & Oppermann U (2001) Metabolic conversion as a pre-receptor control mechanism for lipophilic hormones. *Eur J Biochem* **268**: 4113-4125.

Oliveira A, Rosa M, Cabral J & Aires-Barros M (1997) Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells and *Rhizomucor mihei* lipase for the production and extractive biocatalysis of ethanol. *Bioproc Eng* **16**: 349-353.

Pajic T, Vitas M, Zigon D, Pavko A, Kelly SL & Komel R (1999) Biotransformation of steroids by the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **15**: 639-645.

Patel M, Bassi AS, Zhu JJ & Gomaa H (2008) Investigation of a dual-particle liquid-solid circulating fluidized bed bioreactor for extractive fermentation of lactic acid. *Biotechnol Prog* **24**: 821-831.

Peltoketo H, Luu-The V, Simard J & Adamski J (1999) 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *J Mol Endocrinol* **23**: 1-11.

Penning T (2004) Introduction and overview of the aldo-keto reductase superfamily. *Aldo-Keto Reductases and Toxicant Metabolism*, (Penning T & Petrash J, ed.^eds.), p.^pp. 3-20. Am Chem Soc, Washington, DC.

Penning TM (1997) Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev* **18**: 281-305.

Penning TM (2003) Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action. *Hum Reprod Update* **9**: 193-205.

Penning TM, Jin Y, Steckelbroeck S, Lanisnik Rizner T & Lewis M (2004) Structure-function of human 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins. *Mol Cell Endocrinol* **215**: 63-72.

Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, *et al.* (2000) Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem J* **351**: 67-77.

Peters FT, Dragan CA, Wilde DR, Meyer MR, Zapp J, Bureik M & Maurer HH (2007) Biotechnological synthesis of drug metabolites using human cytochrome P450 2D6 heterologously expressed in fission yeast exemplified for the designer drug metabolite 4'-hydroxymethyl-alpha-pyrrolidinobutyrophenone. *Biochem Pharmacol* **74**: 511-520.

Peters FT, Dragan CA, Kauffels A, Schwaninger AE, Zapp J, Bureik M & Maurer HH (2009) Biotechnological synthesis of the designer drug metabolite 4'-hydroxymethyl-alpha-pyrrolidinohexanophenone in fission yeast heterologously expressing human cytochrome P450 2D6 - a versatile alternative to multistep chemical synthesis. *J Anal Toxicol* **33**: 190-197.

Peters FT, Dragan CA, Schwaninger AE, Sauer C, Zapp J, Bureik M & Maurer HH (2009) Use of fission yeast heterologously expressing human cytochrome P450 2B6 in biotechnological synthesis of the designer drug metabolite N-(1-phenylcyclohexyl)-2-hydroxyethanamine. *Forensic Sci Int* **184**: 69-73.

Petrik M, Käppeli O & Fiechter A (1983) An Expanded Concept for the Glucose Effect in the Yeast *Saccharomyces uvarum*: Involvement of Short- and Long-term Regulation *J Gen Microbiol* **129**: 43-49.

Piekorz RP, Gingras S, Hoffmeyer A, Ihle JN & Weinstein Y (2005) Regulation of progesterone levels during pregnancy and parturition by signal transducer and activator of transcription 5 and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Endocrinol* **19**: 431-440.

Pirt S (1965) The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proceedings of the Royal Society London* **163B**: 224-231.

Postma E, Verduyn C, Scheffers WA & Van Dijken JP (1989) Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **55**: 468-477.

Remacle JE, Albrecht G, Brys R, Braus GH & Huylebroeck D (1997) Three classes of mammalian transcription activation domain stimulate transcription in *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* **16**: 5722-5729.

Rieger M, Käppeli O & Fiechter A (1989) The Role of Limited Respiration in the Incomplete Oxidation of Glucose by *Saccharomyces cerevisiae* *J Gen Microbiol* **129**: 653-661.

Rizner TL, Smuc T, Ruprecht R, Sinkovec J & Penning TM (2006) AKR1C1 and AKR1C3 may determine progesterone and estrogen ratios in endometrial cancer. *Mol Cell Endocrinol* **248**: 126-135.

Rupprecht R, Reul JM, van Steensel B, *et al.* (1993) Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. *Eur J Pharmacol* **247**: 145-154.

Russell P & Nurse P (1986) *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*: a look at yeasts divided. *Cell* **45**: 781-782.

Rustici G, Mata J, Kivinen K, *et al.* (2004) Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet* **36**: 809-817.

Sakaki T & Inouye K (2000) Practical application of mammalian cytochrome P450. *J Biosci Bioeng* **90**: 583-590.

Sanger F (1981) Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* **214**: 1205-1210.

Schmidt FR (2005) Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 425-435.

Schumacher M, Guennoun R, Robert F, *et al.* (2004) Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm IGF Res* **14 Suppl A**: S18-33.

Serrano-Carreón L, Balderas-Ruíz K, Galindo E & Rito-Palomares M (2002) Production and biotransformation of 6-pentyl-a-pyrone by *Trichoderma harzianum* in two-phase culture systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 170-174.

Stark D, Kornmann H, Munch T, Sonnleitner B, Marison IW & von Stockar U (2003) Novel type of in situ extraction: Use of solvent containing microcapsules for the bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **83**: 376-385.

Steckelbroeck S, Jin Y, Gopishetty S, Oyesanmi B & Penning TM (2004) Human cytosolic 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity: implications for steroid hormone metabolism and action. *J Biol Chem* **279**: 10784-10795.

Stolz A, Hammond L, Lou H, Takikawa H, Ronk M & Shively JE (1993) cDNA cloning and expression of the human hepatic bile acid-binding protein. A member of the monomeric reductase gene family. *J Biol Chem* **268**: 10448-10457.

Straathof AJ, Panke S & Schmid A (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 548-556.

- Suga M & Hatakeyama T (2005) A rapid and simple procedure for high-efficiency lithium acetate transformation of cryopreserved *Schizosaccharomyces pombe* cells. *Yeast* **22**: 799-804.
- Szcebara FM, Chandelier C, Villeret C, *et al.* (2003) Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat Biotechnol* **21**: 143-149.
- Takegawa K, Tohda H, Sasaki M, *et al.* (2009) Production of heterologous proteins using the fission-yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) expression system. *Biotechnol Appl Biochem* **53**: 227-235.
- Ulmschneider S, Muller-Vieira U, Mitrenga M, *et al.* (2005) Synthesis and evaluation of imidazolymethylenetetrahydronaphthalenes and imidazolymethyleneindanes: potent inhibitors of aldosterone synthase. *J Med Chem* **48**: 1796-1805.
- Usami N, Yamamoto T, Shintani S, Ishikura S, Higaki Y, Katagiri Y & Hara A (2002) Substrate specificity of human 3(20)alpha-hydroxysteroid dehydrogenase for neurosteroids and its inhibition by benzodiazepines. *Biol Pharm Bull* **25**: 441-445.
- Van Urk H, Voll WS, Scheffers WA & Van Dijken JP (1990) Transient-State Analysis of Metabolic Fluxes in Crabtree-Positive and Crabtree-Negative Yeasts. *Appl Environ Microbiol* **56**: 281-287.
- Verbelen PJ, De Schutter DP, Delvaux F, Verstrepen KJ & Delvaux FR (2006) Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnol Lett* **28**: 1515-1525.
- Wiebe JP (2005) Role of progesterone metabolites in mammary cancer. *J Dairy Res* **72 Spec No**: 51-57.
- Wiebe JP, Lewis MJ, Cialacu V, Pawlak KJ & Zhang G (2005) The role of progesterone metabolites in breast cancer: potential for new diagnostics and therapeutics. *J Steroid Biochem Mol Biol* **93**: 201-208.
- Wieczorek S & Brauer H (1998) Continuous production of citric acid with recirculation of the fermentation broth after product recovery. Part 1: Continuous production of citric acid *Bioproc Eng* **18**: 1-5.
- Wieczorek S & Brauer H (1998) Continuous production of citric acid with recirculation of the fermentation broth after product recovery. Part 2: Product recovery and recirculation of the fermentation broth. *Bioproc Eng* **18**: 75-77.
- Wood V & Gwilliam R & Rajandream MA, *et al.* (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871-880.
- Woodward RB, Sondheimer F, Taub D, Heusler K & McLamore WM (1952) The total synthesis of steroids. *J Am Chem Soc* **74**: 4223-4251.

Yabannavar V & Wang D (1991) Extractive fermentation for lactic acid production. *Biotechnol Bioeng* **37**: 1095-1100.

Yabannavar VM & Wang DI (1991) Strategies for reducing solvent toxicity in extractive fermentations. *Biotechnol Bioeng* **37**: 716-722.

Zhang D, Shrestha B, Niu W, Tian P & Tan T (2007) Phenotypes and fed-batch fermentation of ubiquinone-overproducing fission yeast using *ppt1* gene. *J Biotechnol* **128**: 120-131.

Zhang Y, Dufort I, Rheault P & Luu-The V (2000) Characterization of a human 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Mol Endocrinol* **25**: 221-228.

Anhang

A cDNA-Sequenz der humanen AKR1C1

Im Folgenden sind die Original- und die für den Zielorganismus *Schizosaccharomyces pombe* optimierte Sequenz angegeben. Die Originalsequenz ist mit "Org:", die optimierte Sequenz mit "Opt:" gekennzeichnet. Wo beide übereinstimmen enthält die Originalsequenz Punkte (".") statt Nukleotide. Wo die Originalsequenz gegen Veränderung gesperrt war enthält sie Unterstriche ("_"). Die Namen der Restriktionsschnittstellen beginnen beim ersten Nukleotid nach dem Schnitt im Vorwärtsstrang.

```

      5      10      15      20      25      30      35      40      45
ORF:      M      D      S      K      Y      Q      C      V      K      L      N      D      G      H      F
Org:      _ _ _ _ _ ..C ..A ... ..G ... ..A ... ..C ..T ..G ..T ...
Opt: CAT ATG GAT TCG AAG TAT CAA TGC GTT AAG CTT AAT GAC GGA CAC TTT
      NdeI

      50      55      60      65      70      75      80      85      90      95
ORF:      M      P      V      L      G      F      G      T      Y      A      P      A      E      V      P      K
Org:      ... ..G ..G ... ..C ... ..C ... ..A ..T ..G ... ..G ... ..G ...
Opt: ATG CCA GTT CTT GGA TTT GGT ACT TAT GCT CCA GCT GAA GTA CCT AAA

      100     105     110     115     120     125     130     135     140
ORF:      S      K      A      L      E      A      T      K      L      A      I      E      A      G      F      R
Org:      ..C ..G ..G C.G ..G ..C ..G ... ..A ..C ... ..G ... ..G ..C ...
Opt: TCG AAA GCC TTA GAA GCT ACA AAA TTG GCA ATT GAA GCA GGT TTT CGT

      145     150     155     160     165     170     175     180     185     190
ORF:      H      I      D      S      A      H      L      Y      N      N      E      E      Q      V      G      L
Org:      ..T ... ..C TC. ..C ..C C.G ... ..A ..G ..G ... ..C T.G
Opt: CAC ATT GAT AGC GCT CAT TTA TAT AAT AAC GAG GAA CAA GTT GGT CTT

      195     200     205     210     215     220     225     230     235     240
ORF:      A      I      R      S      K      I      A      D      G      S      V      K      R      E      D      I
Org:      ..A ..C ..C AG. ... ..C ..G ... ..G ..A ..C ... A.A ..A ... ..G
Opt: GCT ATT CGT TCC AAA ATT GCT GAT GGA TCT GTT AAA CGT GAG GAT ATC

      245     250     255     260     265     270     275     280     285
ORF:      F      Y      T      S      K      L      W      C      N      S      H      R      P      E      L      V
Org:      ... ..T ... AGT ..G ..G ... ..C ... ..G ... ..C ..G C.C ..T
Opt: TTC TAC ACC TCC AAA CTA TGG TGT AAT AGT CAT CGT CCT GAA TTA GTA

      290     295     300     305     310     315     320     325     330     335
ORF:      R      P      A      L      E      R      S      L      K      N      L      Q      L      D      Y      V
Org:      C.T ..G ..A C.G ..A ..C TCG ..G ..A ... ..G ... C.. ... ..G
Opt: AGA CCT GCT TTA GAG CGT AGT CTT AAG AAC CTA CAA TTG GAC TAT GTG

      340     345     350     355     360     365     370     375     380
ORF:      D      L      Y      L      I      H      F      P      V      S      V      K      P      G      E      E
Org:      ..T ... ..T ..C ... ..C ..C ... ..G ..T ... ..A ..T ... ..G
Opt: GAC TTG TAC CTG ATT CAT TTT CCT GTT TCA GTC AAA CCT GGC GAA GAA

```

```

385 390 395 400 405 410 415 420 425 430
ORF: V I P K D E N G K I L F D T V D
Org: ... ..T ..G ..A ..C ... ..C ... ..T ... ..T ..T ..C ... ..C
Opt: GTG ATA CCA AAG GAT GAA AAT GGT AAA ATC CTG TTC GAC ACG GTT GAT

435 440 445 450 455 460 465 470 475 480
ORF: L C A T W E A V E K C K D A G L
Org: C.G ... ..G ... ..C ... ..T ..G ..A ... ..G ..C ..G ..C C..
Opt: TTA TGT GCT ACT TGG GAA GCA GTT GAG AAA TGT AAA GAT GCA GGT TTG

485 490 495 500 505 510 515 520 525
ORF: A K S I G V S N F N R R Q L E M
Org: ..G ... ..A ..C ... ..C TCT ... ..T ..C ..G ..C ... ..C
Opt: GCC AAA TCT ATT GGA GTA AGC AAC TTT AAT CGA CGT CAA CTG GAA ATG

530 535 540 545 550 555 560 565 570 575
ORF: I L N K P G L K Y K P V C N Q V
Org: ..T ..A ... ..A ..C ... T.G ..G ..T ... ..A ..A ..C ..C ..G ..C
Opt: ATC TTG AAT AAG CCT GGC CTT AAA TAC AAA CCC GTG TGT AAT CAA GTT

580 585 590 595 600 605 610 615 620
ORF: E C H P Y F N Q R K L L D F C K
Org: ... ..C ... ..G ... ..T ..G C.C ... T.A C.. ..T ..T ... ..A
Opt: GAA TGT CAT CCC TAC TTC AAC CAA AGG AAA CTT TTG GAC TTC TGC AAG

625 630 635 640 645 650 655 660 665 670
ORF: S K D I V L V A Y S A L G S H R
Org: AGT ..A ..T ..C ..A C.T ..G ... ..G ... ..A C.G ..C AGC ... ..T
Opt: TCA AAG GAC ATT GTT TTG GTA GCC TAT TCT GCT TTA GGT TCT CAT CGA

675 680 685 690 695 700 705 710 715 720
ORF: E E P W V D P N S P V L L E D P
Org: ... ..G ..G ... ..C ..C ..C ... AGC ..A ..A C.G T.. ..G ... ..G
Opt: GAA GAA CCT TGG GTT GAT CCT AAT TCT CCT GTC TTA CTA GAA GAT CCA

725 730 735 740 745 750 755 760 765
ORF: V L C A L A K K H K R T P A L I
Org: ... C.T ..T ..G C.T ..C ..A ..G ..C ..G A.A ..A ..G ..A ..C ...
Opt: GTA TTA TGC GCC TTA GCT AAG AAA CAT AAA CGT ACT CCT GCT CTG ATT

770 775 780 785 790 795 800 805 810 815
ORF: A L R Y Q L Q R G V V V L A K S
Org: ... ..G ... ..C ... ..G ... C.T ..T ... ..G ... C.T ..C ... ..T
Opt: GCT TTA CGT TAT CAA CTA CAA AGG GGA GTT GTC GTT TTA GCT AAG TCA

820 825 830 835 840 845 850 855 860
ORF: Y N E Q R I R Q N V Q V F E F Q
Org: ... ..A ... C.G ..T ..C ..A ... ..G ..G ... ..G ..T ...
Opt: TAT AAC GAG CAG AGA ATA CGT CAG AAT GTC CAA GTC TTT GAA TTC CAG

865 870 875 880 885 890 895 900 905 910
ORF: L T S E E M K A I D G L N R N V
Org: ... ..G ..A ... ..A ... ..A ..T ..C ..C ... C.G ..C ..G ..T ...
Opt: TTA ACC TCT GAA GAG ATG AAG GCA ATA GAT GGT TTA AAT CGA AAC GTG

915 920 925 930 935 940 945 950 955 960
ORF: R Y L T L D I F A G P P N Y P F
Org: ..T ... C.. ... C.G ... ..T ... ..T ... ..T ..G ... ..C ..G ...
Opt: CGC TAC TTG ACA TTA GAT ATC TTT GCA GGT CCA CCT AAT TAT CCC TTT

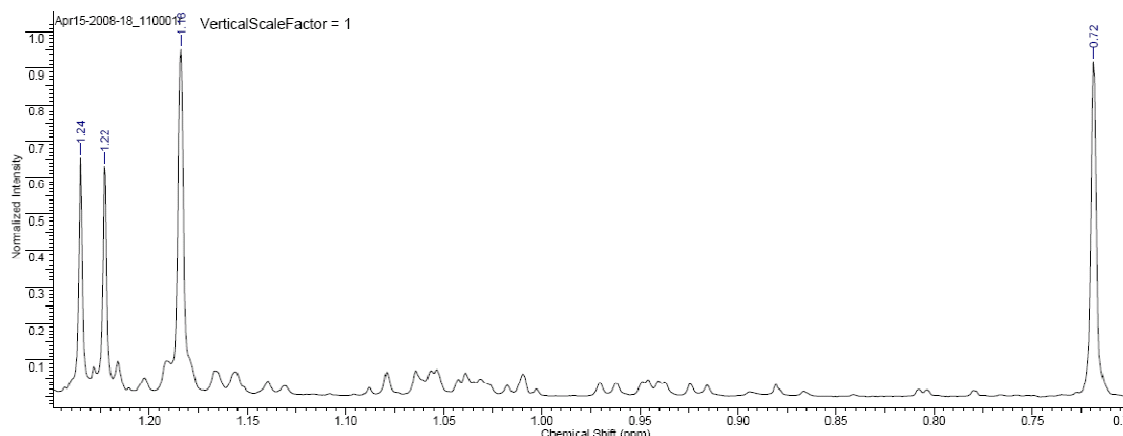
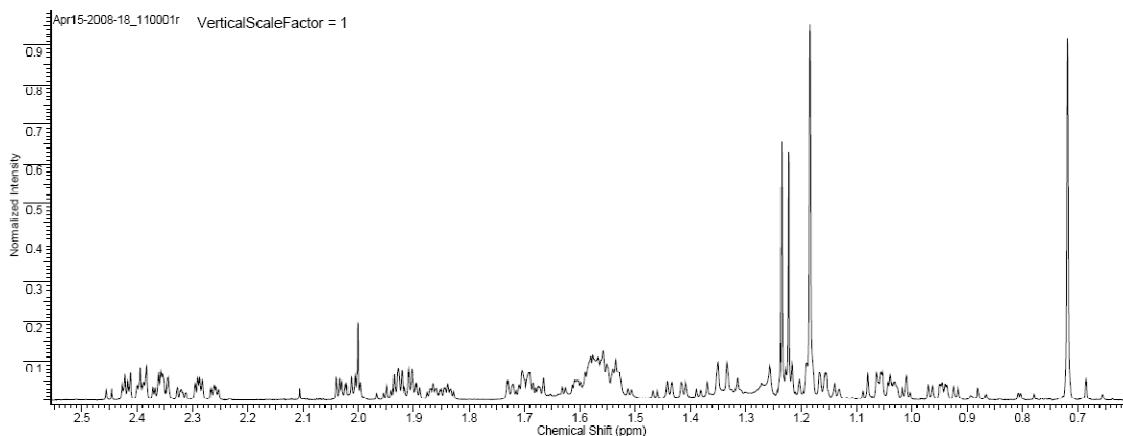
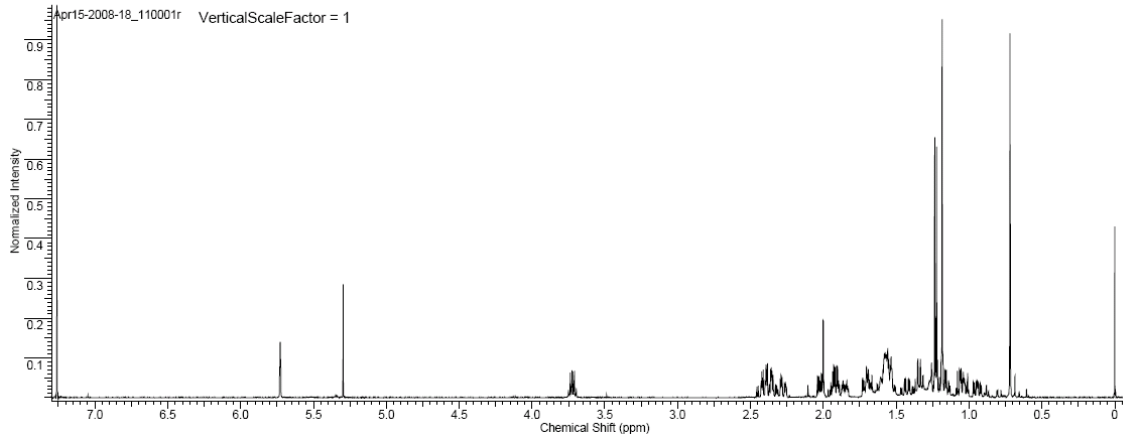
965 970 975 980
ORF: S D E Y !
Org: TC. ... ..C .G.
Opt: AGT GAT GAA TAT TAA GGATC C
BamHI

```

B NMR-Spektren

NMR-Spektren von 20 α -DHP

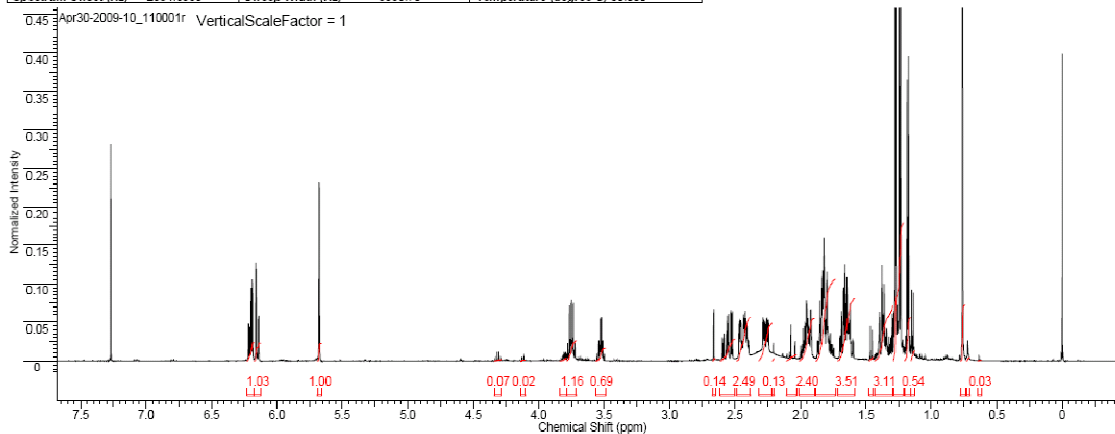
Acquisition Time (sec)	3.2768	Comment	Batch 20 α -OH-Progesteron von POMBIOTECH	Date	15 Apr 2008 11:20:32
Date Stamp	15 Apr 2008 11:20:32	File Name	\\HAFS52\Spectra\Hannover\NMR_spectra\data\OpenAccess\nmr\Apr15-2008-18_110001r	Origin	spect
Frequency (MHz)	500.50	Nucleus	¹ H	Number of Transients	16
Original Points Count	32768	Owner	de51419	Points Count	32768
Receiver Gain	406.00	SW(cyclical) (Hz)	10000.00	Solvent	CHLOROFORM-d
Spectrum Offset (Hz)	2990.4827	Sweep Width (Hz)	9999.70	Temperature (degree C)	30.000



No.	Color	Structure	Visible	No.	(ppm)	(Hz)	Height
1			True	1	0.72	359.7	0.9172
				2	1.18	592.6	0.9520
				3	1.22	617.1	0.6316
				4	1.24	618.2	0.6554

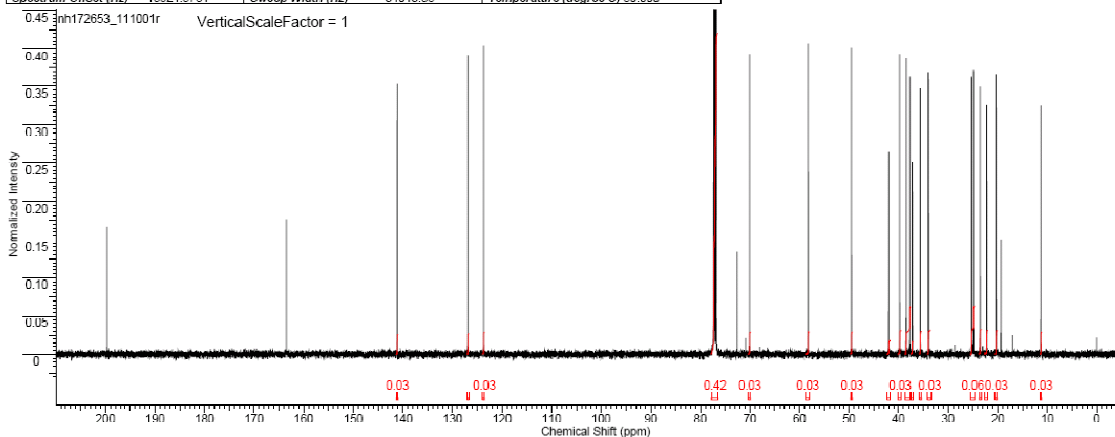
NMR-Spektren von 20 α -DHD

Acquisition Time (sec)	3.2768	Comment	Batch HKOS0239-001-A	Date	30 Apr 2009 10:01:36
Date Stamp	30 Apr 2009 10:01:36	File Name	WHAFS521Spectra	Origin	HannoverNMR_spectra\data/openAccess/nmr/Apr30-2009-10_110001r
Frequency (MHz)	500.50	Nucleus	¹ H	Number of Transients	16
Original Points Count	32768	Owner	de51419	Points Count	32768
Receiver Gain	161.00	SW (cycles) (Hz)	10000.00	Solvent	CHLOROFORM-d
Spectrum Offset (Hz)	2994.6968	Sweep Width (Hz)	9999.70	Temperature (degree C)	30.000



No.	(ppm)	Value	Absolute Value	Non-Negative Value
10	6.17	0.64	0.3075842	0.3075842
20	7.06	0.73	1.00788400e+8	0.18680143
30	7.408	0.773	1.6641855	3.16641855
41	12.76	1.15	54000247	0.54000247
51	15.86	1.202	47313476	1.33437568e+9
61	12.46	1.237	83341361	4.22650522e+9
71	12.90	1.433	11153769	1.67882496e+9
81	14.55	1.470	10561295	1.00147152e+0
91	18.58	1.743	50764799	1.89254554e+9
101	17.32	1.884	61318636	2.48903706e+9
111	19.18	2.002	40044832	1.29515789e+9
122	3.14	2.10	34019807	1.83553296e+8
132	2.017	2.210	13281836	7.16619200e+7
142	2.189	2.310	10751486	1.13710605e+9
152	2.837	2.430	48992419	1.34343437e+9
162	2.608	2.610	24205887	6.70150784e+8
172	2.508	2.670	13597773	7.33665520e+7
183	4.888	3.560	69134909	3.73016224e+8
193	7.120	3.780	15963078	6.25676864e+8
203	7.869	3.830	14787272	7.97844720e+7
214	10.15	4.130	02126613	1.14741060e+7
224	2.877	4.330	07194415	3.88173440e+7
235	5.590	5.680	99973583	5.39405824e+8
246	12.52	6.170	03110456	5.56330752e+8
256	17.78	6.210	05857444	5.71152064e+8

Acquisition Time (sec)	0.9634	Comment	HKOS0239-001/Messinger/172653	Date	16 May 2009 02:27:12
Date Stamp	16 May 2009 02:27:12	File Name	WHAF521Spectra	Origin	HannoverNMR_spectra\data/spectra/nmr/172653_111001r
Frequency (MHz)	125.85	Nucleus	¹³ C	Number of Transients	1433
Original Points Count	32768	Owner	de51419	Points Count	131072
Receiver Gain	11500.00	SW (cycles) (Hz)	34013.61	Solvent	CHLOROFORM-d
Spectrum Offset (Hz)	13921.5781	Sweep Width (Hz)	34013.35	Temperature (degree C)	30.000



No.	(ppm)	Value	Absolute Value	Non-Negative Value
111	17.30	11.4	0.2916924	1.54701668e+9
201	18.18	20.0	0.3132132	1.66210317e+9
32	20.46	22.0	0.3137252	1.66481997e+9
83	20.02	23.0	0.3238695	1.71865216e+9
24	7.06	25.0	0.6362990	3.37859571e+9
83	5.11	34.0	0.3156325	1.67494131e+9
25	8.28	35.0	0.3007856	1.59615437e+9
87	7.57	37.0	0.1739002	9.22821824e+8
87	8.09	38.0	0.6287258	3.33640781e+9
109	19.44	40.0	0.3075756	1.63218650e+9
41	7.502	42.0	0.1809282	9.60118672e+8
119	3.66	49.0	0.2949583	1.56523123e+9
138	1.183	58.0	0.2971286	1.57674803e+9
159	2.026	70.0	0.2876839	1.52662861e+9
186	4.680	77.0	0.42174405	2.23803474e+10
183	5.308	123.0	0.2907671	1.54298982e+9
126	7.310	127.0	0.2716224	1.44139622e+9
180	17.74	141.0	0.2586041	1.37231322e+9

C Entwicklung der Prozessführungs- und *feeding*-Strategien im zeitlichen Verlauf

Methoden	Prozessführung	<i>feeding</i>	Manuelle Nachregelung
A	Bioreaktor: Biostat M Substrat: Dydrogesteron Substratmenge: 312.45 mg Substratzugabe: nach 24 h Stamm: JMN8 Belüftungsrate: 2 l/min Medium: EMM Startvolumen: 1 l Biomasseanzucht: 10 ml 1 d, 100 ml 1 d Prozesslaufzeit: 142 h	<i>feed</i> : 40 % Glucose <i>feeding</i> : manuell je 50 ml nach 24 h und 48 h	
B	Bioreaktor: Biostat Substrat: Dydrogesteron Substratmenge: 1562 mg Substratzugabe: bei Prozessbeginn Stamm: JMN8 Belüftungsrate: 9 l/min, nach 24 h auf 2 l/min Medium: EMM Startvolumen: 9 l Biomasseanzucht: 10 ml 1 d, 100 ml 1 d, 1 l 1 d Prozesslaufzeit: 68 h	<i>feed</i> : 60 % Glucose <i>feeding</i> : manuell je 330 ml nach 19 h und 43 h	
C	Bioreaktor: Biostat Substrat: Dydrogesteron Substratmenge: 218 mg Substratzugabe: bei Prozessbeginn Stamm: CAD302 Belüftungsrate: 2 l/min Medium: EMM mit 50 g/l Glucose Startvolumen: 0.7 l Biomasseanzucht: 10 ml 1 d, 100 ml 1 d, 400 ml 1 d Prozesslaufzeit: 50 h	<i>feed</i> : 60 % Glucose <i>feeding</i> : manuell 30 ml nach 21 h	
D	Bioreaktor: Biostat Substrat: Dydrogesteron Substratmenge: 315 mg Substratzugabe: bei Prozessbeginn Stamm: CAD302 Belüftungsrate: 2 l/min Medium: EMM Startvolumen: 0.6 l Biomasseanzucht: 10 ml 2 d, 100 ml 2 d, 400 ml 4 d Prozesslaufzeit: 116 h	<i>feed</i> : FM1 <i>feeding</i> : automatisch geregelt a = 15 b = 1 c = 0.05 μ_{max} : 0.06 Y _{Xg} : 0.33 g/g M: 0.02 g/g*h X ₀ : 2.5 g/l V ₀ : 0.6 l <i>feeding</i> -Startzeitpunkt: 8 h <i>feed</i> -Pumpen-Flussrate: 1.66 ml/min	
E	Bioreaktor: Biostat Substrat: Dydrogesteron Substratmenge: 315 mg Substratzugabe: bei Prozessbeginn Stamm: CAD302 Belüftungsrate: 3 l/min Medium: DM1 Startvolumen: 0.5 l Biomasseanzucht: 10 ml 1 d, 100 ml 1 d, 400 ml 5 d Prozesslaufzeit: 50 h	<i>feed</i> : FM1 <i>feeding</i> : automatisch geregelt a = 15 b = 1 c = 0.05 μ_{max} : 0.06 Y _{Xg} : 0.33 g/g M: 0.02 g/g*h X ₀ : 2.5 g/l V ₀ : 0.5 l <i>feeding</i> -Startzeitpunkt: 0 h <i>feed</i> -Pumpen-Flussrate: 1.66 ml/min	nach 41 h c = 0.06
F	Bioreaktor: Biostat Substrat: Progesteron Substratmenge: 315 mg Substratzugabe: bei Prozessbeginn Stamm: JMN8 Belüftungsrate: 3 l/min Medium: DM1 Startvolumen: 0.5 l Biomasseanzucht: 10 ml 1 d, 100 ml 1 d, 1 l 1 d Prozesslaufzeit: 70 h	<i>feed</i> : FM1 <i>feeding</i> : automatisch geregelt a = 15 b = 1 c = 0.05 μ_{max} : 0.06 Y _{Xg} : 0.33 g/g M: 0.02 g/g*h X ₀ : 2.5 g/l V ₀ : 0.5 l <i>feeding</i> -Startzeitpunkt: 0 h <i>feed</i> -Pumpen-Flussrate: 1.66 ml/min	nach 24 h c = 0.06 nach 31 h c = 0.067
G	Bioreaktor: Pilot	<i>feed</i> : FM1	nach 36 h konstantes <i>feeding</i>

	<p>Substrat: Dydrogesteron Substratmenge: 25 g Substratzugabe: nach 21 h Stamm: CAD302 Belüftungsrate: 9 l/min Medium: DM1 mit 4 g/l Glucose Startvolumen: 22 l Biomasseanzucht: 40 ml 1 d, 400 ml 1 d, 4 l 3 d Prozesslaufzeit: 156 h</p>	<p><i>feeding</i>: automatisch geregelt/konstant $a = 15$ $b = 1$ $c = 0.035$ $\mu_{\max}: 0.06$ $YXg: 0.33 \text{ g/g}$ $M: 0.02 \text{ g/g}^*h$ $X0: 0.7 \text{ g/l}$ $V0: 22 \text{ l}$ <i>feeding</i>-Startzeitpunkt: 0 h <i>feed</i>-Pumpen-Flussrate: 50 ml/min</p>	<p>nach 36 h $F = 266.4 \text{ ml/h}$ nach 45 h $F = 133.2 \text{ ml/h}$ nach 93 h $F = 120 \text{ ml/h}$ nach 108 h $F = 60 \text{ ml/h}$ nach 132 h $F = 30 \text{ ml/h}$</p>
H	<p>Bioreaktor: Pilot Substrat: Dydrogesteron Substratmenge: 17.5 g Substratzugabe: nach 23 h Stamm: CAD302 Belüftungsrate: 9-12 l/min Medium: DM1 mit 4 g/l Glucose Startvolumen: 22 l Biomasseanzucht: 60 ml 1 d, 600 ml 1 d, 6 l 3 d Prozesslaufzeit: 160 h</p>	<p><i>feed</i>: 2xFM1 <i>feeding</i>: automatisch geregelt/konstant $a = 15$ $b = 1$ $c = 0.035$ $\mu_{\max}: 0.06$ $YXg: 0.33 \text{ g/g}$ $M: 0.02 \text{ g/g}^*h$ $X0: 1.2 \text{ g/l}$ $V0: 22 \text{ l}$ <i>feeding</i>-Startzeitpunkt: 0 h <i>feed</i>-Pumpen-Flussrate: 50 ml/min</p>	<p>nach 42 h konstantes <i>feeding</i> nach 42 h $F = 120 \text{ ml/h}$ nach 46 h $F = 96 \text{ ml/h}$ nach 51 h $F = 60 \text{ ml/h}$ nach 73 h $F = 57 \text{ ml/h}$ nach 89 h Belüftungsrate 12 nach 99 h $F = 51 \text{ ml/h}$ nach 113 h $F = 42 \text{ ml/h}$ nach 121 h $F = 39 \text{ ml/h}$ nach 137 h $F = 30 \text{ ml/h}$</p>
I	<p>Bioreaktor: Pilot Substrat: Dydrogesteron Substratmenge: 20 g Substratzugabe: nach 25 h Stamm: CAD302 Belüftungsrate: 9-35 l/min Medium: DM1 mit 4 g/l Glucose Startvolumen: 22 l Biomasseanzucht: 80 ml 1 d, 800 ml 1 d, 8 l 3 d Prozesslaufzeit: 160 h</p>	<p><i>feed</i>: 2xFM1 / 60% Glucose <i>feeding</i>: automatisch geregelt/konstant $a = 15$ $b = 1$ $c = 0.035$ $\mu_{\max}: 0.06$ $YXg: 0.33 \text{ g/g}$ $M: 0.02 \text{ g/g}^*h$ $X0: 1.4 \text{ g/l}$ $V0: 22 \text{ l}$ <i>feeding</i>-Startzeitpunkt: 0 h <i>feed</i>-Pumpen-Flussrate: 50 ml/min</p>	<p>nach 42 h konstantes <i>feeding</i> nach 42 h $F = 102 \text{ ml/h}$ nach 51 h Belüftungsrate 12 nach 51 h $F = 108 \text{ ml/h}$ nach 70 h Belüftungsrate 18 nach 70 h $F = 102 \text{ ml/h}$ nach 89 h Belüftungsrate 26 nach 89 h <i>feed</i> = 60% Glucose nach 89 h $F = 54 \text{ ml/h}$ nach 96 h Belüftungsrate 30 nach 96 h $F = 55.8 \text{ ml/h}$ nach 113 h Belüftungsrate 35 nach 113 h $F = 60 \text{ ml/h}$ nach 120 h $F = 72 \text{ ml/h}$ nach 144 h $F = 21 \text{ ml/h}$</p>
J	<p>Bioreaktor: Pilot Substrat: Progesteron Substratmenge: 20 g Substratzugabe: nach 24 h Stamm: CAD302 Belüftungsrate: 9-35 l/min Medium: DM1 mit 4 g/l Glucose Startvolumen: 22 l Biomasseanzucht: 80 ml 1 d, 800 ml 1 d, 8 l 3 d Prozesslaufzeit: 161 h</p>	<p><i>feed</i>: 2xFM1 / 60% Glucose <i>feeding</i>: automatisch geregelt/konstant $a = 15$ $b = 1$ $c = 0.035$ $\mu_{\max}: 0.06$ $YXg: 0.33 \text{ g/g}$ $M: 0.02 \text{ g/g}^*h$ $X0: 1.4 \text{ g/l}$ $V0: 22 \text{ l}$ <i>feeding</i>-Startzeitpunkt: 0 h <i>feed</i>-Pumpen-Flussrate: 50 ml/min</p>	<p>nach 44 h konstantes <i>feeding</i> nach 51 h Belüftungsrate 12 nach 51 h $F = 126 \text{ ml/h}$ nach 67 h Belüftungsrate 15 nach 67 h $F = 114 \text{ ml/h}$ nach 76 h $F = 102 \text{ ml/h}$ nach 93 h Belüftungsrate 26 nach 93 h <i>feed</i> = 60% Glucose nach 93 h $F = 48 \text{ ml/h}$ nach 99 h $F = 36 \text{ ml/h}$ nach 118 h Belüftungsrate 35 nach 137 h Belüftungsrate 26 nach 142 h Belüftungsrate 30 nach 142 h $F = 21 \text{ ml/h}$ nach 145 h $F = 27 \text{ ml/h}$</p>

D Chemikalien und Labormaterialien

Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Agarose <i>for routine use</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Ampicillin Na-Salz für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Bacto™ Tryptone	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Bacto™ Yeast Nitrogen Base	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
BSA	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
dNTPs	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Glucosemonohydrat 99,5 %	Fagron GmbH & Co. KG (Barsbüttel)
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Kieselgel 60 (35-70 µM Körnung)	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)
Lachssperma-DNA	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
Seesand, gereinigt u. gegläht	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
SmartLadder	Eurogentech (Seraing, Belgien)

Die verwendeten Feinchemikalien wurden soweit nicht anders angegeben von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz) bezogen und waren von höchster Reinheit.

E Geräte

Brutschrank BD115	Binder GmbH (Tuttlingen)
MTPs, 2 ml Volumen	neoLab Migge Laborbedarfs-Vertriebs GmbH (Heidelberg, Best.-Nr. 7-9704)
Elektrophoresekammern PerfectBlue Midi S und Midi M	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Elektrophorese-Stromversorgung EV243	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Gel-Dokumentationssystem Felix 1010, PC- gesteuert mit Digitalkamera	biostep GmbH (Jahnsdorf)
HPLC Waters 260 <i>separation module</i>	Waters (Milford, MA, USA)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, IL, USA)
Rotationsschüttler Infors HT Multitron Standard	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
Rotationsschüttler, innova 4230	New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA)
Spektralphotometer Gene Quant II	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
UV-Transilluminator UST-20M-8K	biostep GmbH (Jahnsdorf)
Vortex-Gerät/MTP-Schüttler IKA MS3 digital	IKA Werke GmbH & Co. KG (Staufen)
Zentrifuge Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen)
Zentrifuge Universal 32R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt...

...meinem Doktorvater PD Dr. Matthias Bureik für die Möglichkeit, diese Arbeit in der PomBioTech GmbH unter besten Bedingungen anfertigen zu können sowie für das Vertrauen, dass er mir (nicht nur) für diese interessante und verantwortungsvolle Aufgabe entgegengebracht hat. Ich danke ihm für seine ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft im Verlauf dieser Arbeit, aber auch ganz besonders für sein „Herzblut“, das er in die Förderung meiner persönlichen Entwicklung investiert hat. Vielen lieben Dank Matthias! Das alles werde ich dir niemals vergessen.

...Prof. Dr. Elmar Heinzle für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

...Dr. Josef Messinger von der Solvay Pharmaceuticals GmbH für die hervorragende Kooperation, das Anfertigen von NMR-Analysen und für seine freundliche Unterstützung bei dem Vorhaben, dieses Projekt für meine Promotion zu nutzen. Danke für das stetige Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die sehr informativen fachlichen Unterhaltungen.

...meinen Kollegen Dipl.-Biol. Călin-Aurel Drăgan und Dr. Andy Zöllner für die erfolgreiche Zusammenarbeit im „Dydro-Projekt“ und die fruchtbaren Diskussionen sowie die unzähligen guten Ideen und Ratschläge bei den vielfältigsten Problemen. Ihr seid damit eine unverzichtbare Hilfe für mich gewesen.

...meinem „Masteranten“ Jan Bechmann, der hervorragende Leistungen erbracht hat und damit zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen hat.

...dem gesamten *Pombe*-Team für die vielfältige Unterstützung und die freundschaftliche, motivierende Arbeitsumgebung. Ich danke euch für die großartige Laborzeit und das angenehme Arbeitsklima.

Des Weiteren danke ich...

...meinem (zukünftigen) Mann Micha Arnold für seine liebevolle Unterstützung in jeder Hinsicht und seine Geduld, mir die Geschichte vom hohen, hohen Berg mit den vielen, vielen kleinen Stufen wieder und wieder zu erzählen. Ich weiß nicht, wie ich dir dafür danken kann, dass du immer an mich glaubst und mich machen lässt.

...meinen ehemaligen Kommilitonen Petra Frieß, Kerstin Hirschfelder, Helge Hussong und Michael Ensminger, die mich auf diesem Weg immer begleitet haben, dafür, dass sie mich so gut kennen und mich so nehmen, wie ich bin. Bessere Freunde als euch kann man nicht finden.

...allen anderen Freunden und Bekannten, die mich bis hierhin begleitet haben und sich für meine Fortschritte interessiert haben, die offene Ohren hatten und für Ablenkung sorgten und damit auf vielfältige Weise auch ihren Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatten.

Mein größter Dank gilt meiner ganzen Familie, besonders meinen Eltern Renate und Theo Naumann sowie meiner Schwester Petra Ballin, die immer hinter mir steht. Für ihr Verständnis, die vielfältige Hilfe, das Mitfreuen und das Mitleiden. Ihrer unendlichen Geduld, Aufopferung und Liebe verdanke ich all die Möglichkeiten, die mich bis hierhin geführt haben. Ihr habt mich zum selbständigen Denken und Handeln ermutigt, mich meinen eigenen Weg finden und auch gehen lassen und habt mich dabei in meinen Entscheidungen stets unterstützt. Ich bin stolz auf euch. Was wäre ich ohne euch? Danke.