

**Etablierung einer Biotransformation zur
stereoselektiven Hydroxylierung der
Sulfonylharnstoffe Glimepirid und Glibenclamid
sowie von Vitamin D₃ mit CYP105A1**

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

von

Michael W. Kleser

Saarbrücken

2011

Tag des Kolloquiums: 22.12.2011

Dekan: Prof. Dr. W. F. Maier

**Berichterstatter: Prof. Dr. R. Bernhardt
Prof. Dr. P. Bauer**

Vorsitz: Prof. Dr. U. Müller

Akad. Mitarbeiter: Dr. B. Diesel

Danksagung

Frau Prof. Dr. Rita Bernhardt danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihrem Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Frau Katherina Bompais und Herrn Wolfgang Reinle seien für die vielen hilfreichen Hinweise und ihre ständige Hilfsbereitschaft gedankt.

Frau Gabi Schon möchte ich für die Unterstützung in vielen organisatorischen Angelegenheiten danken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sei darüber hinaus für das angenehme Arbeitsklima gedankt.

Herrn Dr. Frank Hannemann, Herrn Michael Ringle und Frau Sabrina Bleif danke ich für die kompetente Einarbeitung in die HPLC-Analytik, sowie der Ratschläge bei „chemischen“ Angelegenheiten.

Herrn Adrian Gerber gilt mein besonderer Dank für die hervorragende und produktive Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenz und Frau Jutta Ganz (Institut für Makromolekulare Chemie / Universität des Saarlandes) möchte ich für die Einweisung in das Feld der Cyclodextrine danken.

Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn (TU Braunschweig) danke ich für die Bereitstellung des *Bacillus megaterium*-Stammes MS941 und das zugehörige Expressionsplasmid.

Vielen Dank an Herrn Dr. Josef Zapp für die Strukturaufklärung der Sulfonylharnstoff-Derivate.

Herrn Priv. Doz. Dr. Michael Hutter danke ich für die Durchführung der Docking-Experimente.

Ein besonders großer Dank gilt meinen Eltern Ulrike und Peter sowie meinem Zwillingenbruder Peter, die mich in jeglicher Weise während dieses Promotionsvorhabens unterstützt haben.

Kerstin Ewen, Peter U. Kleser, Marieke Schneider und Peter Kleser danke ich für das Korrekturlesen des Manuskriptes.

Besonders möchte ich Thomas Jung, Helmut Köhler, Susanne Kiefer, Alexander Scholl, Daniel Buwen, Tobias Schilling, Michaela Schon, Anja Kinsinger, Maria Thiel, Christian Ewald, Benjamin Theis, Tobias Kehrein, Thomas Feid, Jaqueline Werdehausen möchte ich für die stetige moralische Unterstützung danken.

Des Weiteren möchte ich dem kompletten Team der Station 94/95 im Klinikum Saarbrücken für die gute Zusammenarbeit über all die Jahre danken sowie für die großartige Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion.

Ein großes Dankeschön auch an das Bundesministerium für Bildung und Forschung aus dessen diese Arbeit Fond finanziert wurde.

I	Verwendete Abkürzungen:	1
II	Proteinogene Aminosäuren	3
III	Zusammenfassung	4
IV	Summary	5
1.	Einleitung.....	6
1.1.	Cytochrome P450	6
1.1.1.	Allgemeine Einteilungskriterien und Nomenklatur.....	6
1.1.2.	Reaktionen der P450-Enzyme	7
1.1.3.	Einteilung der Cytochrome P450 nach ihrer Elektronentransportkette.....	8
1.2.	CYP105A1	10
1.3.	Alternatives Redoxsystem: Etp1 ^{fd} (516-618) und Arh1.....	13
1.4.	Ausgewählte Substrate für die Umsetzung mit CYP105A1.....	14
1.4.1.	Sulfonylharnstoffe	14
1.4.2.	Vitamin D	18
1.5.	Ganzzellbiotransformation.....	20
1.5.1.	Anforderungen an heterologe, Cytochrom P450-exprimierende Ganzzellsysteme.....	20
1.5.2.	Anforderung niedermolekularer Substrate an die Zellwandbeschaffenheit	20
1.5.3.	<i>Bacillus megaterium</i>	21
1.5.4.	Cyclodextrine	23
1.5.5.	Saponine.....	25
1.5.6.	Batch-Kultivierung.....	27
1.6.	Aufgabenstellung	28
2.	Material und Methoden	30
2.1.	Materialien.....	30
2.1.1.	Chemikalien	30
2.1.2.	Restriktionsendonukleasen, Enzyme und Antikörper.....	32
2.1.3.	Kits	33
2.1.4.	Synthesegene und Primer.....	33
2.1.5.	Bakterienstämme	34
2.1.6.	Säulenmatrices	34
2.1.7.	Puffer, Medien, Gele und Lösungen	35
2.1.8.	Geräte	39
2.2.	Molekularbiologische Methoden.....	41
2.2.1.	PCR	41
2.2.2.	Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration	41
2.2.3.	Restriktionsverdau	42
2.2.4.	Ligation	42
2.2.5.	TOPO-Klonierung	42
2.2.6.	Mutationsreversion des optimierten Genes CYP105A1 (R84A/R73V).....	42
2.2.7.	Klonierung von CYP105A1 (R84A/R73V) für <i>in vitro</i> -Studien	43
2.2.8.	Plasmidpräparation	43
2.2.9.	DNA-Agarosegelelektrophorese	44
2.2.10.	DNA-Sequenzierung	44
2.3.	Mikrobiologische Methoden.....	45

2.3.1. Wachstumsmessung von Bakterien.....	45
2.3.2. Transformation von kompetenten Bakterienzellen.....	45
2.4. Proteinbiochemische Methoden.....	47
2.4.1. Expression von CYP105A1, CYP105A1 (R84A/R73V), Arh1 und Etp1 ^{fd} (516-618) in E.coli.....	47
2.4.2. Präparation rekombinant exprimierter Proteine.....	48
2.4.3. UV/VIS-Spektroskopie.....	49
2.4.4. CO-Differenzspektrum.....	50
2.4.5. Suche nach alternativen heterologen Redoxpartnern zur Unterstützung der CYP105A1-Reaktion.....	50
2.4.6. SDS-PAGE.....	51
2.4.7. Western-Blot-Analyse der heterolog exprimierten Proteine in <i>Bacillus megaterium</i>	52
2.5. Umsetzungsanalysen, Substratsolubilisierungen und Präparation der Haupt-produkte aus den Ganzzellumsetzungen.....	53
2.5.1. <i>In vitro</i> -Reaktionen.....	53
2.5.2. HPLC-Analyse.....	54
2.5.3. Substratsolubilisierung mit Cyclodextrinen.....	54
2.5.4. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ von Glimepirid und Glibenclamid.....	55
2.5.5. Fermentation der Sulfonylharnstoffe Glimepirid und Glibenclamid und Reinigung der Produkte zur NMR- Analyse.....	56
2.5.6. NMR-Analyse der Haupt-Produkte der CYP105A1-abhängigen Glimepirid und Glibenclamid-Umsetzung	56
2.5.7. Bioinformatische Methoden.....	57
3. Ergebnisse.....	58
3.1. Etablierung eines CYP105A1-Assays zur Durchführung von <i>in vitro</i> -Studien.....	58
3.1.1. Klonierung, Expression und Reinigung von CYP105A1 und CYP105A1 (R84A/R73V).....	58
3.1.2. Substrat-Docking verschiedener Arzneimittelwirkstoffe auf Sulfonylharnstoff-Basis.....	61
3.1.3. Suche nach alternativen Redoxpartnern und dem optimalen Verhältnis der Proteinkomponenten.....	63
3.1.4. Expression und Reinigung der alternativen Redoxpartner.....	65
3.1.5. Optimierung der <i>in vitro</i> -CYP105A1-Reaktion.....	67
3.1.6. Alternative Elektronenquelle NADH.....	69
3.1.7. Verifizierung der Docking-Ergebnisse durch <i>in vitro</i> -Umsetzungen der Sulfonylharnstoffe mithilfe der optimierten Reaktionsparameter.....	70
3.1.8. Bestimmung der kinetischen Parameter der Umsetzung von Glimepirid und Glibenclamid.....	72
3.1.9. <i>In vitro</i> -Umsetzung mit Vitamin D ₃	73
3.2. Etablierung eines auf <i>Bacillus megaterium</i> basierenden Ganzzellsystems.....	75
3.2.1. Klonierung der Expressionsvektoren und Transformation von <i>Bacillus megaterium</i> MS941.....	75
3.2.2. Umsatzoptimierung durch Verbesserung der heterologen Proteinexpression.....	77
3.2.3. Optimierung durch Verbesserung der Bioverfügbarkeit der Substrate.....	84
3.2.4. Umsatzoptimierung durch Membranpermeabilisierung.....	88
3.2.5. Kombination aller optimierten Parameter in der Umsetzung mit Glimepirid und Glibenclamid.....	91
3.2.6. NMR-Strukturaufklärung.....	93
3.2.7. Stabilität der Derivate von Glimepirid und Glibenclamid.....	94
3.2.8. Einfluss der Batch-Kultivierung auf die Aktivität des Ganzzellsystems.....	95
3.2.9. Ganzzellbiokonversion von Vitamin D ₃	98
4. Diskussion.....	102

4.1. CYP105A1-abhängiger Sulfonylharnstoff-Metabolismus im Kontext der bioinformatischen Docking-Ergebnisse	102
4.1.1. Etablierung eines geeigneten Regenerationssystems unter Einbeziehung wirtschaftlicher Aspekte für <i>in vitro</i> -Studien	103
4.2. Ganzzellsystem	104
4.2.1. Wirtseigener Elektronentransfer zur Unterstützung der CYP105A1-Reaktion	105
4.2.2. Batch-Kultivierungsmethode	105
4.2.3. Sulfonylharnstoff-Umsetzung	107
4.2.4. Vitamin D ₃ -Umsetzung	111
5. Ausblick	117
6. Literaturverzeichnis	120
7. Anhang	130
7.1. Größenstandards und Eichgeraden	130
7.1.1. DNA-Marker	130
7.1.2. Proteinmarker	130
7.1.3. Eichgerade zur Ermittlung der Produktbildung 25-OH-Vitamin D ₃	131
7.2. DNA-Konstrukte	131
7.2.1. Multiple cloning site für den <i>Bacillus megaterium</i> -Expressionsvektor	132
7.3. HPLC-Chromatogramme der gereinigten Hauptprodukte aus der Glimepirid- und Glibenclamid-Umsetzung	133
7.4. Sequenzen der Synthesegene	134
7.4.1. Gene zur Expression in <i>E.coli</i>	134
7.4.2. Gene zur Expression in <i>Bacillus megaterium</i>	136
7.5. Sequenzierungsergebnisse	139
7.5.1. pKKHC-CYP105A1 His	139
7.5.2. pKKHC-CYP105A1 (R84A/R73V) His	140
7.5.3. pSMF CYP105A1 wt vs. pSMF- CYP105A1 (R84A/R73V) (MK-1vs.MK-3)	142
7.5.4. pSMF-CYP105A1 wt Arh1-Etp1 ^{fd} (516-618) (MK-2)	143
7.5.5. pSMF CYP105A1 (R84A/R73V) Arh1 Etp1 ^{fd} (516-618) (MK-4)	144
7.6. Strukturdaten von hydroxyliertem Glimepirid und Glibenclamid	146

I Verwendete Abkürzungen:

λ	Wellenlänge
μ	mikro (10^{-6})
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
A	Absorption
ACN	Acetonitril
AdR	Adrenodoxin Reduktase
Adx	Adrenodoxin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
Bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Cyclodextrin
CME	Cellulose Mischester
CO	Kohlenmonoxid
CYP	Cytochrom P450
δ -Ala	5-Aminolävulinsäure-hydrochlorid
D	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
7-DHC	7-Dehydrocholesterol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythritol
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, di- Natriumsalz
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FdR	Ferredoxin Reduktase
Fdx	Ferredoxin
Fldx	Flavodoxin
g	Gramm
HPLC	high performance liquid chromatography
IMAC	ion metal affinity chromatography
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
h	Stunde

IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid
k	Kilo
KPP	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	milli (10^{-3})
M	molar (mol/l)
mA	Milliampere
MCS	multiple cloning site
min	Minute
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
N	Stickstoff
n	nano (10^{-9})
NAD(P)	Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat
NMR	nuclear magnetic resonanz
OD	optische Dichte
OFOR	2-Oxosäure: Ferredoxin Oxidoreduktase
p	pico (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
PEG-P	Polyethylenglykol-Puffer
PFOR	Phtalat-Familien Oxygenase Reduktase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHB	Polyhydroxybuttersäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	rotations per minute
RBS	ribosomale Bindestelle
RP	reverse phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMM	Saccharose, Magnesium, Maleinsäure
SUR	sulfonylurea receptor
TB	Terrific broth
TBS	Tris buffer saline
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyldiamin
UV/vis	ultraviolett und visuell

V	Volt
W	Watt
WT	Wildtyp
zchL	zentrales Chemikalienlager

II Proteinogene Aminosäuren

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

III Zusammenfassung

CYP105A1 aus *Streptomyces griseolus* gehört zur Superfamilie der Cytochrom P450-Enzyme und verfügt über ein großes biotechnologisches Potential. Da das natürliche Redoxsystem des P450-Enzyms nicht vollständig aufgeklärt ist, wurden alle CYP105A1 Reaktionen *in vitro* bislang mithilfe eines Elektronentransfersystems aus *Spinacia oleracea* durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein alternatives Redoxsystem, bestehend aus einer Mutante des Ferredoxins Etp1^{fd}, Etp1^{fd} (516-618) und der zugehörigen Ferredoxin-Reduktase Arh1 aus der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*, etabliert werden. Als CYP105A1-Substrate wurden neben Vitamin D₃ die Sulfonylharnstoffe (SUs) Glimepirid und Glibenclamid untersucht. Die kinetischen Parameter der SU-Reaktionen wurden bestimmt und die Strukturen der Reaktionshauptprodukte aufgeklärt. Die Orientierung von Glimepirid und Glibenclamid im aktiven Zentrum von CYP105A1 wurde mit einem Computer-Docking-Modell gezeigt.

Des Weiteren wurden Ganzzellsysteme zur effizienten 3-Hydroxylierung der SU-Substrate und der 25-Hydroxylierung von Vitamin D basierend auf *Bacillus megaterium* MS941 entwickelt. Im Zuge der Optimierung zeigte sich, dass der Wirtstamm über ein zu CYP105A1 kompatibles Elektronentransfersystem verfügt. Neben Studien zur Steigerung der heterologen Proteinexpression wurden auch Untersuchungen zur Steigerung der Bioverfügbarkeit und der Membranpermeabilität der verwendeten Substrate durchgeführt.

IV Summary

CYP105A1 from *Streptomyces griseolus* belongs to the superfamily of cytochrome P450 enzymes and shows great biotechnological potential. For *in vitro* studies so far all CYP105A1 reactions have been performed using a reconstituted electron transfer system from *Spinacia oleracea*, because the natural redox system has not yet been completely elucidated. In this work an alternative redox chain consisting of a mutant of the ferredoxin Etp1^{fd}, Etp1^{fd} (516-618) and the ferredoxin reductase Arh1 from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* was established. Apart from Vitamin D₃, the sulfonylurea substrates (SUs) glimepiride and glibenclamide were used both in *in vitro* and *in vivo* conversions. The kinetic parameters of SU reactions were determined and the structures of the main products were solved by NMR. Moreover, the orientation of glimepiride and glibenclamide in the active site of CYP105A1 was demonstrated by a docking model. Subsequently, a whole cell bioconversion system based on *Bacillus megaterium* MS941 was developed for the efficient 3-hydroxylation of SU-substrates and 25-hydroxylation of Vitamin D₃. Interestingly, it was found that *Bacillus megaterium* provides a compatible electron transfer system for CYP105A1. In addition to studies to optimize heterologous protein expression, several options to improve the bioavailability and membrane permeability of the respective substrates were probed.

1. Einleitung

1.1. Cytochrome P450

1.1.1. Allgemeine Einteilungskriterien und Nomenklatur

Cytochrome P450 bilden eine große Gruppe von Hämthiolatproteinen, die im Rahmen von Studien an Rattenlebermikrosomen in den 1950er Jahren von Martin Klingenberg entdeckt wurden [Klingenberg *et al.*, 1958]. Die Enzyme wurden anfänglich als „Pigmente“ bezeichnet. Demzufolge steht das „P“ im Namen der Cytochrome P450 für Pigment. Die Zahl 450 im Namen der Cytochrome P450 geht auf die Tatsache zurück, dass Mitglieder dieser Enzymsuperfamilie nach der Reduktion mit Natriumdithionit und Komplexierung mit Kohlenstoffmonoxid ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm zeigen. Dies ist für Proteine mit Eisen-Protoporphyrin IX als Kofaktor atypisch, da diese normalerweise als Ferro-Carbonyl-Komplex ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 420$ nm besitzen [Omura und Sato, 1964]. Die Ursache für diese Verschiebung des Absorptionsmaximums beruht darauf, dass der fünfte axiale Häm-Ligand der Cytochrome P450 ein hochkonservierter Cysteinrest und nicht - wie in anderen Eisen-Protoporphyrin IX-haltigen Häm-Proteinen - ein Histidin ist [Ouzounis und Melvin, 1991]. Die Häm-Gruppe ist mit der Sulfhydrylgruppe der Cysteinseitenkette über das Eisenatom koordiniert.

Bis heute sind mehrere tausend Cytochrom P450 Mitglieder aus allen Bereichen des tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Lebens bekannt. Da die Anzahl der Vertreter dieser Enzymklasse stetig wächst, wurde von Nebert eine einheitliche Nomenklatur entwickelt [Nebert *et al.*, 1991]. Diese Nomenklatur ist am Beispiel des in dieser Arbeit verwendeten CYP105A1 erläutert (Abbildung 1.1).

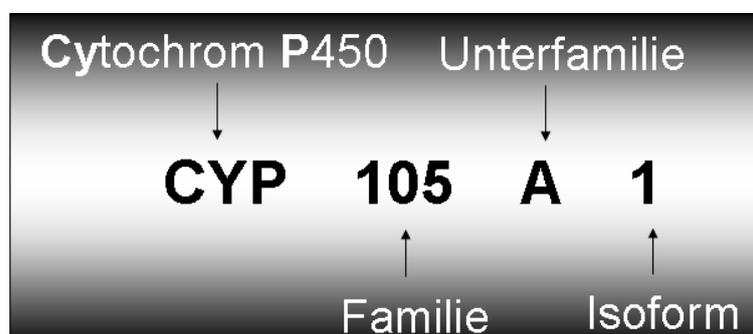


Abbildung 1.1: Nomenklatur der Cytochrome P450 am Beispiel von CYP105A1

Die Bezeichnung CYP charakterisiert die zur Familie der Cytochrome P450 gehörenden Hämproteine. Die erste Zahl beziffert die jeweilige Genfamilie und der nachfolgende

Buchstabe beschreibt die entsprechende Subfamilie. Eine weitere Zahl bestimmt die Isoform des Enzyms.

1.1.2. Reaktionen der P450-Enzyme

Cytochrome P450 werden den externen Monooxygenasen zugeordnet, da bei der Katalyse nur ein Atom des gespaltenen molekularen Sauerstoffes in das Substrat eingebaut wird. Das zweite Sauerstoffatom wird hingegen zu Wasser reduziert. Als „externe“ Monooxygenasen werden die Enzyme bezeichnet, da die für die Reaktion benötigten Elektronen nicht von dem umzusetzenden Substrat selbst, sondern von einer externen Elektronenquelle (NADH oder NADPH) zur Verfügung gestellt werden. In folgender Abbildung ist die Stellung der Cytochrome P450 unter den Sauerstoff aktivierenden Enzymen dargestellt (Abbildung 1.2).

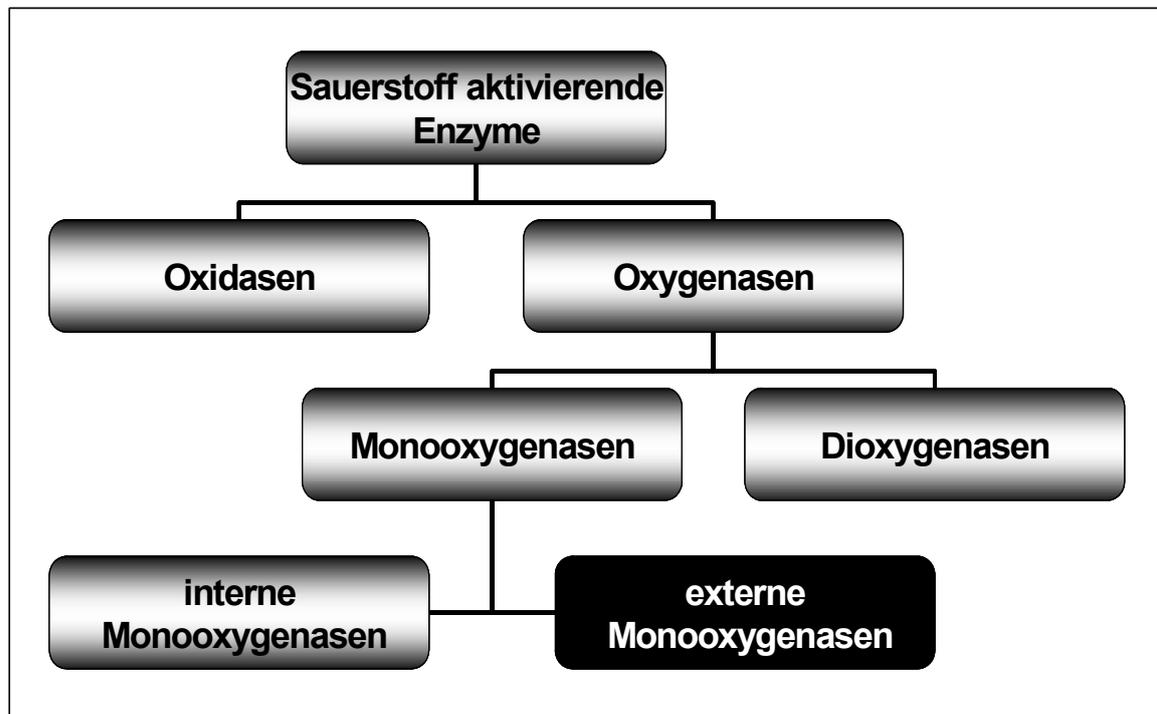


Abbildung 1.2: Schematische Einteilung sauerstoffaktivierender Enzyme (verändert nach [Ruckpaul, 1990]).

Die Beteiligung der Cytochrome P450 am Stoffwechsel von Steroiden, Fettsäuren, Prostaglandinen, Eicosanoiden, Arzneimitteln, Pestiziden, Karzinogenen, Zytostatika und anderer Xenobiotika [Blanck *et al.*, 1991] erklärt das große Interesse der Wissenschaft und zunehmend auch der Biotechnologie an diesen Enzymen [Bernhardt, 2006].

Eine Besonderheit der Cytochrom P450-Enzyme sind die vielen unterschiedlichen Reaktionstypen, die von dieser Enzymklasse katalysiert werden können. In Tabelle 1.1 sind die wichtigsten Reaktionstypen mit je einem Beispiel aufgezeigt. In der Regel werden

die Reaktionen mithilfe einer reduktiven Spaltung von molekularem Sauerstoff katalysiert [Bernhardt, 2006]. Allerdings wurde aktuell ein Spezialfall entdeckt, in dem eine Nitrierung von Tryptophan durch das Cytochrom P450 (TxE) im Rahmen der Thaxtomin A Biosynthese katalysiert wird [Barry und Challis, 2011]. Die Besonderheit ist dabei, dass in diesem Fall Stickstoffmonoxid, ein potentieller Cytochrom P450-Inhibitor, anstelle von molekularem Sauerstoff für die Reaktion verwendet wird.

Tabelle 1.1: Verschiedene Reaktionstypen, die von Cytochromen P450 katalysiert werden können.

Reaktion	Cytochrom P450	Beispiel	Referenz
Aromatisierung	CYP19A1	Testosteron zu Estradiol	[Osawa <i>et al.</i> , 1987]
Aliphatische Hydroxylierung	CYP105A1	1 α ,25 Hydroxylierung von Vitamin D ₂ und Vitamin D ₃	[Sawada <i>et al.</i> , 2004]
Aromatische Hydroxylierung	CYP2D6	Atomoxetin zu 4-Hydroxyatomoxetine	[Sauer <i>et al.</i> , 2005]
N-Desalkylierung	CYP3A4	Tilidin zu Nortilidin	[Lötsch, 2005]
O-Desalkylierung	CYP2D6	Codein zu Morphin	[Lötsch, 2005]
Dehalogenierung	CYP2E1	Sevofluran	[Kharasch, 1995]
Epoxidierung	CYP2J3	Epoxidierung von Arachnidonsäure zu Epoxyeicosatriensäure	[Yu <i>et al.</i> , 2011]
Seitenkettenabspaltung	CYP11A1	Umwandlung von Cholesterol zu Pregnenolon	[Van Lier <i>et al.</i> , 1977]
Sulfoxidation	CYP3A4	Lansoprazol zu Lansoprazol Sulfon	[Yanagida <i>et al.</i> , 2009]
Nitrierung	Cytochrom P450 (TxE)	Tryptophan zu L-4-Tryptophan	[Barry und Challis, 2011]

1.1.3. Einteilung der Cytochrome P450 nach ihrer Elektronentransportkette

Die für eine Cytochrom P450-Reaktion benötigten Elektronen werden in der Regel über eine Elektronentransportkette auf das eigentliche Enzym übertragen. Mittlerweile werden 10 Klassen von Cytochrom P450-Systemen aufgrund der Organisation sowie der Beschaffenheit der Elektronentransportkette unterschieden [Hannemann *et al.*, 2007]. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem bakteriellen Cytochrom P450 gearbeitet. Bakterielle Cytochrom P450 sind in den Klassen I-VIII vertreten. Das wesentliche Charakteristikum der bakteriellen Cytochrom P450-Systeme ist, dass alle beteiligten

Komponenten löslich sind. Tabelle 1.2 liefert eine Übersicht über die unterschiedlichen Zusammensetzungen des Elektronentransfers bakterieller Systeme.

Tabelle 1.2: Klassifizierung bakterieller Cytochrom P450-Systeme aufgrund ihrer Elektronentransportkette [Hannemann *et al.*, 2007]. („*“ Dieser Aufbau entspricht auch eukaryotischen, mitochondrialen Systemen)

Klasse	Elektronentransport-Kette	Beispielorganismus
I (*)	NAD(P)H→[FdR]→[Fdx]→[P450]*	<i>Pseudomonas putida</i>
II	NADH→[CPR]→[P450]	<i>Streptomyces carbophilus</i>
III	NAD(P)H→[FdR]→[Fidx]→P450]	<i>Citrobacter braakii</i>
IV	Pyruvat, CoA →[FdR]→[Fdx]→[P450]	<i>Sulfolobus tokadaii</i>
V	NADH→FdR→[Fdx-P450]	<i>Methylococcus capsulatus</i>
VI	NAD(P)H→[FdR]→[Fidx-P450]	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> Stamm 11Y
VII	NAD(P)H→[PFOR-P450]	<i>Ralstonia metallidurans</i>
VIII	NAD(P)H→[FdR-P450]	<i>Bacillus megaterium</i>

Der Aufbau des in der vorliegenden Arbeit etablierten Elektronentransfers entspricht dem der Klasse I. Die Reduktionsäquivalente werden zunächst von NAD(P)H über eine NAD(P)H-abhängige, FAD-haltige Reduktase auf ein Eisen-Schwefel-Protein übertragen. Der Eisen-Schwefel-Cluster dieser Proteine kann in unterschiedlichen Stöchiometrien vorliegen: [2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S] und [3Fe-4S]/[4Fe-4S]. Durch die Interaktion mit dem Eisen-Schwefel-Protein wird das Cytochrom P450 reduziert [Bernhardt, 1996]. In folgender Abbildung ist der Aufbau des bakteriellen Systems der Klasse I schematisch dargestellt (Abbildung 1.3).

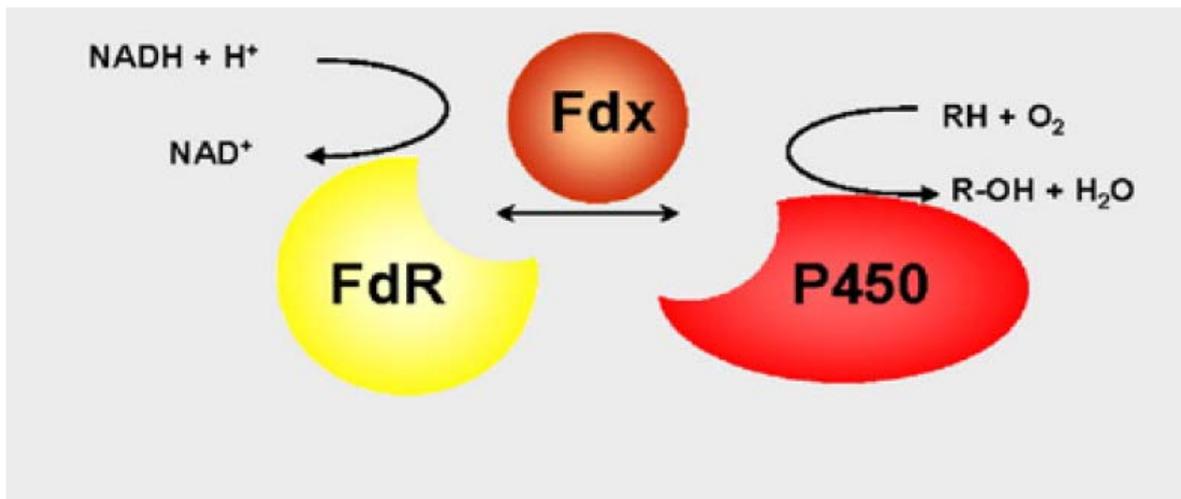


Abbildung 1.3: Bakteriellies Cytochrom P450-System (nach [Hannemann *et al.*, 2007]).

Auch eukaryotische, mitochondriale Cytochrom P450-Systeme besitzen diesen Aufbau, allerdings mit dem Unterschied, dass dort lediglich die Ferredoxinkomponente löslich ist. Die Reduktase und das Cytochrom P450 sind an die innere mitochondriale Membran assoziiert.

1.2. CYP105A1

Das bakterielle CYP105A1, welches in der Literatur auch als Cytochrom P450 SU-1 bezeichnet wird [O'Keefe *et al.*, 1988], ist ein etwa 44 kD großes lösliches Protein, bestehend aus 406 Aminosäuren. Die heterologe Expression des 1236 Bp umfassenden Gens in *E.coli* wurde 2003 erstmals publiziert [Hussain und Ward, 2003].

Ursprünglich wurde das Protein von O'Keefe aus einem Zellextrakt des Aktinomyceten *Streptomyces griseolus* ATCC 11796 isoliert [O'Keefe *et al.*, 1988]. Die DNA wurde später von Omer kloniert [Omer und O'Keefe, 1990]. Der Ursprungsorganismus *Streptomyces griseolus* exprimiert neben dem CYP105A1 mit CYP105B1 ein zweites Cytochrom P450. Diese Enzyme befähigen *Streptomyces griseolus* zur Inaktivierung von Herbiziden auf Sulfonylharnstoff-Basis. Die durch Sulfonylharnstoffe sowie Phenobarbital induzierbaren Promotoren von CYP105A1 und CYP105B1 wurden im Zuge von Genregulationsanalysen charakterisiert [Patel und Omer, 1992]. Die Strukturformeln der CYP105-Induktoren Chlorimuronethyl und Phenobarbital sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

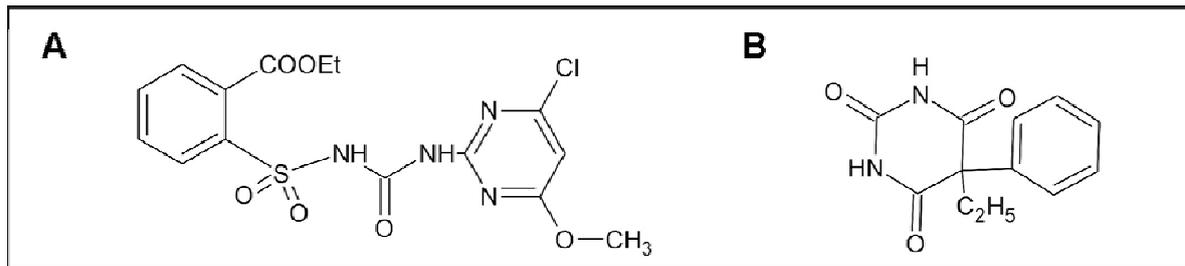


Abbildung 1.4: Induktoren der Cytochrome P450 CYP105A1 und CYP105B1 aus *Streptomyces griseolus* A) Chlorimuronethyl, B) Phenobarbital [Patel und Omer 1992].

Das natürliche Redoxsystem von CYP105A1 ist bis heute nicht vollständig charakterisiert. O'Keefe *et al.* konnten die Gene zweier Ferredoxine aus *S. griseolus* isolieren [O'Keefe *et al.*, 1991], welche *in vivo* zusammen mit CYP105A1 und CYP105B1 kotranskribiert werden [O'Keefe *et al.*, 1993]. Allerdings konnte kein zugehöriges Reduktasegen gefunden werden [O'Keefe und Harder, 1991]. Ein in der Anwendung mittlerweile sehr gängiges heterologes System stellen die Redoxproteine aus den Chloroplasten von *Spinacia oleracea* dar [O'Keefe *et al.*, 1991]. Auch das Redoxsystem von *Pseudomonas putida* wird in der Literatur als potentielles Elektronentransfersystem diskutiert [O'Keefe *et al.*, 1991].

Für CYP105A1 ist bereits ein großes Substratspektrum bekannt, welches unter anderem 7-Ethoxycoumarin [Hussain und Ward, 2003], α -Jonon und β -Jonon [Celic *et al.*, 2005] sowie Vitamin D umfasst. Vitamin D₂ und Vitamin D₃ werden durch das Enzym in die körperaktiven Metabolite 25-OH-Vitamin D und 1 α , 25-(OH)₂-Vitamin D überführt [Sawada *et al.*, 2004]. Diese Tatsache ist von sehr großem biotechnologischem Interesse, da diese Positionen am Vitamin D-Molekül für eine regioselektive Synthese auf chemischem Wege nicht gut zugänglich sind. Da die Enzymaktivität des CYP105A1 gegenüber Vitamin D sehr gering ist, wurde zur Steigerung der Aktivität die Doppelmutante CYP105A1 (R84A/R73V) basierend auf der Kristallstruktur [Sugimoto *et al.*, 2008] erzeugt [Hayashi *et al.*, 2008].

Tabelle 1.3 liefert einen Vergleich der Kinetiken des Vitamin D₃-Stoffwechsels von CYP105A1-Wildtyp und der verbesserten Mutante CYP105A1 (R84A/R73V).

Tabelle 1.3: Kinetische Parameter der Vitamin D₃-Hydroxylierung durch CYP105A1 wt [Sawada *et al.*, 2004] und der Doppelmutante CYP105A1 (R84A/R73V) [Hayashi *et al.*, 2010; Sakaki *et al.*, 2011].

Cytochrom P450	Substrat	Hydroxylierungs- position	K _m (μM)	V _{max} (mol/min/mol)
CYP105A1 wt	Vitamin D ₃	25	0,59	0,016
	1α-OH-Vitamin D ₃	25	-	0,054
	25-OH-Vitamin D ₃	1α	0,91	0,0036
CYP105A1 (R84A/R73V)	Vitamin D ₃	25	3,5	0,14
	1α-OH-Vitamin D ₃	25	6,5	2,12
	25-OH-Vitamin D ₃	1α	2,2	0,14

1.3. Alternatives Redoxsystem: Etp1^{fd} (516-618) und Arh1

Wie bereits erwähnt, ist das natürliche Redoxsystem von CYP105A1 bis heute nicht vollständig charakterisiert. Das in der vorliegenden Arbeit etablierte alternative Elektronentransfersystem zur Reduktion von CYP105A1 setzt sich aus der Ferredoxinkomponente Etp1^{fd} (516-618) und der Ferredoxin-Reduktase Arh1 zusammen.

Bei dem Ferredoxin Etp1^{fd} (516-618) handelt es sich um eine verkürzte Mutante von Etp1^{fd} (Elektronentransferprotein 1) aus der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*. Etp1 stellt ein mitochondriales Fusionsprotein dar, welches aus einer C-terminalen Ferredoxinkomponente (Etp1^{fd}) und aus einer zu *Saccharomyces cerevisiae* homologen COX15-Domäne besteht. Die Ferredoxindomäne beinhaltet einen [2Fe-2S] Eisen-Schwefel-Cluster. Die Stöchiometrie dieses Eisen-Schwefel-Clusters ist dabei typisch für mitochondriale Ferredoxine. Das UV/Vis-Spektrum von gereinigtem Etp1^{fd} ist sowohl in oxidiertem als auch reduziertem Zustand vergleichbar mit dem von bovinem Adrenodoxin (Adx). Das Redoxpotential des Proteins ist allerdings mit -353 mV deutlich niedriger als das von Adx, welches -273 mV beträgt. Die physiologische Funktion des Proteins im Ursprungsorganismus ist noch nicht aufgeklärt. Es wird vermutet, dass Etp1 am Aufbau von Eisen-Schwefel-Clustern beteiligt ist. Diese Vermutung resultiert aus Studien, die eine starke Interaktion von Etp1^{fd} mit Isu1 gezeigt haben [Lill R., 2009]. Bei Isu1 handelt es sich um ein wichtiges *scaffold*-Protein, welches in den Eisen-Schwefel-Cluster Aufbau involviert ist. Auch die Beteiligung von Etp1^{fd} an der Umwandlung von Häm O zu Häm A in *S. pombe* wird diskutiert [Müller *et al.*, 2011]. Des Weiteren sind auch Anwendungen mit Etp1^{fd} bei der Reduktion der Cytochrom P450 Enzyme CYP11A1 und CYP11B1 in Kombination mit bovinem AdR beschrieben. Obwohl die Elektronenübertragung nicht die Effizienz von Adx zeigte, konnte eine Umsetzung von Cholesterol zu Pregnenolon mit CYP11A1 sowie eine Umsetzung von 11-Desoxykortikosteron zu Kortikosteron mit CYP11B1 beobachtet werden [Schiffler *et al.*, 2004]. Die Kristallstruktur der aus 103 Aminosäuren bestehenden verkürzten Variante von Etp1^{fd}, Etp1^{fd} (516-618) wurde unlängst publiziert [Müller *et al.*, 2011].

Als korrespondierende Ferredoxin-Reduktase zu Etp1^{fd}, wurde das mitochondrial lokalisierte Flavoprotein Arh1 aus dem Genom der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* kloniert und heterolog in *E.coli* exprimiert [Ewen *et al.*, 2008]. Das 1410 Basenpaare umfassende Gen setzt sich aus zwei Exons zusammen. Das Protein umfasst 469 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 51 kD. Die für ein Flavoprotein typische gelbe Farbe ist auf die funktionelle FAD-Gruppe zurückzuführen.

Die ersten Expressionsexperimente führten zu einer geringen Ausbeute an Holoprotein. Die Ursache für die schwache Bindung des Kofaktors konnte auf das veränderte

Bindemotiv (GXGXXA) zurückgeführt werden, welches im Vergleich zu dem hochkonservierten Bindemotiv (GXGXXG) anderer FAD-haltiger Proteine ein Alanin anstelle eines Glycins beinhaltet. Durch den Austausch des Alanins gegen Glycin konnte die FAD-Bindung der Reduktase verbessert und das Holoprotein mit einer 100%igen Ausbeute gereinigt werden. Da im Rahmen dieser Arbeit nur die Variante Arh1 (A18G) verwendet wurde, wird die Mutante Arh1 A18G zur Vereinfachung hier als Arh1 bezeichnet [Ewen *et al.*, 2008].

1.4. Ausgewählte Substrate für die Umsetzung mit CYP105A1

1.4.1. Sulfonylharnstoffe

1.4.1.1. Herbizide des Sulfonylharnstoff-Typs

Die Entdeckung der herbizidalen Wirkung der Sulfonylharnstoffe im Jahre 1975 geht auf George Levitt, einem Mitarbeiter der Firma DuPont zurück [Krämer und Schirmer, 2007]. Seit den frühen 1980ern werden diese Verbindungen in der Landwirtschaft zur Unkrautbekämpfung als Breitbandherbizide eingesetzt. Die Aufnahme der Substanzen in die Pflanze erfolgt über Wurzeln und Blätter. Die herbizidale Wirkung der Sulfonylharnstoffe beruht auf der Hemmung der Acetolactatsynthase (ALS). Dieses Enzym spielt im pflanzlichen Stoffwechsel der verzweigt-kettigen, für Tiere und Menschen essentiellen Aminoäuren L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin eine wichtige Rolle [Russel *et al.*, 2002; Duke, 1990]. Die Strukturformel des Sulfonylharnstoff-Herbizids Chlorimuronethyl ist in Abbildung 1.4 A dargestellt.

1.4.1.2. Antidiabetika des Sulfonylharnstoff-Typs

Die Anwendung der Sulfonylharnstoffe zur Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 war bereits lange vor der Entdeckung der herbizidalen Wirkung dieser Verbindungsklasse bekannt. Diabetes mellitus Typ 2, zuvor als „nicht insulinpflichtiger Diabetes mellitus (NIDDM)“ oder „Altersdiabetes“ bezeichnet, kennzeichnet eine Stoffwechselerkrankung, die durch relativen Insulinmangel aufgrund voranschreitender pankreatischer Insuffizienz charakterisiert ist. Diese Erkrankung ist aufgrund von Langzeitschädigungen des Kreislauf- und Nervensystems und der daraus resultierenden Konsequenzen wie Schlaganfälle, Erblindung oder Wundheilungsstörungen an den unteren Extremitäten sehr gefürchtet. Neben einer speziellen Diät, ist die Einnahme so genannter oraler Antidiabetika die gängigste Therapie [Kruse und Schettler, 1994; Klinke und Silbernagl, 2003]. Die Sulfonylharnstoffe, die eine wichtige Klasse dieser Medikamente darstellen, werden zu den sekretierenden Verbindung gezählt, da ihre Wirkweise auf gesteigerter

Sekretion von Insulin aus den Vesikeln der pankreatischen β -Zellen (Langerhans-Inselzellen) beruht. Der therapeutische Effekt der Sulfonylharnstoffe liegt demzufolge in der Anregung der Insulinfreisetzung, was allerdings eine Restaktivität der Insulinproduktion der β -Zellen voraussetzt. Der Mechanismus der Insulinausschüttung sowie die Pharmakodynamik der Sulfonylharnstoffe werden im Folgenden kurz erläutert. Glukose wird aus der Blutbahn über den Insulin-unabhängigen Glukosetransporter GLUT 2 in die β -Zellen aufgenommen [Löffler und Petrides, 2003]. Durch die intrazelluläre Metabolisierung von Glukose steigt der ATP-Gehalt und damit die Energieladung der Zelle. Die Zelle verfügt über einen ATP-sensitiven Kaliumkanal (K^+_{ATP} -Kanal), an den ATP auf zytosolischer Seite bindet. Diese Interaktion verursacht das Schließen des Kaliumkanals, was aufgrund der dadurch erhöhten Natriumleitfähigkeit zu einer Depolarisierung des Membranpotentials führt. Diese Depolarisierung bewirkt wiederum die Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle. Der resultierende Calciumeinstrom in die β -Zellen bewirkt eine Vesikelentsperrung, was eine Exozytose der Vesikel und eine damit verbundene Insulinausschüttung in den perikapillären Raum zur Folge hat [Wellhöner, 1992; Löffler und Petrides, 2003]. Dieser Mechanismus kann durch Sulfonylharnstoffe extrazellulär und damit unabhängig von der Energieladung der Zelle beeinflusst werden. Eine Interaktion der Sulfonylharnstoffe mit dem extrazellulären, 180 kD umfassenden SUR1-Rezeptor bewirkt ebenfalls einen Verschluss des Kanals [Kramer *et al.*, 1988; Nichols, 2006]. In Abbildung 1.5 ist der Mechanismus der Insulinausschüttung der β -Zellen des Pankreas noch einmal zusammengefasst.

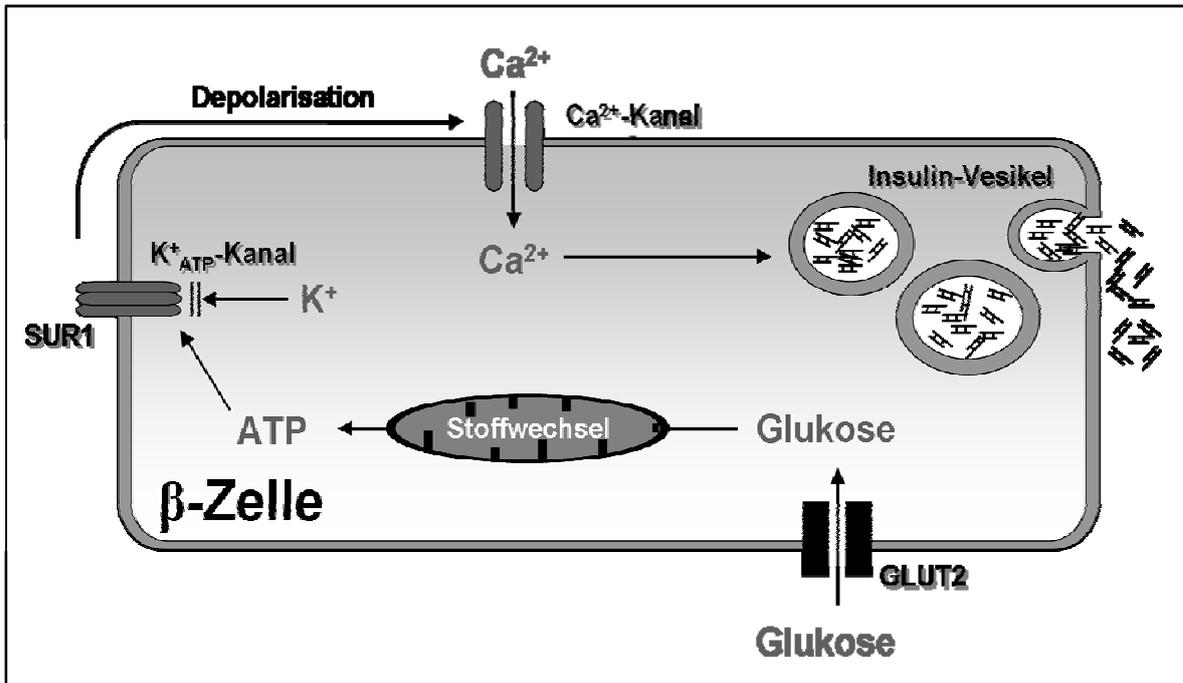


Abbildung 1.5: A) Schematische Darstellung des Mechanismus der Insulinausschüttung der pankreatischen β -Zelle. Durch die Bindung von ATP an eine regulatorische Untereinheit des Kaliumkanals wird dieser verschlossen und die Kaliumionen können nicht mehr in den extrazellulären Raum gelangen. Eine daraus resultierende Membrandepolarisation verursacht die Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle. Einströmende Calciumionen bewirken eine Entsperrung der Insulinvesikel und Insulin wird via Exozytose in den perikapillären Raum ausgeschüttet. Diese Kaskade kann durch die Bindung von Sulfonylharnstoffen an dem SUR1-Rezeptor des K^+_{ATP} -Kanals extrazellulär beeinflusst werden.

An der Interaktion mit dem SUR1-Rezeptor ist die Sulfonylharnstoff-Gruppe der jeweiligen Wirkstoffe maßgeblich beteiligt. Abbildung 1.6 zeigt die Strukturformel von Glimepirid, einem Sulfonylharnstoff der 3. Generation mit Bezug auf die physiologischen Interaktionsdomänen.

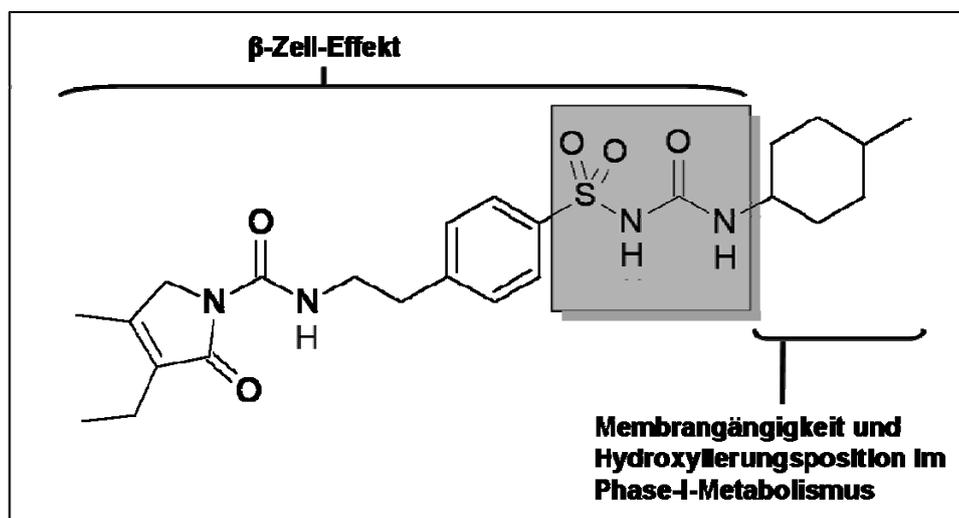


Abbildung 1.6: Strukturformel von Glimepirid mit Darstellung der physiologischen Interaktionsdomänen der Verbindungen (verändert nach [Müller *et al.*, 2010]). Die Sulfonylharnstoff-Gruppe des Moleküls ist grau unterlegt.

Alle Sulfonylharnstoffe zeigen ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 230$ nm. In folgender Abbildung ist ein UV/Vis-Spektrum von Glibenclamid, einem Sulfonylharnstoff der 2. Generation gezeigt (Abbildung 1.7).

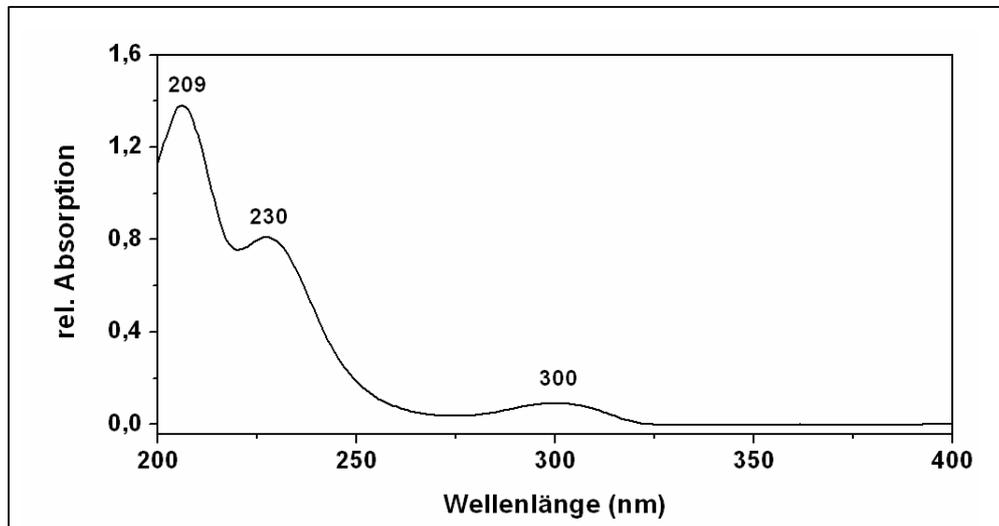
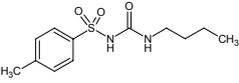
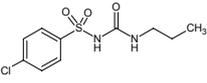
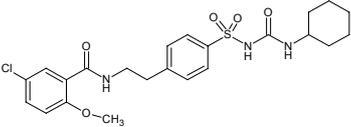
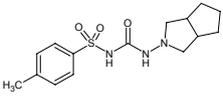
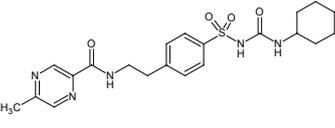
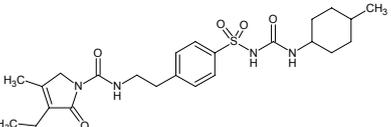


Abbildung 1.7: UV/Vis-Spektrum von Glibenclamid, gelöst in Methanol. Das Maximum bei 230 nm ist charakteristisch für alle Sulfonylharnstoff-Verbindungen. Das Spektrum von Glibenclamid besitzt zusätzliche Maxima bei den Wellenlängen $\lambda = 300$ nm und $\lambda = 209$ nm.

Sulfonylharnstoffe, die ausschließlich peroral appliziert werden, sind seit den 1960er Jahren als Medikamente zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 zugelassen. Glibenclamid, ein Sulfonylharnstoff der 2. Generation wurde 1968 erstmals beschrieben [Loubatieres *et al.*, 1968]. Tabelle 1.4 liefert eine Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Sulfonylharnstoffe.

Tabelle 1.4: Auflistung verschiedener oralen Antidiabetika vom Sulfonylharnstoff-Typ zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2. Alle hier aufgeführten Verbindungen wurden in der Umsetzung mit CYP105A1 untersucht.

Bezeichnung	Generation	Strukturformel
Tolbutamid	1	
Chlorpropamid		
Glibenclamid	2	
Gliclazid		
Glipizid		
Glimepirid	3	

1.4.2. Vitamin D

Vitamin D, welches auch als „Sonnenschein Vitamin“ bezeichnet wird, zählt neben den Vitaminen A, K und E zu den fettlöslichen Vitaminen. Der Begriff Vitamin D ist ein Sammelbegriff für die Vertreter Cholecalciferol (Vitamin D₃) und Ergocalciferol (Vitamin D₂). Während Ergocalciferol in Pilzen synthetisiert wird, wird Cholecalciferol in der Haut unter Einfluss von UV-B-Strahlung aus dem Vorläufer 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) gebildet. Prinzipiell handelt es sich bei Vitamin D um eine Vorstufe, die keine Wirkung auf den Organismus zeigt. Die Modifizierung bis zur aktiven Form verläuft über zwei Hydroxylierungsschritte, die durch Cytochrom P450-Enzyme vollzogen werden. Mithilfe des Vitamin D-Bindeproteins (DBP) wird das Secosteroid über die Blutbahn zur Leber transportiert [Cooke und Haddad, 1989], wo die erste Hydroxylierung stattfindet. Diese Hydroxylierung an Position 25 des Moleküls wird vorwiegend durch das mikrosomale CYP2R1, aber auch durch CYP27A1, CYP2J2, sowie CYP3A4 realisiert [Schuster, 2011]. Die zweite Hydroxylierung zum aktiven Metaboliten 1 α , 25-(OH)₂-Vitamin D findet überwiegend in der Nierenrinde durch das mitochondriale CYP27B1 statt [Schuster,

2011]. $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-Vitamin D}$ interagiert dann zusammen mit dem Vitamin D-Rezeptor in den Zielgeweben auf der Ebene der Genregulation. Die wohl bekannteste Wirkung von $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-Vitamin D}$ ist die Aktivierung der Synthese von Calbindin. Dadurch werden die Resorption von Calcium aus dem Darmlumen sowie der Calciumimport in die Knochen gesteigert. Störungen im Ablauf dieses Mechanismus, etwa durch Vitamin D-Mangel, führen zu dem Krankheitsbild der Rachitis oder der Osteomalazie [Wellhöner, 1992]. Aber nicht nur im Mineralhaushalt spielt Vitamin D eine wichtige Rolle. Auch eine antikanzerogene Wirkung, sowie protektive Effekte gegen Autoimmun- und Herz-/Kreislaufkrankungen sind beschrieben [Holick, 2008]. Die Inaktivierung der aktiven Vitamin D-Form erfolgt durch eine Hydroxylierung an Position 24 des $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-Vitamin D}_3$ durch das Cytochrom P450 CYP24A1 [Sakaki *et al.*, 2005].

Die 1α - sowie die 25-Hydroxylaseaktivität von CYP105A1 gegenüber Vitamin D wurde 2004 publiziert [Sawada *et al.*, 2004]. Bei Verwendung der CYP105A1-Doppelmutante CYP105A1 (R84A/R73V) [Hayashi *et al.*, 2008], konnte neben der gesteigerten Hydroxylaseaktivität eine weitere Hydroxylierung an Position 26 des Vitamin D Moleküls identifiziert werden [Hayashi *et al.*, 2010]. Diese Verbindung zeigte eine antikanzerogene Wirkung bei gleichzeitig niedrigem kalzämischen Effekt [Tanaka *et al.*, 1981].

In der vorliegenden Arbeit sollte die Grundlage zur biotechnologischen Herstellung von 25-OH-Vitamin D gelegt werden. 25-OH-Vitamin D ist die Hauptform des im Körper zirkulierenden Vitamin D. Dadurch wird es im Rahmen der klinischen Labordiagnostik als Standard zur Untersuchung des Vitamin D-Status von Patienten verwendet. Bei Patienten mit Leberzirrhose ist eine Substitution von 25-OH-Vitamin D aufgrund reduzierter 25-Hydroxylaseaktivität erforderlich. Die Strukturformeln von Vitamin D_3 und Vitamin D_2 sind in Abbildung 1.8 dargestellt.

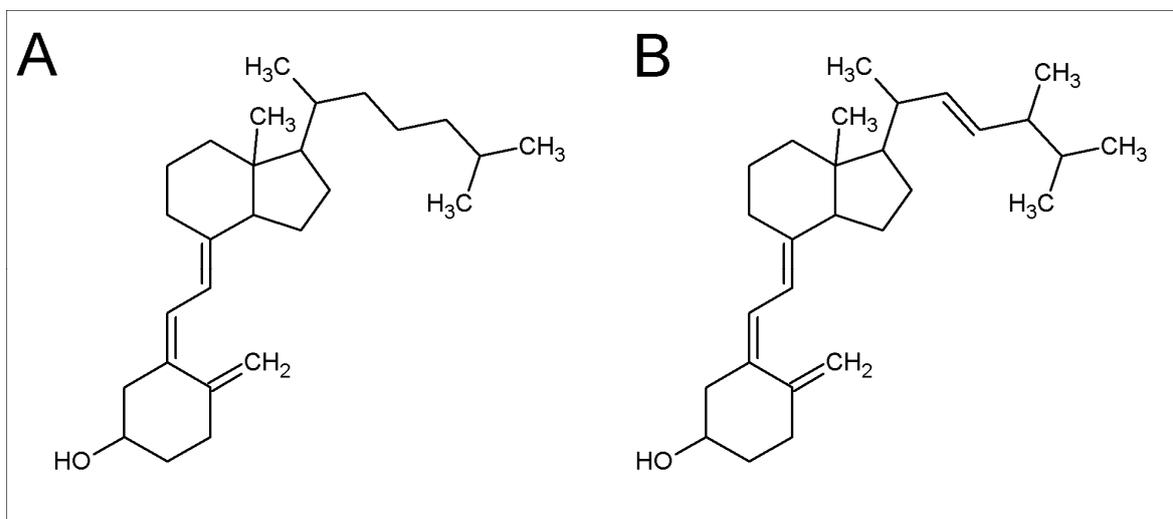


Abbildung 1.8: Strukturformeln von A) Vitamin D_3 und B) Vitamin D_2

1.5. Ganzzellbiotransformation

1.5.1. Anforderungen an heterologe, Cytochrom P450-exprimierende Ganzzellsysteme

Cytochrom P450-Enzyme erfahren aufgrund ihres umfangreichen Spektrums an interessanten Reaktionen eine stetig wachsende Bedeutung in der Biotechnologie [Bernhardt, 2006]. Zur Nutzung dieser Reaktionen für kommerzielle Zwecke werden häufig Ganzzellbiokatalysatoren verwendet. Bei solchen Ganzzellsystemen handelt es sich meistens um leicht kultivierbare Mikroorganismen, welche als Wirtsorganismus zur heterologen Expression des gewünschten Enzyms verwendet werden. Ein Ganzzellbiokatalysator, der zur Expression heterologer Cytochrom P450-Enzyme verwendet wird, benötigt zusätzlich ein kompatibles Elektronentransfersystem. Die Aufgabe eines solchen Systems besteht darin, die für die Reaktion benötigten Reduktionsäquivalente von einem Elektronendonator (NADPH, NADH) auf das Cytochrom P450 zu übertragen. Demzufolge ist die Bereitstellung kompatibler Redoxpartner ebenso bedeutsam wie die Expression des funktionsfähigen, aktiven Cytochrom P450-Enzymen selbst.

1.5.2. Anforderung niedermolekularer Substrate an die Zellwandbeschaffenheit

Unabhängig von der Bereitstellung der Enzyme stellt der Substratimport in den Wirtsorganismus eine weitere wesentliche Herausforderung für den Aufbau eines Ganzzellbiokatalysators dar. Eine selektive Aufnahme des Substrates über einen aktiven Transportmechanismus ist nicht zu erwarten. Der Transport der Substrate durch die Membran erfolgt demnach unselektiv mittels einfacher Diffusion. Diese wiederum ist maßgeblich von den Moleküleigenschaften der Substrate [Adam *et al.*, 2003] sowie der Beschaffenheit der Zellwand potentieller Wirtsorganismen abhängig. So zählt beispielsweise *E. coli* zu den am besten charakterisierten Bakterien für die molekularbiologische Forschung. Für eine biotechnologische Anwendung, die einen Import speziell hydrophober Substrate in das Zytosol voraussetzt, ist *E.coli* allerdings nur bedingt geeignet. Die äußere Membran des gram-negativen Mikroorganismus verfügt über eine Lipopolysaccharidschicht, die gerade für den Import von hydrophoben Substanzen eine effektive Barriere darstellt. In der Literatur sind viele Strategien beschrieben, die darauf abzielen, die Permeabilität dieser Selektivitätsbarriere zu steigern. Unter anderem wurden dazu Agenzien wie EDTA, synthetische Acylpolyamine, Rhamnolipid oder das Peptidantibiotikum Polymyxin verwendet [Leive, 1965; Voll und Leive 1970; Balakrishna *et al.*, 2006; Tsubery *et al.*, 2002]. Sogar ein *E.coli*-Stamm mit einem Knockout in der Lipopolysaccharid-Biosynthese wurde publiziert [Ni *et al.*, 2007]. In

Abbildung 1.9 ist der Aufbau einer gram-negativen und einer gram-positiven Zellwand miteinander verglichen.

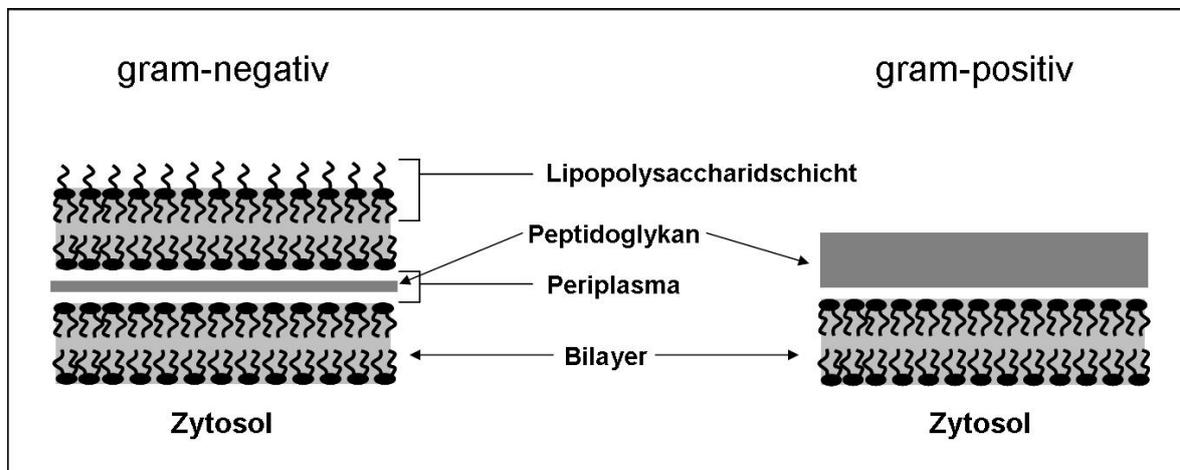


Abbildung 1.9: Schematischer Vergleich des Aufbaus einer gram-negativen Zellwand mit einer gram-positiven Zellwand.

Die Abbildung zeigt, dass die Zellwand gram-negativer Mikroorganismen im Vergleich zu der gram-positiver Mikroorganismen einen deutlich komplizierteren Aufbau besitzt. Neben der äußeren Membran, an deren Außenseite die Lipopolysaccharidschicht assoziiert ist, besitzt die Zellwand gram-negativer Bakterien eine zusätzliche innere Biomembran, welche das Zytosol von dem periplasmatischen Raum abgrenzt. Demnach müssen Substrate aus dem Kulturmedium die äußere Zellmembran mit assoziierter Lipopolysaccharidschicht, den periplasmatischen Raum sowie die innere Zellmembran passieren, um zu dem zytosolisch exprimierten Enzymsystem zu gelangen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das gram-positive Bodenbakterium *Bacillus megaterium* als Wirtsorganismus zur heterologen Expression von CYP105A1 ausgewählt.

1.5.3. *Bacillus megaterium*

Bei dem Mikroorganismus *Bacillus megaterium* handelt es sich um ein gram-positives, unbewegliches Stäbchen mit der Fähigkeit zur Sporulation. Das fakultativ aerobe Bodenbakterium ist durch einen niedrigen GC-Gehalt der DNA charakterisiert. Aufgrund des bevorzugten pH-Wert Milieus wird *Bacillus megaterium* zu den neutrophilen Organismen gezählt [Madigan, 2002; Schlegel, 1992; Steinbüchel und Oppermann-Sanio, 2003]. Wegen der Größe von $4 \times 1,5 \mu\text{m}$ wurde *Bacillus megaterium* von De Bary als „The big beast“ bezeichnet [De Bary, 1884]. Das Volumen von *B. megaterium* kann bis zu 100 x größer sein als das von *E. coli*. Abbildung 1.10 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von *Bacillus megaterium* mit *E. coli* im Größenvergleich.

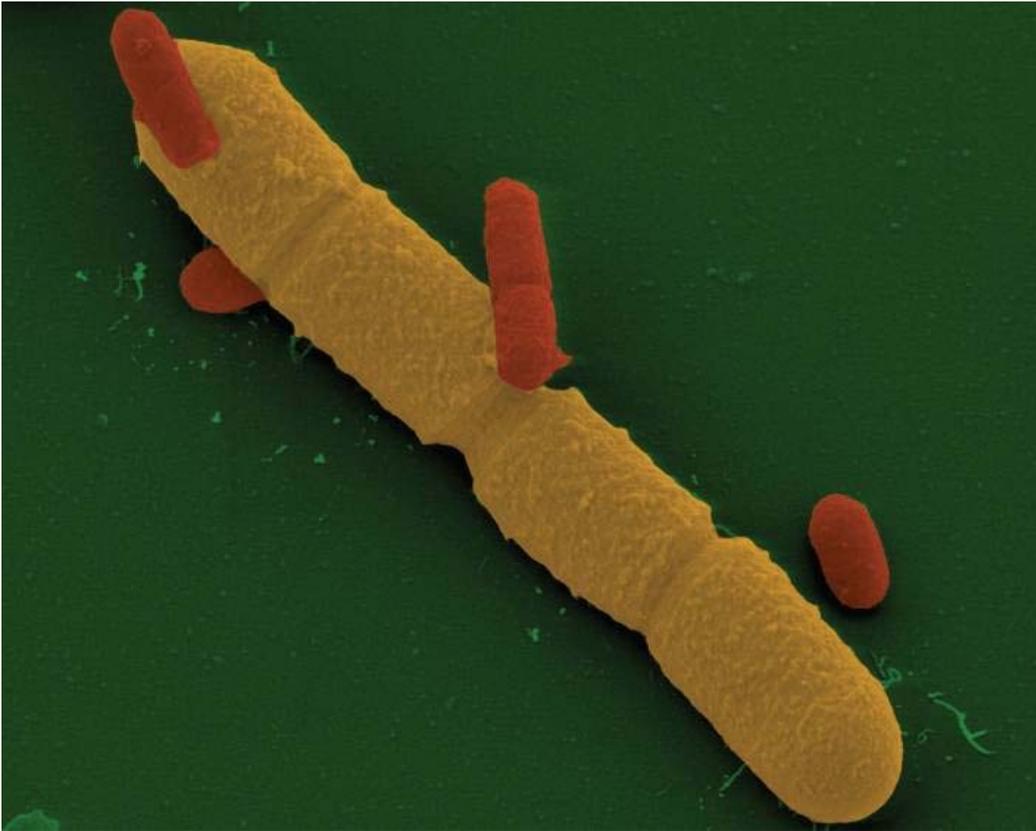


Abbildung 1.10: Elektronenmikroskopische Aufnahme sich teilender *Bacillus megaterium*-Zellen (gelb) im Vergleich zu *E.coli*-Zellen (orange) [Bunk *et al.*, 2010].

In den 1960er Jahren war *Bacillus megaterium* „das Modell der Wahl“ für intensive Studien für die Biochemie, der Sporulation sowie Studien mit Bakteriophagen gram-positiver Bakterien [Bunk *et al.*, 2010].

Aufgrund seiner einfachen Kultivierbarkeit und der Fähigkeit, viele unterschiedliche Kohlenstoffquellen nutzen zu können, ist der Mikroorganismus in biotechnologischen Anwendungen heute bereits sehr gut etabliert [Meinhardt, 1989; Vary, 1994; Vary *et al.*, 2007]. Ein weiterer Vorteil von *Bacillus megaterium* ist die hohe Stabilität heterolog exprimierter Proteine, bedingt durch eine geringe intrinsische Proteaseaktivität [Vary, 1994; Vary *et al.*, 2007]. Im Gegensatz zu vielen gram-negativen Mikroorganismen bildet *Bacillus megaterium* auch keine membranassoziierten Endotoxine [Bunk *et al.*, 2010] und wird zu den GRAS-Organismen (*generally regarded as safe*) gezählt.

In dieser Arbeit wurde der *Bacillus megaterium*-Stamm MS941 zur Ganzzellbiotransformation der ausgewählten Substrate verwendet. Bei diesem Stamm handelt es sich um eine Mutante des plasmidlosen Stammes *Bacillus megaterium* DSM319, bei dem die externe Protease *nprM* deletiert wurde [Wittchen und Meinhardt, 1995; Stahl und Esser, 1983]. *Bacillus megaterium* MS941 ist durch Plasmide transformierbar, die durch einen Xylose-Promotor induzierbar sind. Dieser Promotor

gehört zu den am besten charakterisierten Promotoren kohlenstoffutilisierender Operons [Rygus and Hillen, 1991].

1.5.4. Cyclodextrine

Viele in der Biotechnologie als Substrate verwendete Verbindungen sind sehr hydrophob. Der Umgang mit Mikroorganismen oder anderen Ganzzellsystemen erfordert jedoch eine Kultivierung in einer wässrigen Umgebung, in welcher diese Verbindungen wiederum ausfallen und demzufolge einer Biotransformation nicht mehr zur Verfügung stehen würden. Organische Lösemittel wiederum, die zur Solubilisierung dieser hydrophoben Verbindungen verwendet werden, zeigen meist einen toxischen Effekt gegenüber den verwendeten Ganzzellsystemen [Weber und de Bont, 1996]. Eine Herausforderung besteht daher in der Vereinigung von Substrat und Biokatalysator unter wässrigen Kulturbedingungen. Einen sehr guten Kompromiss zur Lösungsvermittlung der hydrophoben Substrate bieten die so genannten Cyclodextrine.

Cyclodextrine sind Verbindungen aus zyklisch angeordneten α -1,4-glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten. Aufgrund der Länge der Oligosaccharide teilt man die Cyclodextrine in α -Cyclodextrine (6 Glukoseeinheiten), β -Cyclodextrine (7 Glukoseeinheiten) oder γ -Cyclodextrine (8 Glukoseeinheiten) ein. Neben diesen Basiscyclodextrinen α -, β - und γ -Cyclodextrin sind mittlerweile viele verschiedene, substituierte Derivate erhältlich. Cyclodextrine sind bereits seit über 100 Jahren bekannt. Die Isolierung dieser Verbindungen, die durch den enzymatischen Abbau von Stärke entstehen, geht auf Villiers (1881) zurück. Die Struktur wurde erstmals von Schardinger (1903) beschrieben. Daher werden sie in der Literatur manchmal auch als „Schardinger-Dextrine“ bezeichnet [Singh *et al.*, 2002].

Die ringförmige Anordnung der Cyclodextrine zeigt sich nach außen polar und besitzt eine innere hydrophobe Kavität, in die eine Vielzahl fester, flüssiger oder gasförmiger Substanzen komplexiert werden können [Eastburn und Tao, 1994]. Die Wechselwirkungen zwischen Wirt- und Gastmolekül beruhen auf Van-der-Waals-Kräften oder hydrophoben Wechselwirkungen [Loftsson *et al.*, 2005]. Durch ihre Eigenschaft, hydrophobe Moleküle reversibel zu komplexieren, sind Cyclodextrine mittlerweile in vielen Industriezweigen etabliert. Neben der pharmazeutischen Industrie, in der Cyclodextrine zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit lipophiler Arzneimittel eingesetzt werden [Loftsson and Brewster, 2010], finden sie Anwendung im Bereich der kosmetischen Industrie, der Lebensmittelindustrie, der Textilindustrie sowie im Umweltschutz [Singh *et al.*, 2002]. Für Studien im Zusammenhang mit Enzymen eignen sich Cyclodextrine ebenfalls sehr gut, da sie die zu untersuchenden Enzyme weder denaturieren noch deren kinetische Parameter beeinflussen [Harper *et al.*, 2000]. Darüber hinaus können Cyclodextrine sogar als

künstliche Chaperone zur Unterstützung der Proteinfaltung eingesetzt werden [Harper *et al.*, 2000]. Die Trennung von Enantiomeren stellt eine weitere wichtige Anwendung von Cyclodextrinen dar. Besonders durch den „Contergan-Skandal“ in den 1960er Jahren ist die Bedeutsamkeit einer Enantiomertrennung nachvollziehbar. Bei dem Schlafmittel Contergan (Thalidomid) zeigte die R-Form eine hochgradig teratogene Wirkung, was bei Feten *in utero* zu starken Missbildungen führte.

Abbildung 1.11 zeigt die Strukturformel des in der vorliegenden Arbeit überwiegend eingesetzten Hydroxypropyl- β -Cyclodextrins (HP-beta-CD). Dieses Cyclodextrin besitzt einen geringen Substitutionsgrad und zeichnet sich durch sehr gute komplexierende Eigenschaften bei einer gleichzeitig geringen Oberflächenaktivität aus [Challa *et al.*, 2005].

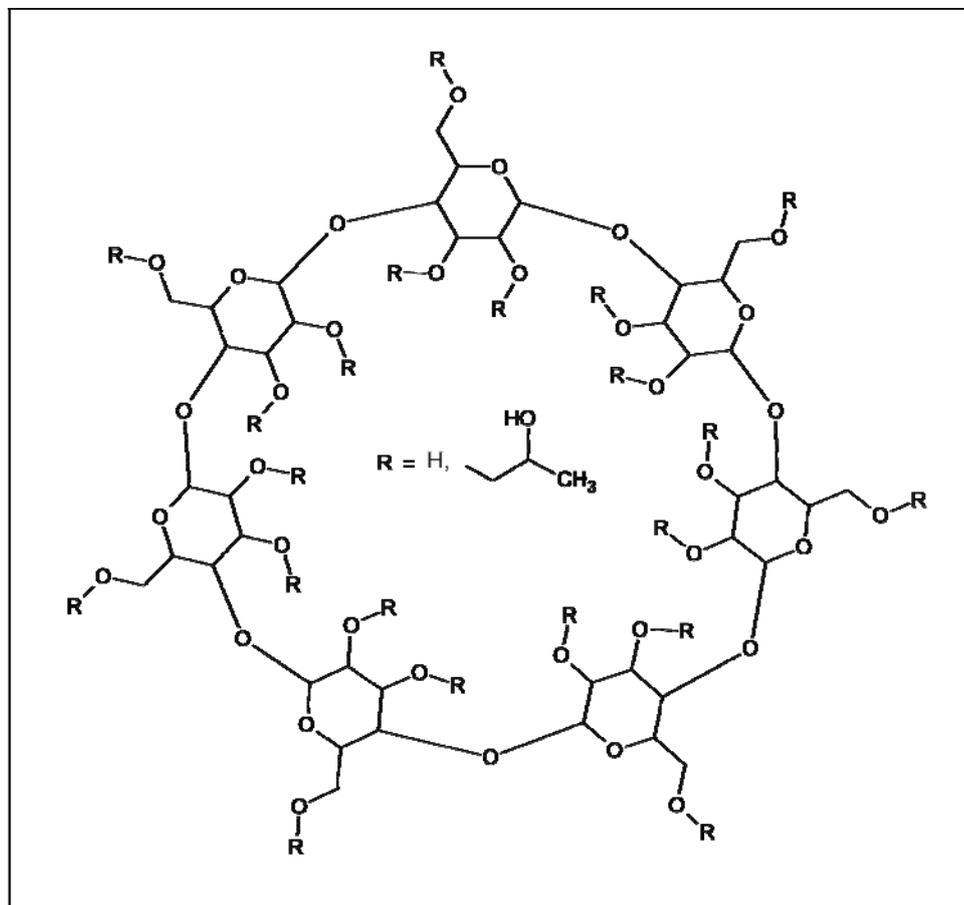


Abbildung 1.11: Strukturformel eines Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin-Moleküls (HP-beta-CD).

1.5.5. Saponine

Neben der Erhöhung der Bioverfügbarkeit hydrophober Verbindungen besteht zusätzlich die Möglichkeit, die Produktbildung durch unselektive Steigerung der Membranpermeabilität des Wirtsorganismus für das verwendete Substrat zu erhöhen. Die zur Permeabilisierung von Membranen verwendbaren Reagentien lassen sich in zwei Klassen einteilen. Bei der ersten Klasse handelt es sich um organische Lösemittel wie Methanol oder Aceton. Die Permeabilitätssteigerung wird in diesem Fall durch die Eigenschaft, Lipide aus Membranen zu lösen erzielt. Die zweite Klasse beinhaltet so genannte oberflächenaktive Substanzen wie Tween, Triton X, Rhamnolipid oder Saponin. In der Klasse der oberflächenaktiven Substanzen hat sich gezeigt, dass die natürlich vorkommenden Vertreter wie Rhamnolipide und Saponine zu den effektivsten permeabilisierenden Substanzen zählen [Kaczorek und Olszanowski, 2010].

Saponine, die hauptsächlich pflanzlichen Ursprungs sind, werden auch von einigen niederen Meerestieren und Bakterien gebildet. Während die Funktion in Pflanzen noch nicht vollständig geklärt ist, wird unter anderem eine antimykotische, antivirale, molluscidale, zytostatische, immunstimulierende und eine glukokorticoide Wirkung diskutiert [Francis *et al.*, 2002]. Sogar ein hypoglykämischer Effekt von Saponinen ist in der Literatur beschrieben [Petit *et al.*, 1993].

Aufgrund ihrer Chemie zählen Saponine zu den oberflächenaktiven Glykosiden. Der hydrophobe Anteil des Saponins wird als Sapogenin oder Aglycon bezeichnet. Das Sapogenin liegt entweder in triterpenoide oder in steroidaler Grundform vor (Abbildung 1.12).

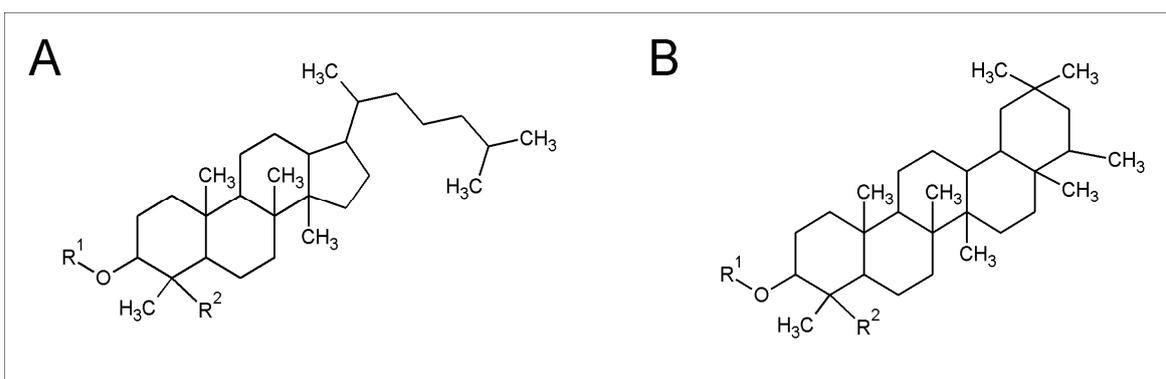


Abbildung 1.12: Sapogenin-Grundstrukturen A) steroidale Grundstruktur B) triterpenoide Grundstruktur, R^1 und R^2 bezeichnen Zuckerreste, die mit den Sapogenin-Strukturen verbunden sind, wobei $R^1 \neq R^2$ (nach [Francis *et al.*, 2002]).

Das Aglycon-Grundgerüst ist glykosidisch mit einem oder mehreren verschiedenen Zuckerresten, dem polaren Anteil des Saponins verknüpft. Saponine, die lediglich einen Zuckerrest am C3-Atom enthalten, werden als monodesmosidisch bezeichnet. Befinden

sich noch zusätzliche Zuckerreste an den C26- und C28-Atomen, wird das entsprechende Saponin als bidesmosidisch bezeichnet. Die Zuckerreste sind überwiegend aus Glukose, Galaktose, Rhamnose, Xylose sowie Glukuronsäure oder Methylpentose aufgebaut [Francis *et al.*, 2002]. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Quillaja-Saponin, welches einen Sapogenin-Gehalt von 20-35 % aufweist, handelt es sich um eine bidesmosidische Verbindung mit triterpenoidem Grundgerüst. Das sich am C3-Atom befindliche Zuckergerüst besteht aus Glukuronsäure, Galaktose und Xylose. Der Zweite Zuckerrest setzt sich aus Fucose, Rhamnose, Xylose, und Apiose zusammen [Mitra und Dungan, 2001].

Ein Mechanismus zur Beschreibung des Saponin-Effekts an eukaryotischen Biomembranen wurde von Armah und Mitarbeitern 1999 vorgeschlagen [Armah *et al.*, 1999]. Demnach interagiert Saponin mit dem Cholesterol eukaryotischer Biomembranen. Diese Interaktion resultiert über die Aggregation der Cholesterol-Saponin-Komplexe über die hydrophilen Anteile des Saponins in einer Porenbildung. Diese Poren erleichtern den unselektiven Durchtritt niedermolekularer Verbindungen in das Zytosol des Biokatalysators. Der Mechanismus des Saponin-Effekts an Biomembranen ist schematisch in Abbildung 1.13 erläutert.

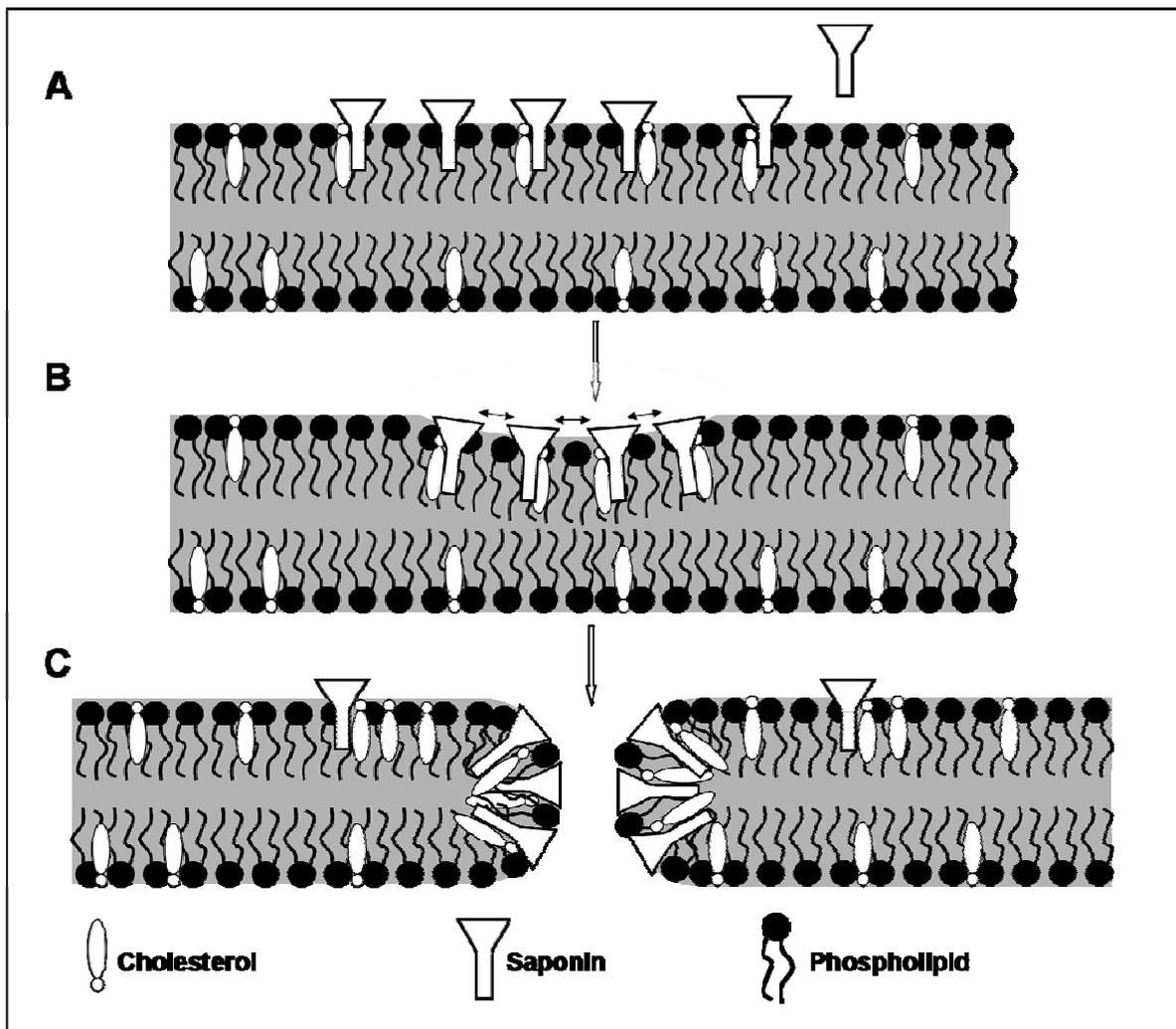


Abbildung 1.13: Mechanismus der Saponin-induzierten Porenbildung an Biomembranen (verändert nach [Armah *et al.*, 1999]). Das Saponin-Molekül inkorporiert mit dem hydrophoben Anteil in die Membran und assoziiert mit dem membranständigen Cholesterin (A), gefolgt von einer Aggregation der Cholesterin-Saponin-Komplexe über die hydrophilen Saponin-Anteile (B). Diese Aggregation resultiert in einer Porenbildung (C).

1.5.6. Batch-Kultivierung

Die Art der Kultivierungsmethode von Mikroorganismen ist abhängig von der individuellen Fragestellung. In der vorliegenden Arbeit sollte ein System zur kommerziellen Anwendung für eine Bereitstellung von 25-OH-Vitamin D sowie interessanter Sulfonylharnstoff-Derivate entwickelt werden. Zur Bearbeitung einer derartigen Fragestellung ist eine Kultivierungsmethode besonders geeignet, die einen hohen experimentellen Durchsatz in geringem Kulturmaßstab erlaubt und dadurch auch schnell viele Informationen über Optimierungsschritte des Systems liefert. Demzufolge wurden alle Experimente mithilfe der so genannten Batch-Kultivierungsmethode durchgeführt. Unter der Batch-Methode wird ein diskontinuierliches Verfahren verstanden, bei dem die Zellen in einem

geschlossenen System mit einem definierten Nährstoffangebot kultiviert werden [Richter, 2003].

1.6. Aufgabenstellung

Cytochrome P450 katalysieren stereo- und regiospezifische Hydroxylierungen von nicht aktivierten Kohlenwasserstoffen und sind in dieser Eigenschaft der chemischen Synthese weit überlegen. Daraus resultiert ein stetig wachsendes Interesse der Biotechnologie an dieser Enzymklasse. In der vorliegenden Arbeit sollte das bakterielle Cytochrom P450 CYP105A1 aus *Streptomyces griseolus* zur Entwicklung einer kommerziell nutzbaren Herstellung interessanter Derivate herangezogen werden. CYP105A1 wurde ursprünglich im Zusammenhang mit der Inaktivierung von Sulfonylharnstoff-Herbiziden entdeckt [O'Keefe *et al.*, 1988]. Neben der Anwendung als Herbizide wird die Verbindungsklasse zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt. Mit den auf Sulfonylharnstoffen basierenden Wirkstoffen oraler Antidiabetika wurde eine Umsetzung mit CYP105A1 bislang nicht untersucht. Zunächst sollten die beiden für eine Umsetzung mit CYP105A1 am besten geeigneten Sulfonylharnstoff-Verbindungen aus einer Auswahl gängiger Arzneimittelwirkstoffe mithilfe bioinformatischer Methoden identifiziert werden mit dem Ziel, die kinetischen Eigenschaften zu bestimmen und die Hauptprodukte der Reaktionen via NMR aufzuklären. Im Hinblick auf eine biotechnologische Produktion interessanter Metabolite dieser Wirkstoffe sollte ein CYP105A1-exprimierendes Ganzzellsystem generiert werden.

Zusätzlich sollte im Rahmen eines BMBF-Projektes dieses Ganzzellsystem zur Bereitstellung des hydroxylierten Vitamin D₃-Derivates, 25-OH-Vitamin D₃, genutzt werden. Die Hydroxylaseaktivität des CYP105A1 gegenüber Vitamin D wurde 2004 publiziert [Sawada *et al.*, 2004]. Basierend auf der Kristallstruktur des Enzyms [Suigimoto *et al.*, 2008] wurde eine Mutante des CYP105A1, CYP105A1 (R84A/R73V) mit gesteigerter Vitamin D 25-Hydroxylaseaktivität generiert [Hayashi *et al.*, 2008]. Als Wirtsorganismus zum Aufbau des Ganzzellsystems sollte das gram-positive Eubakterium *Bacillus megaterium* MS941 für die heterologe Expression von CYP105A1, sowie der verbesserten CYP105A1-Doppelmutante CYP105A1 (R84A/R73V) herangezogen werden. Die geeigneten Kultivierungsbedingungen sollten in einem Batch-Kulturverfahren ermittelt werden.

Sowohl Sulfonylharnstoffe - vor allem aber Vitamin D - stellen aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften eine große Herausforderung für eine Anwendung in wässrigem Kulturmilieu dar. Daher sollten die Aspekte der Bioverfügbarkeit und der Permeabilität der Substrate bei der Etablierung mit einbezogen werden.

Das homologe Redoxsystem aus dem Ursprungsorganismus *Streptomyces griseolus* ist bislang nicht vollständig charakterisiert und das gängige Elektronentransfersystem für *in vitro* Reaktionen mit CYP105A1 sind ein Ferredoxin und eine NADPH-abhängige Ferredoxin-Reduktase aus den Chloroplasten von *Spinacia oleracea*. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nach einem alternativen Elektronentransfersystem gesucht werden, um das kommerziell erhältliche Spinat-System für *in vitro*- und *in vivo*-Reaktionen mit CYP105A1 bzw. CYP105A1(R84A/R73V) zu ersetzen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller/ Vertrieb
Acetonitril, HPLC grade	VWR
Acrylamid/Bisacrylamid	National Diagnostics
Agarose	Biozym
5-Aminolävulinsäure-hydrochlorid	Fluka
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich
Ampicillin	Serva
bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Brilliant Blue G	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Appligene
CaCl ₂	zChL
Chloramphenicol	Roth
Chloroform, HPLC grade	Sigma Aldrich
4-Chloro-2-naphtol	Acros Organics
D(+)-Glukose	Roth
Dextrose	Sigma Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	VWR
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Essigsäure 100%	zChL
Ethanol, HPLC grade	Sigma Aldrich
Ethylacetat	Sigma Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure, di-Natriumsalz (EDTA)	Roth
Gelred Nucleic acid Gel stain 10000x	VWR
Glibenclamid	Sigma Aldrich
Gliclazid	Sigma Aldrich
Glimepirid	Sigma Aldrich
Glipizide	Sigma Aldrich
Glukose-6-Phosphat	Roche
Glycin	VWR
Glycerin	zChL
Imidazol	Merck
Immersion Öl ne23 = 1,518	Leica
Isopropanol	Acros Organics
Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid (IPTG)	Acros Organics

Kaliumchlorid	VWR
Kaliumdihydrogenphosphat	Grüssing
Kaliumhydroxid	zChL
Kaliumsulfat	zChL
Kohlenstoffmonoxid	Messer Griesheim
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich
Magnesiumsulfat	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Methanol, HPLC grade	Sigma Aldrich
Methanol 99%	zChL
Magermilchpulver	Frema
MOPS	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
NAD ⁺	Gerbu
NADH	Gerbu
NADP ⁺	Gerbu
NADPH	Gerbu
Natriumchlorid	MP Biomedicals
Natriumdesoxycholat	Serva
Natriumdithionit	Fluka
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Ninhydrin-Färbereagenz nach Stahl	Sigma Aldrich
PCR-dNTP-Mix	Q-Biogene
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva
Protein Marker peqGold	PEQLAB
Saponin von Quillaja saponaria	Sigma Aldrich
Smartladder DNA Marker	Eurogentec
Stickstoff	Messer Griesheim
Tetracyclin	Roth
Tris-hydrochlorid (Tris)	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth
Tween 20	Merck
Tween 80	Merck
Vitamin D ₃	Sigma Aldrich
25-OH-Vitamin D ₃	Sigma Aldrich
Wasserstoffperoxid 30%	Fluka
Xylose	Sigma Aldrich

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Cyclodextrinderivate

Cyclodextrinderivat	Hersteller/Vertrieb
α -Cyclodextrin	Sigma Aldrich
β -Cyclodextrin	Sigma Aldrich
β -Hydroxypropyl-Cyclodextrin (HP-beta-CD)	Sigma Aldrich
RAMEB (randomly methylated β -Cyclodextrin)	AK Prof. Dr. G. Wenz, Institut für Makromolekulare Chemie, Universität des Saarlandes
γ -Cyclodextrin	Sigma Aldrich

2.1.2. Restriktionsendonukleasen, Enzyme und Antikörper

Tabelle 2.3: Übersicht über verwendete Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme

Enzym	Hersteller/ Vertrieb
<i>Bam</i> HI	New England Biolabs
<i>Bs</i> RGI	New England Biolabs
<i>Eco</i> RI	New England Biolabs
<i>Kpn</i> I-HF	New England Biolabs
<i>Mlu</i> I	New England Biolabs
<i>Nco</i> I	New England Biolabs
<i>Nde</i> I	New England Biolabs
<i>Sac</i> I-HF	New England Biolabs
<i>Spe</i> I	New England Biolabs
<i>Sph</i> I-HF	New England Biolabs
Phusion-DNA-Polymerase	New England Biolabs / Finnzymes
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Roche
Alkohol-Dehydrogenase	Roche
DNAseI	Roche
Lysozym	Serva
T4-Ligase	Epicentre Biotechnologies

Tabelle 2.4: Übersicht über verwendete polyklonale Antikörper

Antikörper	Hersteller/ Vertrieb
Kaninchen Anti-CYP105A1	Charles River
Kaninchen-Anti-Arh1	Charles River
Kaninchen-Anti-Etp1 ¹⁰	Charles River
Schaf-Anti-Kaninchen	Dako Denmark

Arh_BM_a (for)	GGTACCAAATCAAGGAGGTGAATATACAATGTCTACACAA ACATCTTCACCTGTAGTCGGC
Arh_BM_b (rev)	GAGCTCATTTCACCTGTAGTCGGC
MCS Bmeg for	GCTAGCTGATGGATAAACTTG
MCS Bmeg rev	GCAAGAATTAATTAGCTCCAATTC

2.1.5. Bakterienstämme

Tabelle 2.8: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

<i>E.coli</i>	Genotyp	Referenz
<i>E.coli</i> JM 109	e14 ⁻ (McrA ⁻) <i>recA1 gyrA96 thi1 hsdR17</i> (<i>k_K⁻ m_K⁺</i>) <i>supE44 relA1</i> (<i>lac-proAB</i>) [F ⁺ <i>traD36 proAB lacI^fZ M15</i>]E7#9	Stratagene, [Sambrook und Russel, 2001]
<i>E.coli</i> BL21	<i>E. coli</i> B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> [<i>malB⁺</i>] _{K-12} (λ ^S)	Stratagene
<i>E.coli</i> Top10 F ⁻	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 mipG</i>	Invitrogen
<i>B.megaterium</i>	Genotyp	Referenz
<i>B.megaterium</i> MS941	Δ <i>nprM</i>	[Wittchen <i>et al.</i> , 1995]

2.1.6. Säulenmatrices

Tabelle 2.9: Übersicht über die verwendeten Säulenmaterialien

Säulenmaterial	Hersteller
Source Q 30	GE Healthcare
Talon [®] Metal Affinity Resin	Clontech
Superdex 200 prep grade	Pharmacia Biotech
HPLC-Säule RP 18 Nucleodur 18 C	Macherey & Nagel
Kieselgel 60 (35 – 70 μM)	zChL

2.1.7. Puffer, Medien, Gele und Lösungen

Tabelle 2.10: Übersicht über die verwendeten gängigen Komplex-Nährmedien und Mediumkomponenten zur Kultivierung von Bakterien

Medium	Hersteller/ Vertrieb
LB	Difco
Trypton	Difco
Hefeextrakt	Difco
Hefeextrakt	Fluka
Antibiotic Medium 3	Difco
Bacto Casamino-Acids	Difco
Agar-Agar	Roth

Tabelle 2.11: Übersicht über die verwendeten zusammengesetzten allgemeinen Kulturmedien

Medien	Bestandteile	Menge/Konzentration
SOC	Bacto Trypton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	NaCl	10 mM
	Glukose	20 mM
	dH ₂ O	ad 1000 ml
TB	Trypton	12 g
	Hefeextrakt	24 g
	Glycerin	4 ml
	1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4	100 ml
	dH ₂ O	ad 1000 ml

Tabelle 2.12: Übersicht über die Medien und Lösungen zur Transformation von *B.megaterium*

Medien	Bestandteile	Menge/Konzentration
Antibiotic-Medium 3	Rinderextrakt	1,5 g
	Hefeextrakt (Fluka)	1,5 g
	Pepton	5 g
	Dextrose	1 g
	NaCl	3,5 g
	Dikaliumphosphat	3,68 g
	Monokaliumphosphat	1,32 g
2 x SMM-Lösung pH 6,8	Maleinsäure	1,16 g (0,04 M)
	NaOH	0,8 g (0,08 M)
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	2,03 g (0,04 M)
	Saccharose	85,58 g (1 M)
	dH ₂ O	ad 250 ml
SMMP	2 x Antibiotic 3 Medium	25 ml
	2 x SMM	25 ml
PEG-P	PEG-6000	20 g
	1 x SMM	ad 50 ml
CR5-Topagar Lösung A pH 7,3	Saccharose	51,5 g
	MOPS	3,25 g
	NaOH	0,3 g
	dH ₂ O	ad 250 ml
CR5-Topagar Lösung B	Agar	2 g
	Casamino Acids	0,1 g
	Hefeextrakt	5 g
	dH ₂ O	142,5 ml
8 x CR5 Salze	Kaliumsulfat	1,25 g
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	50 g
	Kaliumdihydrogenphosphat	0,25 g
	Kalziumchlorid	11 g
	dH ₂ O	625 ml
12 % Prolin	Prolin	3 g
	dH ₂ O	ad 25 ml
20 % Glukose	Glukose	20 g
	dH ₂ O	ad 100 ml
CR5-Topagar	CR5-Topagar Lösung A	1,75 ml
	CR5-Topagar Lösung B	1 ml
	CR5-Salze	346 µl
	12 % Prolin	175 µl
	20 % Glukose	175 µl

Tabelle 2.13: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen zur SDS-PAGE

Puffer-Bezeichnung	Bestandteile	Menge/Konzentration
SDS-Probenpuffer	Tris-HCl, pH 6,8	375 mM
	β-Mercaptoethanol	5 %
	Natriumdodecylsulfat	6 %
	Bromphenolblau	0,03 %
	Glycerin	30 %
4 x Lower-Tris-Puffer	Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M
	Natriumdodecylsulfat	4 %
4 x Upper-Tris-Puffer	Tris HCl, pH 6,8	0,5 M
	Natriumdodecylsulfat	4 %
Trenngel (15 %)	4x Lower-Tris Puffer	3,75 ml
	30 % Acrylamid/ Bisacrylamid	7,50 ml
	10 % Amoniumpersulfat	75 µl
	TEMED	7,5 µl
	dH ₂ O	ad 15 ml
Sammelgel (10 %)	4x Upper-Tris Puffer	2,50 ml
	30 % Acrylamid/ Bisacrylamid	1,60 ml
	10 % Amoniumpersulfat	50 µl
	TEMED	5 µl
	dH ₂ O	ad 10 ml
SDS-Elektrophoresepuffer	Tris-HCl, pH 8,3	25 mM
	Natriumdodecylsulfat	0,1 %
	Glycin	250 mM
Coomassie-Färbelösung	Brilliant blue G	0,1 %
	Methanol	50 %
	Essigsäure	10 %
Coomassie-Entfärbelösung	Methanol	10 %
	Essigsäure	10 %

Tabelle 2.14: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen zur Western-Blot-Analyse

Puffer-Bezeichnung	Bestandteile	Menge/Konzentration
Transferpuffer	Glycin	39 mM
	Tris/Cl pH 8,3	48 mM
	SDS	0,038 %
	Methanol	20 %
TBS-Puffer	Tris-Base, pH 7,5	50 mM
	NaCl	200 mM
	Tween 20	0,1 %
PBS-Puffer	KPP-Puffer, pH 7,4	10 mM
	NaCl	150 mM
Blocking-Lösung (3 %)	TBS-Puffer	30 ml
	Magermilchpulver	1 g
PBS-Färbelösung	PBS-Puffer	25 ml
	4-Chloro-1-Naphttol	6 mg
	H ₂ O ₂ 30 %	10 µl

Tabelle 2.15: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen zur Agarosegelelektrophorese

Puffer-Bezeichnung	Bestandteile	Menge/Konzentration
10 x TBE-Puffer	Tris-Base	1340 mM
	Borsäure	450 mM
	EDTA	25 mM
	dH ₂ O	ad 1000 ml
Gelladepuffer	Bromphenolblau	2,5 mg
	Xylen-Zyanol	2,5 mg
	Glycerin	300 µl
	dH ₂ O	ad 1000 µl
Agarosegel (1 %)	Agarose	10 g
	dH ₂ O	ad 1000 ml

Tabelle 2.16: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen zur Proteinchromatographie

Puffer-Bezeichnung	Bestandteile	Menge/Konzentration
Lysepuffer <i>B. megaterium</i> (A)	Tris/HCl pH 8	100 mM
	EDTA	20 mM
	Lysozym	5 mg/ml
Lysepuffer <i>E. coli</i> (B)	KPP pH 8	50 mM
	EDTA	1 mM
	Natriumchlorid	20 mM
	DTE	0,1 mM
Anionen- austauschchromatographie- Elutionspuffer (C)	KPP pH 8	50 mM
	EDTA	1 mM
	Natriumchlorid	300 mM
Gelfiltrationspuffer (D)	KPP pH 7,4	10 mM
	Glycerol	20%
IMAC-Lyse/Wasch-Puffer (E)	KPP pH 8,0	50 mM
	Imidazol	10 mM
	Natriumchlorid	300 mM
IMAC-Elutionspuffer (F)	KPP pH 8,0	50 mM
	Imidazol	150 mM
	Natriumchlorid	300 mM

2.1.8. Geräte

Tabelle 2.17: Geräte

Gerät	Hersteller/ Vertrieb
Agarosegelelektrophorese Apparatur Gene Power Supply ECPS 3000/150	Bio-Rad
AS 950 Intelligent Sampler HPLC	Jasco
Autoklav VX-150	Systec
Brutschrank „Excella 25“	New Brunswick Scientific
Chromatographieanlage	Pharmacia Biotec LKB GP 10
Detektor HPLC: UV-975 intelligent UV/VIS-detector	Jasco
Eismaschine	Ziegra
Elektroporator „ Easyject Prima“	Equibio
Feinchemikalienwaage SBC-31	Scaltec
Fraktionssammler	Pharmacia Biotech FRAC-100
Gastor GT-103 HPLC	Laboc
Geltrockner „Gel dryer model 583“	Bio-Rad
Industriefön Typ 3481	Steinel

Kühlbad FBC 620	Fischerbrand
Kühlschrank 4°C	Electrolux
Kühlschrank –20°C	Electrolux
Kühlschrank –80°C Forma Scientific –86C Freezer	Heraeus
Magnetrührer RCT Basic	IKA Labortechnik
Membran Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH
Molecular Imager ChemiDocTMXRS+	Bio-Rad
Mikrowellengerät Severin 700	Severin
Mikroskop Typ 020-519-010 LB30T	Leica
Netzgerät Agarosegelelektrophorese Powerpac 300	Bio-Rad
Netzgerät SDS-Gelelektrophorese ECPS 3000/150	Pharmacia
PCR Thermocycler PeltierThermal Cycler DNA Engine	Bio-Rad
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Quarzküvetten	Hellma
Rotationsverdampfer Rotivapor R-114	Büchi
Sampler HPLC: AS-950 intelligent sampler	Jasco
Säulenofen	Techlab
Speedvac Univapo 100 H	RS Laborgeräte
Spektralphotometer (Zweistrahl)	Shimadzu UV-2101PC
Schüttelinkubator innova 4230	New Brunswick Scientific
SDS-Elektrophoresekammer Mighty small II	Hoefer
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge Picofuge HF-120 und A14	Stratagene; Jouan
UP-980 intelligent HPLC-Pumpe	Jasco
Ultraschallgerät Sonopuls	Bandelin
Ultraschallbad Sonorex Super RK 510 H	Bandelin
Ultrazentrifuge himac CP75ß	Hitachi
UV/Vis-Spektralphotometer UV2101 PC	Shimadzu
Vortex REAX 2000	Heidolph
Waage SBA 62	Scaltec
Waage KB 600-2	Kern
Wasserbad Haake B3	Haake
Wasserbad B-480	Büchi
Western-Bloteinheit Transblot SD Cell	Bio-Rad
Western-Blot-Spannungsquelle PowerPac HC	Bio-Rad
Zentrifuge J2-21 (Rotor JA 81000)	Beckmann
Zentrifugen 2K15, 3K30 (Rotoren: 12153, 19776, 19777)	Sigma
Inkubator Excella E 25	New Brunswick Scientific

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geht auf die von Kary B. Mullis entwickelte *in vitro*-Methode zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten zurück [Mullis *et al.*, 1986]. In Tabelle 2.18 ist das Pipettierschema eines PCR-Ansatzes zur Amplifizierung der in dieser Arbeit verwendeten Gene gezeigt.

Tabelle 2.18: Zusammensetzung der PCR-Reaktion

Komponente	Konzentration/Menge
DNA-Template	100 ng
Primer for	10 pmol
Primer rev	10 pmol
dNTP-Mix	200 μ M
Phusion Puffer HF 5x	10 μ l
Phusion-Polymerase	1 U
dH ₂ O	ad 50 μ l

95° C	5 min	
95° C	1 min	} 29 x
55° C	20 s	
72° C	1 min	
72° C	3 min	
4° C	∞	

Abbildung 2.1: PCR-Programm zur Amplifikation von CYP105A1

Das gezeigte PCR-Programm wurde zur Amplifikation von CYP105A1 und Arh1 verwendet. Zur Amplifikation von Etp1^{fd} (516-618) wurde dieses Programm durch eine reduzierte Amplifikationszeit von 10 Sekunden abgeändert.

2.2.2. Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte via Spektralphotometer. Die Konzentration der DNA wurde über das Absorptionsmaximum der Basen bei 260 nm berechnet. Eine OD₂₆₀ = 1 wurde einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml gleichgesetzt [Hagemann, 1990].

2.2.3. Restriktionsverdau

Für einen Restriktionsverdau wurde eine DNA-Menge von 250 ng und 1 U der entsprechenden Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Die Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.4. Ligation

Die Ligation wurde in einem Thermocycler unter Verwendung des „T4-Fast-Link™ DNA Ligation Kit“ (Epicentre Biotechnologies) mit folgendem Programm durchgeführt:

16° C	15 min
20° C	15 min
70° C	15 min

Abbildung 2.2: Thermocycler-Programm der Ligation.

Die Ligationsreaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Überprüfung der Ligation wurden elektrokompetente *E.coli* Top10 F' Zellen mit dem Reaktionsansatz transformiert und auf dem entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert. Einzelne Klone wurden isoliert, in 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde via Mini-Präparation isoliert. Nach der Durchführung eines Kontrollverdaus wurde die DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

2.2.5. TOPO-Klonierung

Die TOPO-Klonierung wurde zur Zwischenklonierung von PCR-Amplifikaten verwendet und wurde mithilfe des „Blunt End TOPOcloning Kits“ nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.6. Mutationsreversion des optimierten Genes CYP105A1 (R84A/R73V)

Zur Bearbeitung der Aufgabenstellung wurde für die Umsetzung der Sulfonylharnstoffe der CYP105A1 Wildtyp und für die Umsetzung von Vitamin D die CYP105A1 (R84A/R73V)-Variante verwendet. Das Gen zur heterologen Expression in *Bacillus megaterium* wurde von der Firma Geneart mit den Mutationen R73V und R84A synthetisiert. Daher wurde eine Reversion der Mutationen für die Anwendung des Ganzzellsystems mit den Sulfonylharnstoffen unter Verwendung folgender PCR-Strategie durchgeführt (Abbildung 2.3):

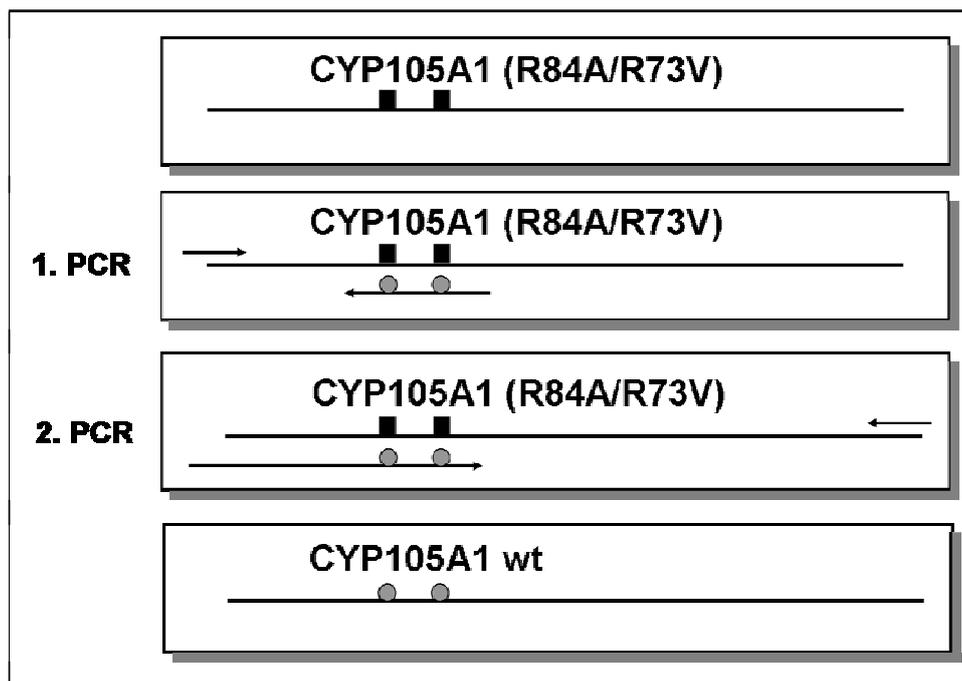


Abbildung 2.3: PCR-Methode zur Reversion der Mutationen R84A/R73V des synthetisierten CYP105A1 (R84A/R73V) Gens zur heterologen Expression des CYP105A1-Wildtyps in *B. megaterium*. Die Mutationen wurden im Zuge der Gensynthese in Anlehnung an die Vitamin D₃-Hydroxylierung eingeführt.

In einer 1. PCR-Reaktion wurde der Reverseprimer „105 B.meg reversion rev“ verwendet, der beide Informationen für den Aminosäureaustausch für die Wildtyp-Reversion beinhaltet. In Kombination mit dem Vorwärtsprimer „105 B.meg reversion for“ wurde ein Fragment amplifiziert, welches in einem 2. PCR-Schritt als Vorwärtsprimer verwendet wurde. Das amplifizierte Fragment wurde in einen TOPO-Vektor integriert und konnte durch Sequenzierung als CYP105A1-Wildtyp bestätigt werden.

2.2.7. Klonierung von CYP105A1 (R84A/R73V) für *in vitro*-Studien

Als DNA-Template diente das für *Bacillus megaterium* optimierte Synthesegen CYP105A1 (R84A/R73V) (Geneart). Obwohl das Gen im Zuge der Synthese an den GC-Gehalt und die *codon usage* von *Bacillus megaterium* angepasst wurde, wurde es auch zur Expression in *E.coli* in den pKKHC-Expressionsvektor [Porter und Larson, 1991] kloniert.

2.2.8. Plasmidpräparation

2.2.8.1. Kultivierung von *E.coli* Top10 F' zur Plasmidamplifikation

Eine mit dem gewünschten Plasmid transformierte *E.coli* Top10 F' Kultur (50 ml Kulturmaßstab für Midi-Präparation bzw. 2-5 ml Kulturmaßstab für Mini-Präparation)

wurde 8 Stunden bei 37° C und 200 rpm angezogen. Anschließend wurde Chloramphenicol im Verhältnis 1:1000 zur Kultur gegeben [Sambrook und Russel, 2001]. Bis zur Zellernte wurden die Ansätze weitere 16 Stunden unter den selben Bedingungen kultiviert. Zur DNA-Präparation wurde das Nucleobond AX Plasmid-Midiprep-Kit der Firma Macherey & Nagel verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden gemäß Hersteller Protokoll durchgeführt.

2.2.8.2. Plasmid-Mini-Präparation aus *E.coli*-Kulturen

Zur Mini-Präparation wurde das „Nucleospin Extract II Kit“ (Macherey & Nagel) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden gemäß Hersteller Protokoll durchgeführt.

2.2.8.3. Plasmid-Mini-Präparation aus *Bacillus megaterium*-Kulturen

Da es sich bei *Bacillus megaterium* um einen gram-positiven Mikroorganismus handelt, wurden die Zellen vor der Präparation mit Lysozym behandelt. Dazu wurde eine Lysozym-Lösung (5 mg/ml) mit dem Lysepuffer (Macherey & Nagel) hergestellt. Der Lyseansatz wurde 30 Minuten bei 37° C in einem Eppendorfschüttelinkubator inkubiert. Alle weiteren Schritte verliefen analog zu den herkömmlichen DNA-Präparationen.

2.2.9. DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung eines 1 %igen Agarosegels wurde 1g Agarose in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer in einer Mikrowelle (600 W) aufgekocht. Die Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit Gelladepuffer vermischt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80 V. Die Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mithilfe des DNA-Farbstoffes „Gelred Nucleic acid Gel stain 10000x“ und eines UV-Transilluminators. Die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde anhand eines DNA-Markers (Smart Ladder) abgeschätzt.

2.2.10. DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen der DNA-Konstrukte wurde von der Firma MWG Eurofins durchgeführt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit der theoretischen Sequenz über das Sequenz-Alignment-Programm BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verglichen.

2.3. Mikrobiologische Methoden

2.3.1. Wachstumsmessung von Bakterien

Das bakterielle Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ (*E.coli*) oder $\lambda = 578 \text{ nm}$ (*B. megaterium*) [Barg et al. 2005] in einem Zweistrahlenspektralphotometer (UV-2101 PC, Shimadzu) verfolgt. Die zu untersuchenden Zellsuspensionen bzw. Verdünnungen dieser Zellsuspensionen wurden gegen unbeimpftes Nährmedium als Referenz gemessen.

2.3.2. Transformation von kompetenten Bakterienzellen

2.3.2.1. Transformation elektrokompetenter *E.coli* Zellen

Zu 25 μl elektrokompetenter *E.coli* Top10 F' Zellen (Invitrogen) wurde dialysierte DNA-Lösung (1 Stunde gegen steriles 10% Glycerin) gegeben. Die Elektroporation erfolgte in einer 0,1 cm Elektroporationsküvette (PEQLAB) bei einer Spannung von 1800 V mit dem Elektroporator *Easyjekt Prima*. Zum Transformationsansatz wurden 500 μl auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben bevor der Ansatz eine Stunde bei 37°C in einem Thermoschüttler bei 600 rpm inkubiert wurde. 50 μl der Suspension wurden auf Selektionsagar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.3.2.2. Transformation von *Bacillus megaterium* MS941 [Barg et al. 2005]

2.3.2.2.1. Herstellung von *Bacillus megaterium* Protoplasten

Mit 1 ml einer *Bacillus megaterium* MS941 über Nacht Kultur wurde 50 ml LB-Medium in einem 300 ml Schikanekolben beimpft und bei 37° C und 250 rpm kultiviert. Bei einer OD_{578 nm} = 1 wurden die Zellen bei 5000 rpm (Rotor 19776) für 15 Minuten zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde dekantiert und die Zellen in 5 ml SMMP-Medium resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 μl einer sterilfiltrierten Lysozym-Lösung (10 mg/ml Lysozym in SMMP) mit anschließender Inkubation bei 37° C im Brutschrank. Das Stadium der Protoplastierung wurde alle 5 Minuten mikroskopisch überprüft. Nachdem ca. 80 % der Zellen in protoplastiertem Zustand vorlagen, wurde der Ansatz bei 3000 rpm (Rotor 19777) bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 5 ml SMMP-Medium resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde einmal wiederholt. Zu dem Ansatz wurde 750 μl Glycerin (87 %) gegeben. Aliquots von je 500 μl wurden bis zur Transformation bei – 80°C gelagert.

2.3.2.2.2. PEG-gesteuerte Transformation von *Bacillus megaterium*

Zur Protoplasten-Transformation wurde 2,5 µg DNA in 20 µl SMMP-Medium gelöst. Zu der DNA-Lösung wurde 500 µl Protoplasten-Suspension gegeben. 1,5 ml PEG-P wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Die DNA/Protoplasten-Suspension wurde vorsichtig in die PEG-P-Lösung überführt. Der Ansatz wurde gemischt und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 5 ml SMMP-Medium wurde die Suspension bei 3000 rpm (Rotor 19777) bei Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert. Das Pellet wurde in 500 µl SMMP-Medium resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde für 45 Minuten bei 30° C und dann weitere 45 Minuten unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert.

Pro Ansatz wurden 3,5 ml CR5-Topagar vorbereitet, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und im Wasserbad bei 41°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde in den flüssigen Topagar überführt und vorsichtig gemischt.

Der Agar mit den Zellen wurde dann auf eine vorgewärmte LB-Platte entleert und verteilt. Die Platte wurde bei 30 °C über Nacht inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden erneut auf LB-Platten ausgestrichen und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Konzentration des Selektionsmarkers Tetracyclin betrug 10 µg/ml. Einzelne Klone wurden durch eine DNA-Reisolation mit anschließendem Restriktionsverdau auf das Vorhandensein des gewünschten DNA-Konstruktes untersucht.

2.3.2.3. Batch-Kultivierung von *Bacillus megaterium* MS941

Die Kultivierung bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 180 rpm wurde in 300 ml Schikanekolben durchgeführt. Mit 500 µl einer entsprechenden *B. megaterium* MS941 Vorkultur wurde 50 ml Hauptkultur in entsprechendem Nährmedium (LB/TB) angeimpft. Allen Kulturen wurde Tetracyclin (10 µg/ml) zugegeben. Die Induktion erfolgte mit 5 mg/ml Xylose bei einer $OD_{578} = 0,4$. Die Substratzugabe erfolgte nach individuellen Gesichtspunkten.

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Expression von CYP105A1, CYP105A1 (R84A/R73V), Arh1 und Etp1^{fd} (516-618) in *E.coli*

Mit 10 ml einer über Nacht Vorkultur der entsprechenden Transformanden (Tabelle 2.20) wurde 1 L Hauptkultur angeimpft. Der Selektionsmarker Ampicillin wurde im Verhältnis 1:1000 zugegen (100 µg/ml). Die Induktion der Kultur erfolgte bei einer OD_{600 nm} = 0,9 durch die Zugabe von IPTG in der Endkonzentration von 1 mM. Bei der Expression von CYP105A1 wurde der Kultur zusätzlich das Häm-Vorläufermolekül δ -Aminolävulinat in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben. Die Zellernte nach der Expression erfolgte durch Zentrifugation bei 4000 g bei 4°C für 20 Minuten. Der Kulturüberstand wurde verworfen und das Bakterienpellet bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Die verwendeten Expressionsplasmide sind in Tabelle 2.19 aufgeführt. Die Expressionsbedingungen der Proteine im Einzelnen sind in Tabelle 2.20 zusammengefasst.

Tabelle 2.19: Expressionsplasmide zur heterologen Expression in *E.coli*

Protein	Plasmidbezeichnung	Referenz
CYP105A1 wt	pKKHC-CYP105A1 His	diese Arbeit
CYP105A1 (R84V/R73V)	pKKHC-CYP105A1 (R84A/R73V) His	diese Arbeit
Arh1	pTrc99A-arh1-A18Ghis	[Ewen <i>et al.</i> , 2008]
Etp1 ^{fd} (516-618)	pTrc99A- Etp1 ^{fd} (516-618)	[Schiffler <i>et al.</i> , 2004]

Tabelle 2.20: Expressionsbedingungen der Proteine CYP105A1, CYP105A1(R84A/R73V), Arh1 und Etp1^{fd} (516-618).

Protein	Expressions-Temp./-Zeit	Expressions-Wirt	Kolbentyp	Medium	Referenz
CYP105A1 wt+R84A/R73V	23-26° C, 48 h	<i>E.coli</i> JM109	Erlenmeyer	LB	[Hayashi <i>et al.</i> , 2008]
Arh1	30° C, 72 h	<i>E.coli</i> JM109	Schikane	TB	[Ewen <i>et al.</i> , 2008]
Etp1 ^{fd} (516-618)	37° C, 24 h	<i>E.coli</i> BL21	Erlenmeyer	LB	[Schiffler <i>et al.</i> , 2004]

Für die Expression von CYP105A1 sowie der Doppelmutante CYP105A1 (R84A/R73V) wurde in dieser Arbeit abweichend zur Literatur LB-Medium anstelle von TB-Medium [Sawada *et al.*, 2004] verwendet.

2.4.2. Präparation rekombinant exprimierter Proteine

2.4.2.1. Enzymatische Lyse von *E.coli*-Zellen

Der Zellaufschluss zur Präparation der heterolog exprimierten Proteine erfolgte mittels enzymatischer Lyse. Dazu wurde das Bakterienpellet in 50 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1,0 ml PMSF (10 mg/ml gelöst in Isopropanol) wurde die Suspension 10 min auf Eis gerührt. Die Zellwandlyse erfolgte durch Zugabe von Lysozym (5 mg/ml). Anschließend erfolgte die Zugabe von Natriumdesoxycholat (3-5 kl. Spatel in 2 ml Lysepuffer). Nach der Zugabe von 1 ml DNase I (2 mg/ml H₂O) wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 4°C mit 35.000 g zentrifugiert. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde zur chromatographischen Reinigung verwendet.

2.4.2.2. IMAC von CYP105A1, CYP105A1 (R84A/R73V) und Arh1

Alle Proteinreinigungen wurden bei 4°C mit der Chromatographieanlage Pharmacia Biotec LKB GP 10 durchgeführt.

Zur Reinigung der His-getaggten Proteine CYP105A1, CYP105A1 (R84A/R73V) und Arh1 wurde Talon Metal Affinity Resin[®] (Clontech) als Affinitätschromatographie-Matrix verwendet. Die 15 x 3 cm Säule wurde mit Puffer E äquilibriert und anschließend mit der löslichen Fraktion der entsprechenden Zellysate mit der Geschwindigkeit 1 ml/min beladen. Anschließend wurde die Säule mit drei Säulenvolumina Puffer E gewaschen. Die Elution der His-getaggten Proteine erfolgte durch Imidazol mit Puffer F (1 ml/min). Auch zur Elution von Arh1 wurde abweichend zur Literatur [Ewen *et al.*, 2008] Imidazol verwendet. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler in 3 ml Fraktionen gesammelt. Die vereinigten Fraktionen von CYP105A1, CYP105A1 (R84A/R73V) und Arh1 wurden mit Zentrifugenfiltern (Ausschlussgröße 30 kD) bei 4500 g für weitere chromatographischen Reinigungsschritte auf ein Volumen von 1,5 ml – 2 ml reduziert.

2.4.2.3. Anionenaustauschchromatographie von Etp1^{fd} (516-618)

Zur Präparation von Etp1^{fd} (516-618) aus dem *E.coli*-Lysat wurde der Anionenaustauscher Source Q30[®] als Säulenmatrix verwendet. Die 15 x 3 cm Säule wurde mit Puffer A äquilibriert. Die Elution, nach dem Spülen der Säule mit dreifachem Säulenvolumen, erfolgte über einen Gradienten mit ansteigender Natriumchlorid-Konzentration (Tabelle 2.21). Die Flussrate betrug 1 ml/min. Das Eluat wurde in 3 ml Fraktionen mit einem Fraktionskollektor gesammelt. Die vereinigten Fraktionen von Etp1^{fd} (516-618) wurden mit Zentrifugenfiltern (10 kD) bei 4500 g für die anschließende Gelfiltrationschromatographie (Vergl. 2.4.2.4) auf ein Volumen von 1,5 ml - 2 ml reduziert.

Tabelle 2.21: Etp1^{fd} (516-618) Elutionsgradient für die Anionenaustauschchromatographie

Elutionsvolumen (ml)	Puffer A (%)	Puffer B (%)
20	100	0
40	80	20
80	50	50
120	20	80
150	0	100
200	0	100

2.4.2.4. Gelfiltrationschromatographie von CYP105A1, CYP105A1 (R84A/R73V), Arh1 und Etp1^{fd} (516-618)

Nach der Anreinigung der CYP105A1-Varianten und des Arh1 via Affinitätschromatographie, sowie der Anreinigung von Etp1^{fd} (516-618) durch Anionenaustauschchromatographie, wurden die Proteine einer Gelfiltrationschromatographie unterzogen. Diese Maßnahme diente neben der Erhöhung des Reinheitsgrades auch der Reduktion des in der Affinitätschromatographie verwendeten Imidazols.

Als Säulenmatrix wurde Superdex 200 prep grade[®] verwendet. Das Säulenmaterial wurde mit Puffer D äquilibriert. Die 1 x 80 cm Säule wurde mit den entsprechenden vorgereinigten, auf maximal 2 ml reduzierten Proteinfractionen beladen und kontinuierlich mit Puffer D mit einer Flussrate von 0,2 ml/min gespült. Die Eluate wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt. Die vereinigten Fraktionen der Proteine wurden mit Zentrifugenfiltern auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die gereinigten Proteine wurden bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

2.4.3. UV/VIS-Spektroskopie

Zur Analyse der Reinheit und zur Konzentrationsbestimmung der heterolog exprimierten Proteine wurde ein UV/Vis-Spektrum in dem Wellenlängenbereich von 700 – 200 nm aufgenommen. Anhand der jeweiligen charakteristischen Absorptionsmaxima konnte die Konzentration der Proteine über das Lambert-Beersche-Gesetz errechnet werden. Die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ der Proteine sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Tabelle 2.22).

Tabelle 2.22: Molare Extinktionskoeffizienten der untersuchten Proteine.

Protein	Extinktionskoeffizient ϵ	Referenz
CYP105A1	$\epsilon_{417} = 110 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	[Sawada <i>et al.</i> , 2004]
CYP105A1 (R84A/R73V)	$\epsilon_{417} = 110 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	[Hayashi <i>et al.</i> , 2008]
Arh1	$\epsilon_{450} = 11,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	[Ewen <i>et al.</i> , 2008]
Etp1 ^{td} (516-618)	$\epsilon_{414} = 9,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$	[Schiffler <i>et al.</i> , 2004]

Durch die Bildung des Quotienten zwischen dem typischen Absorptionsmaximum des gereinigten Proteins mit dem Absorptionswert bei 276 nm wurde der Reinheitsgrad (Q-Wert) des Proteins ermittelt.

2.4.4. CO-Differenzspektrum

Der qualitative und quantitative Nachweis von aktivem Cytochrom P450 wurde mit Hilfe der CO-Differenzspektroskopie durchgeführt [Omura und Sato, 1964]. Eine Probe der zu untersuchenden CYP105A1 bzw. CYP105A1 (R84A/R73V) Lösung wurde mit 1 M KP-Puffer (pH = 7,4) auf 500 μl verdünnt. Nach der Reduktion mit Natriumdithionit wurde die Lösung auf zwei Quartzküvetten verteilt und im Zweistrahlenspektrophotometer eine Basislinie zwischen den Wellenlängen $\lambda = 400 - 500 \text{ nm}$ aufgenommen. Die Lösung einer Küvette wurde anschließend 30 Sekunden mit Kohlenmonoxid begast und gegen die Lösung der Referenzküvette vermessen. Anhand des charakteristischen Maximums bei der Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$ konnte die Proteinkonzentration mithilfe der Materialkonstanten ϵ (Tabelle 2.22) über das Lambert-Beersche-Gesetz berechnet werden.

2.4.5. Suche nach alternativen heterologen Redoxpartnern zur Unterstützung der CYP105A1-Reaktion

Zur Etablierung eines alternativen Redoxsystems für die CYP105A1-Reaktion, wurden verschiedene Ferredoxine und Ferredoxin-Reduktasen bezüglich ihrer Reduktionseffizienz von CYP105A1 untersucht. Für alle Experimente wurde eine Stoffmenge von 400 pmol CYP105A1 eingesetzt. Zunächst wurde mit dem Reduktionsmittel Natriumdithionit ein COD-Spektrum von CYP105A1 aufgenommen (Abbildung 2.4 A). Das resultierende Maximum bei der Wellenlänge $\lambda = 450 \text{ nm}$ wurde als Referenz auf 100 % festgelegt (= 100% Reduktion). Ziel war es zu untersuchen, mit welcher Redoxproteinkombination die festgelegte Stoffmenge von 400 pmol des Enzyms gemäß dieser Natriumdithionit-Kontrolle vollständig reduziert werden kann.

Dazu wurde Natriumdithionit durch unterschiedliche Kombinationen aus vorhandenen Ferredoxinen und Reduktasen mit NADPH als Elektronendonator ersetzt (Abbildung 2.4 B). Nach der Inkubation von CYP105A1 mit den entsprechenden Redoxproteinen und NADPH (100 μ M), wurden die Proben mit Kohlenmonoxid begast und die P450-Komplexbildung via Spektralphotometer verfolgt. Das anfängliche, willkürlich festgesetzte Verhältnis der Redoxpartner in diesem Test betrug 1:10:0,3 (CYP:Fdx:FdR). Alle Experimente wurden in einem 50 mM KP-Puffer mit 0,5% Tween 20 (pH=7,4) durchgeführt. Für die Natriumdithionit-Kontrolle wurde ein 1 M KP-Puffer (pH=7,4) verwendet.

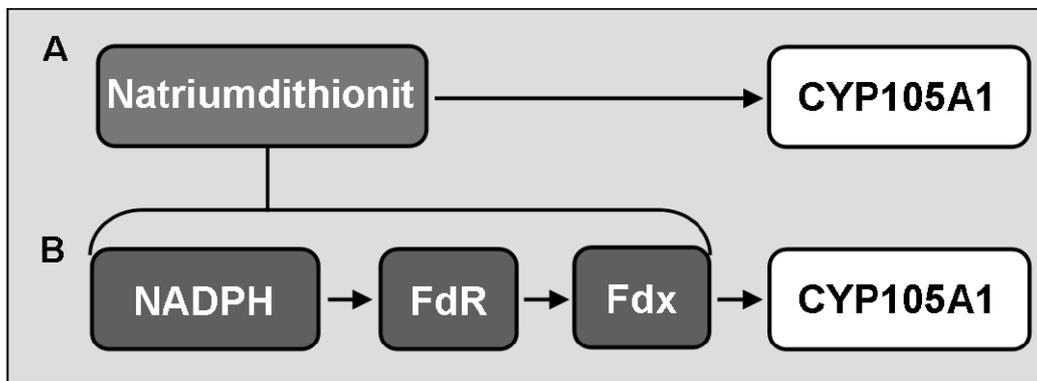


Abbildung 2.4: Schematischer experimenteller Aufbau zur Suche nach alternativen heterologen Redoxpartnern zur Unterstützung der CYP105A1-Reaktion. A) Chemische Reduktion des CYP105A1 durch Natriumdithionit, B) Enzymatische Reduktion des CYP105A1 durch unterschiedlich zusammengesetzte Redoxproteine mit NADPH als Elektronenquelle.

2.4.6. SDS-PAGE

Zur Proteinanalytik wurde eine diskontinuierliche Elektrophorese nach Laemmli durchgeführt [Laemmli, 1970]. Die Proteinproben wurden mit 2 x SDS-Gel-Ladepuffer gemischt und 5 Minuten in einem Wasserbad gekocht.

Die Elektrophorese wurde mit einer Stromstärke von 10 mA durchgeführt. Die Färbung erfolgte 60 Minuten in Coomassie-Färbelösung (0,1% Brilliant blue G, 50% Methanol und 10% Essigsäure) auf einem Taumelschüttler. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mit Entfärbelösung (10% Eisessig, 45% Methanol, 45% dH₂O). Die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine wurden anhand eines Proteinmarkers (Protein Marker peqGold PEQLAB) abgeschätzt. Der Proteinmarker ist im Anhang erläutert.

2.4.7. Western-Blot-Analyse der heterolog exprimierten Proteine in *Bacillus megaterium*

Zur Western-Blot-Analyse der heterolog exprimierten Proteine CYP105A1, Arh1 und Etp1^{fd} (516-618) wurden definierte Volumina der zu untersuchenden *B. megaterium*-Kulturen auf die OD_{578 nm} = 1 eingestellt und bei 6000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 2 ml Lysepuffer A resuspendiert und für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Das resultierende Lysat wurde bei 14000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und via SDS-PAGE aufgetrennt. Das SDS-Gel wurde zusammen mit der Nitrozellulose-Blotmembran 15 min in Transferpuffer inkubiert. Anschließend erfolgte der Blot bei 10 V; 0,12 A und 2W für 40 min. Die Blockierung unspezifischer Bindestellen wurde über Nacht mit 1 g Milchpulver in 30 ml TBS-Puffer auf einem Taumelschüttler durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen der Membran in TBS-Puffer wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper (1:1000) in TBS-Puffer für 2 Stunden inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-Puffer erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers im Verhältnis 1:500. Bei diesem handelte sich um einen mit Meerrettichperoxydase gekoppelten Schaf-anti-Kaninchen Antikörper. Nach Inkubation für 1 Stunde und zweimaligem Waschen der Membran mit PBS-Puffer wurde die kolorimetrische Färbereaktion der markierten Proteinbanden durch Zugabe von 4-Chlor-1-Naphtol (6 mg gelöst in 2 ml Ethanol) und 10 µl H₂O₂ initiiert.

2.5. Umsetzungsanalysen, Substratsolubilisierungen und Präparation der Hauptprodukte aus den Ganzzellumsetzungen

2.5.1. *In vitro*-Reaktionen

Die an der *in vitro*-Umsetzung beteiligten Komponenten sowie deren eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 2.23 aufgelistet.

Tabelle 2.23: Reaktionsbestandteile der *in vitro*-Umsetzungen mit CYP105A1 und CYP105A1 (R84A/R73V).

Reaktionskomponente	Konzentration
CYP105A1/ CYP105A1 (R84A/R73V)	1 μ M
Etp1 ^{td} (516-618)	20 μ M
Arh1	3 μ M
Substrat	50-500 μ M
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1 mM
NADPH, NADP ⁺ , NADH	1 mM
Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase	1 U
Glukose-6-Phosphat	5 mM
Katalase	0,25 U
KP-Puffer pH 7,4, 50 mM, 0,5% Tween 20	ad 250 μ l

Alle *in vitro*-Reaktionen wurden bei 30°C in einem Eppendorfschüttler bei 900 rpm durchgeführt. Die Reaktionen der Sulfonylharnstoffe wurden nach individuellen Zeitpunkten gestoppt und mit dem dreifachen Volumen Ethylacetat extrahiert. Die Extraktion von Vitamin D₃ und Metaboliten erfolgte mit dem vierfachen Volumen Chloroform/Methanol (3:1) [Sawada *et al.*, 2004, Hayashi *et al.*, 2010]. Nach der Entfernung des Lösemittels mithilfe eines Rotationsverdampfers wurden die Analyte in 100 μ l des entsprechenden Laufmittels (Tabelle 2.24) aufgenommen.

2.5.2. HPLC-Analyse

Als stationäre Phase wurde eine RP-Nucleodur 18 C Säule der Firma Macherey & Nagel verwendet. Um den Einfluss äußerer Temperaturschwankungen auf die Messungen zu umgehen, wurde die Säule vor den Messungen auf 40°C vorgeheizt. Die Flussrate bei der HPLC-Analyse betrug 1,0 ml/min. Es wurden jeweils 10 µl Probenvolumen injiziert. Die Laufmittelzusammensetzung zur Analyse der jeweiligen Verbindungen ist in Tabelle 2.24 zusammengefasst.

Tabelle 2.24: Absorptionsmaxima und Laufmittelzusammensetzung der untersuchten Substrate

Substrat	λ_{\max} (nm)	Laufmittelzusammensetzung
Vitamin D ₃	265	Acetonitril:Wasser 91:9
Glibenclamid	230	Acetonitril:Wasser 40:60 + 0,05% H ₃ PO ₄
Glimepirid	230	Acetonitril:Wasser 43:57 + 0,05% H ₃ PO ₄
Tolbutamid	230	Acetonitril:Wasser 30:70 + 0,05% H ₃ PO ₄
Gliclacid	230	Acetonitril:Wasser 40:60 + 0,05% H ₃ PO ₄
Glipizid	230	Acetonitril:Wasser 30:70 + 0,05% H ₃ PO ₄
Chlorpropamid	230	Acetonitril:Wasser 30:70 + 0,05% H ₃ PO ₄

2.5.3. Substratsolubilisierung mit Cyclodextrinen

Zur Erhöhung der Löslichkeit der hydrophoben Substrate wurden Cyclodextrine verwendet. Zunächst wurden gesättigte Lösungen der verwendeten Cyclodextrinderivate mit destilliertem Wasser hergestellt. Die Solubilisierung erfolgte durch Substratzugabe im Überschuss und Rühren der Lösungen über Nacht auf einem Magnetrührer [De Caprio *et al.*, 1992] bei Raumtemperatur (Sulfonylharnstoffe) bzw. 4°C (Vitamin D).

Zur Bestimmung der Solubilisierungseffizienz der einzelnen Cyclodextrine wurden die Lösungen via Cellulose-Mischester-Membran (CME) abfiltriert. Die Konzentration der gelösten Substanzen konnte nach spektralphotometrischer Bestimmung der Absorptionsmaxima über das Lambert-Beersche-Gesetz berechnet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Cyclodextrine zeigen keine Absorption im UV/Vis-Spektrum. Der Ablauf der Durchführung einer Substratsolubilisierung ist in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt.

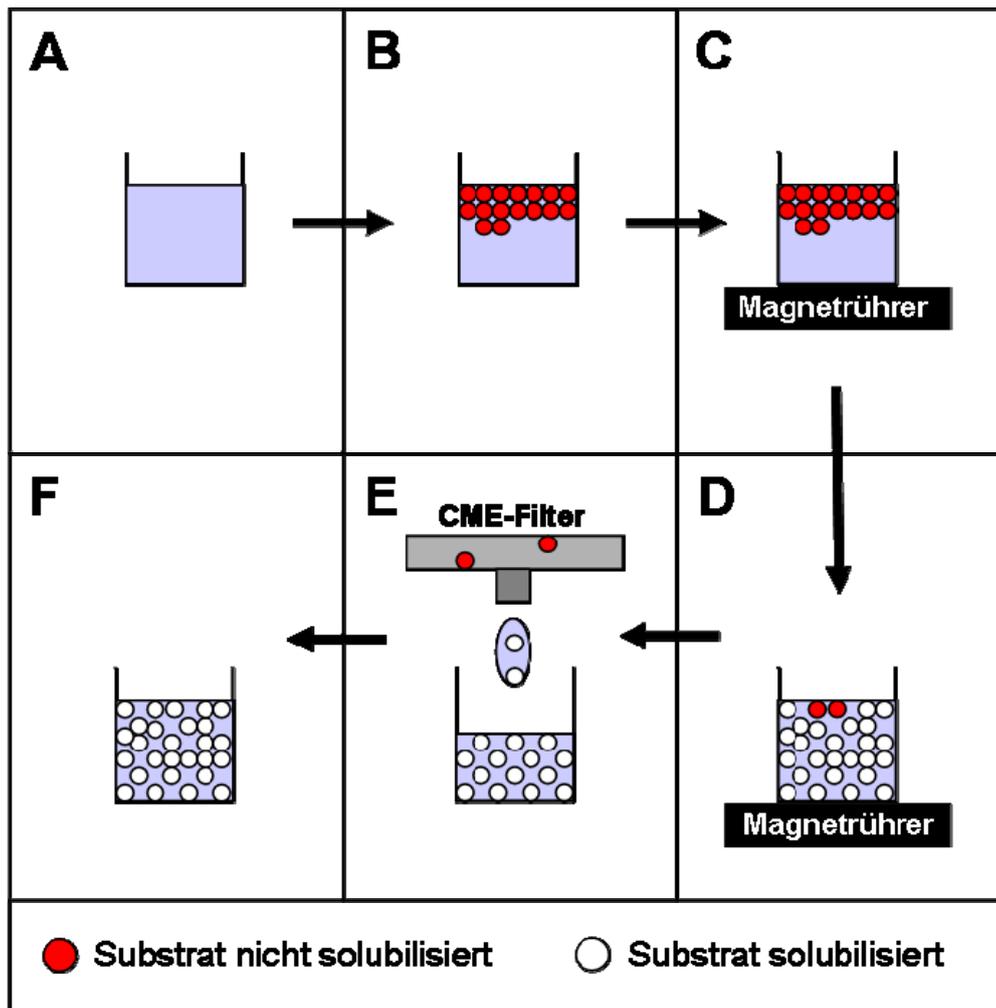


Abbildung 2.5: Durchführung einer Substratsolubilisierung. A) Herstellen einer gesättigten Cyclodextrinlösung, B) Substratzugabe im Überschuss, C, D) Rühren der Suspension, E) Filtration der Lösung durch eine CME-Membran, F) das Filtrat enthält das solubilisierte Substrat in Form von Cyclodextrin-Substrat-Komplexen.

2.5.4. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ von Glimepirid und Glibenclamid

Zur Berechnung von Konzentrationen einer Verbindung über das Lambert-Beersche-Gesetz, wird der molare Extinktionskoeffizient ϵ dieser Verbindung benötigt. Zur Bestimmung dieser Materialkonstante von Glibenclamid und Glimepirid wurde eine Verdünnungsreihe der jeweiligen Substrate angefertigt und via Spektralphotometer zwischen dem Wellenlängenbereich 200 – 300 nm aufgenommen. Mit den Absorptionsmaxima bei 230 nm der jeweiligen Spektren wurde eine Bestgerade mithilfe des Programms Origin pro 8.1 G ermittelt. Die Steigung dieser Bestgeraden gibt den molaren Extinktionskoeffizient ϵ der jeweiligen Substanz an. Die Verdünnung von Glibenclamid erfolgte in Methanol und die von Glimepirid in Acetonitril.

2.5.5. Fermentation der Sulfonylharnstoffe Glimepirid und Glibenclamid und Reinigung der Produkte zur NMR-Analyse

2.5.5.1. Kultivierung von *Bacillus megaterium* MS941 zur Ganzzellbiotransformation

Mit 2 ml Vorkultur des entsprechenden rekombinanten *B.megaterium* MS941-Systems wurden 5 x 200 ml Liter Hauptkultur in TB-Medium angeimpft. Allen Kulturen wurde Tetracyclin (10 µg/ml) als Selektionsmarker hinzugegeben. Die Induktion erfolgte mit 5 g Xylose und 0,084 mg δ-Ala pro Liter Kultur bei einer $OD_{578} = 0,4$. Nach 24 Stunden Expressionszeit bei 30 °C erfolgte die Zellernte bei 4000 g für 20 Minuten. Die Zellpellets wurden vereinigt und in 800 ml LB-Medium resuspendiert. Die Substrate Glimepirid (45 mg) und Glibenclamid (100 mg) wurden jeweils in 10 ml DMSO gelöst und zum Kulturmedium gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 4 Stunden (Glimepirid) bzw. 24 Stunden (Glibenclamid), wurden die Kulturen zentrifugiert (4000 g, 20 Minuten) und der Überstand mit dreifachem Volumen Ethylacetat extrahiert. Die Extrakte wurden mittels Rotationsverdampfer getrocknet und bis zur Weiterverarbeitung bei – 20 °C gelagert.

2.5.5.2. Reinigung der hydroxylierten Produkte aus den Glimepirid und Glibenclamid Umsetzungen

Zur Reinigung der Substanzen wurde eine Kieselgel-Säule verwendet. Das Säulenmaterial wurde mit Chloroform/Methanol (93:7) aufgeschlemmt.

Die getrockneten Extrakte der Ganzzellumsätze wurden in 2 ml Chloroform/Methanol (93:7) gelöst und auf die Säule gegeben. Fraktionen von 2 - 10 ml wurden gesammelt und mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Ninhydrinfärbung auf das Vorhandensein potentieller Produkte untersucht. Alle Fraktionen mit positivem Ninhydrinsignal bei der erwarteten Laufstrecke wurden zur Gegenkontrolle via HPLC untersucht. Zu dieser Analytik wurde eine RP-Nucleodur 18 C-Säule bei 40°C Säulentemperatur verwendet. Die Laufgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Die reinsten Fraktionen wurden daraufhin vereinigt, getrocknet und zur Strukturaufklärung durch NMR verwendet.

2.5.6. NMR-Analyse der Haupt-Produkte der CYP105A1-abhängigen Glimepirid und Glibenclamid-Umsetzung

Die NMR-Messung der Produkte sowie die Auswertung der Strukturdaten wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Josef Zapp (Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität des Saarlandes) durchgeführt. Die NMR-Spektren wurden in DMSO- d_6 mit einem Bruker DRX 500 NMR-Spektrometer aufgenommen [Kleser *et al.*, in press].

2.5.7. Bioinformatische Methoden

Die Docking-Experimente wurden freundlicherweise von Herrn PD. Dr. M. Hutter (Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität des Saarlandes) durchgeführt. Als Voraussetzung für das Substrat-Docking diente die 2008 publizierte Kristallstruktur von CYP105A1 [Sugimoto *et al.*, 2008]. Als Docking-Tool wurde das Programm HYPERCHEM. AUTODOCK (version 4.00) verwendet [Kleser *et al.*, in press].

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung eines CYP105A1-Assays zur Durchführung von *in vitro*-Studien

3.1.1. Klonierung, Expression und Reinigung von CYP105A1 und CYP105A1 (R84A/R73V)

Mit dem Cytochrom P450 CYP105A1 sollten auf Sulfonylharnstoffen basierende Arzneimittelwirkstoffe in potentiell interessante Derivate sowie Vitamin D₃ in das hydroxylierte Produkt 25-OH-Vitamin D₃ umgewandelt werden. Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Klonierung des synthetisierten Gens von CYP105A1 in den pKKHC-Expressionsvektor zur Expression und Reinigung des Enzyms für *in vitro*-Studien. Dieses Gen wurde von der Firma Entelechon im Rahmen der Synthese an die *codon usage* und den physiologischen GC-Gehalt des Expressionswirts *E.coli* angepasst. Zur Amplifikation des Gens wurde die Primerkombination „CYP105 for“ und „CYP105 His rev“ verwendet. Während der Bearbeitung des Projekts wurde eine Mutante publiziert, die durch zwei Punktmutationen im aktiven Zentrum des Enzyms eine gesteigerte Vitamin D-Umsetzung ermöglicht [Hayashi *et al.*, 2008]. Diese CYP105A1-Variante (CYP105A1 (R84A/R73V)) wurde mit Hinblick auf die Anwendung in einem Ganzzellverfahren von der Firma Geneart an die *codon usage* des ausgewählten Wirtsorganismus *Bacillus megaterium* angepasst und synthetisiert. Außerdem wurde dieses synthetisierte Gen zur Expression in *E.coli* in den pKKHC-Vektor kloniert. Die Amplifikation der CYP105A1 (R84A/R73V) Mutante wurde mit den Primern „105 DM B.meg NcoI for“ und „105 DM B.meg PstI His rev“ durchgeführt. An den C-Terminus beider CYP105A1-Varianten wurde ein 6 x Histidin-Tag angefügt. Die Klonierung des Wildtyps erfolgte über die Schnittstellen NcoI und BamHI. Die Klonierung der Doppelmutante CYP105A1 (R84A/R73V) erfolgte über die Schnittstellen NcoI und PstI. Nach der Transformation von *E. coli* JM109 Zellen wurden beide CYP105A1-Varianten gemäß Literatur exprimiert und gereinigt [Hayashi *et al.*, 2008].

CYP105A1 konnte mit einer Ausbeute von ca. 600 nmol/l Expressionskultur gereinigt werden. Die Expression und Reinigung der Doppelmutante CYP105A1 (R84A/R73V) verlief analog zum Wildtyp und lieferte eine vergleichbare Ausbeute. Der Reinigungsverlauf ist in Tabelle 3.1 am Beispiel des CYP105A1-Wildtyps aufgeführt.

Tabelle 3.1: Reinigungsverlauf von CYP105A1

Reinigungsschritt	n (nmol)	Ausbeute (%)	Q-Wert
Zytosolische Fraktion	896	100	-
Talon [®] Metal Affinity Resin	715	79	1,1
Superdex [®] 200prepgrade	612	68	1,65

Der Q-Wert 1,65, der den Reinigungsgrad des Proteins angibt wurde über den Quotienten $A_{417/276}$ berechnet. In der Literatur ist der Q-Wert für CYP105A1 mit 1,72 angegeben [Omer *et al.*, 1990]. Der nach der Reinigung der Doppelmutante CYP105A1 (R84A/R73V) berechnete Q-wert lag mit 2,34 deutlich höher als der des Wildtyp-Enzyms. Ein entsprechender Vergleichswert ist in der Literatur nicht beschrieben.

In Abbildung 3.1 ist das Spektrum von gereinigtem oxidiertem CYP105A1-Wildtyp (A1) bzw. von gereinigtem oxidiertem CYP105A1 (R84A/R73V) (C1) dargestellt. Die Soret-Banden bei der Wellenlänge $\lambda = 417$ nm entsprechen den typischen Maxima oxidierter Cytochrome P450 im *low spin*-Zustand. Auch die α -Bande (534 nm) und die β -Bande (568 nm) sowie die UV-Bande (358 nm) sind charakteristische Bestandteile von Cytochrom P450-Spektren. Die Abbildungen (3.1A2 und 3.1C2) beinhalten die dazugehörigen COD-Spektren mit den Maxima bei 450 nm. In Abbildung 3.1 B ist das SDS-Gelbild des gereinigten CYP105A1-Wildtyps und in Abbildung 3.1 D ist das SDS-Gelbild der gereinigten Doppelmutante CYP105A1 (R84A/R73V) dargestellt.

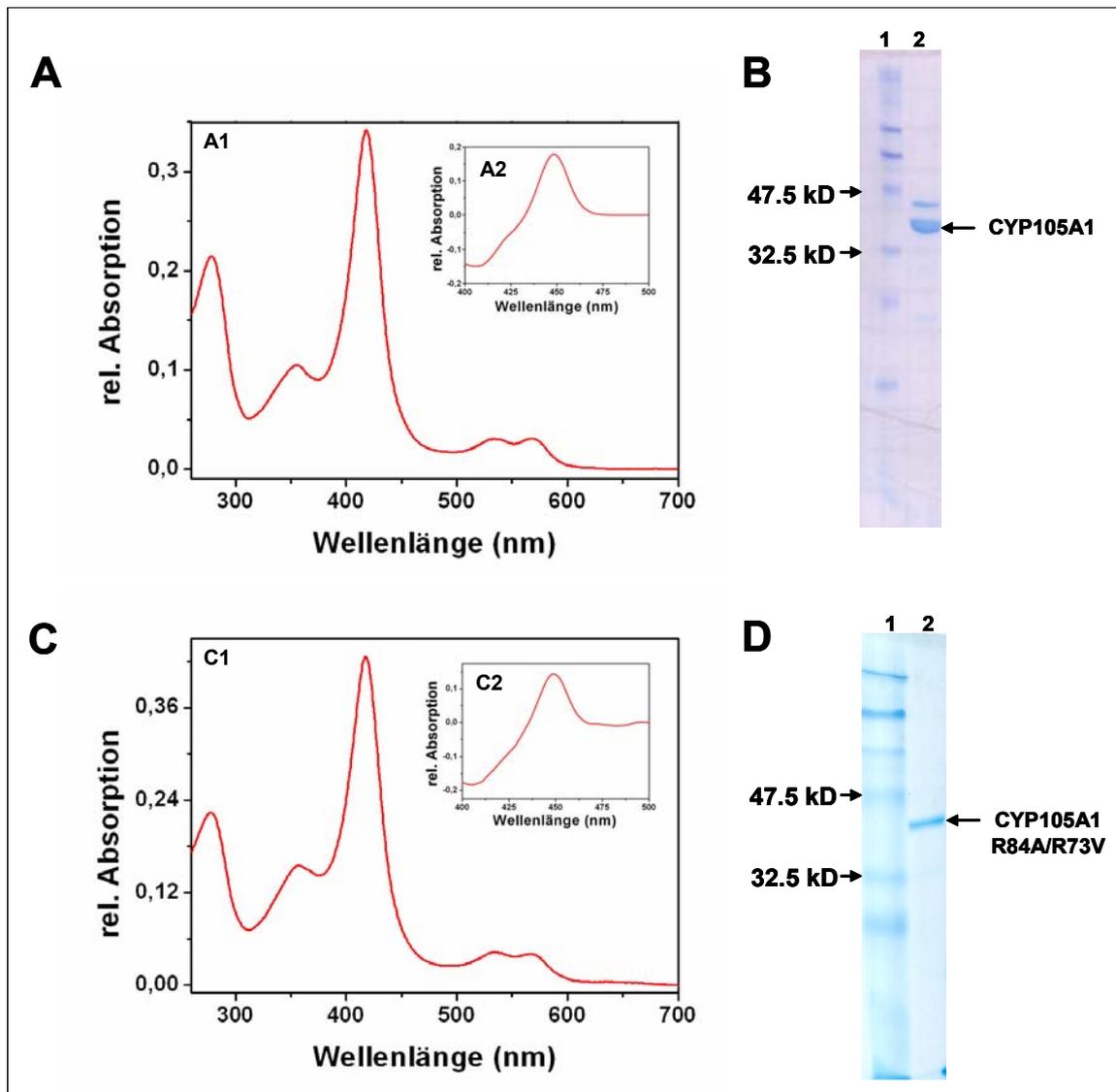


Abbildung 3.1: A) A1: UV/Vis-Spektrum des gereinigten CYP105A1 mit charakteristischem Soret-Maximum bei $\lambda = 417$ nm. A2: COD-Spektrum von gereinigtem CYP105A1. B) SDS-PAGE von gereinigtem CYP105A1. Spur1: Proteinmarker; Spur 2: gereinigtes CYP105A1. C) C1: UV/Vis-Spektrum des gereinigten CYP105A1 (R84A/R73V). C2: COD-Spektrum von gereinigtem CYP105A1 (R84A/R73V) D) SDS-PAGE von gereinigtem CYP105A1 (R84A/R73V). Spur1: Proteinmarker; Spur2: gereinigtes CYP105A1 (R84A/R73V).

Die SDS-Gelbilder des gereinigten CYP105A1-Wildtyps sowie der Doppelmutante CYP105A1 (R73V/R84A) zeigen jeweils Banden zwischen den Markerbanden bei 47,5 kD und 32,5 kD und entsprechen damit der zu erwartenden Größe von CYP105A1 mit einem Molekulargewicht von etwa 44 kD [Hussain und Ward, 2003].

Die Konzentrationsbestimmung von aktivem Cytochrom P450 für die *in vitro*-Experimente erfolgte via CO-Differenzspektroskopie [Omura und Sato, 1964] unter Verwendung eines Hochsalzpuffers (1M KP-Puffer) [Sawada *et al.*, 2004].

3.1.2. Substrat-Docking verschiedener Arzneimittelwirkstoffe auf Sulfonylharnstoff-Basis

Zur Auswahl der beiden für eine CYP10A1-abhängige Umsetzung am besten geeigneten Sulfonylharnstoff-Verbindungen, wurde ein Substrat-Docking mit verschiedenen Antidiabetika zur Berechnung der Bindungsaffinitäten zum Enzym durchgeführt. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Herrn PD. Dr. Hutter (Institut für Bioinformatik, Universität des Saarlandes) durchgeführt. Als Grundlage für diese Docking-Experimente diente das auf der Kristallstruktur des Enzyms basierende Modell [Sugimoto *et al.*, 2008]. Die Verbindungen Glimepirid, Glibenclamid, Glipizid, Gliclazid, Tolbutamid und Chlorpropamid wurden in das aktive Zentrum des CYP105A1-Modells gedockt. Folgende Abbildung zeigt die abgeleitete Rangfolge, basierend auf den errechneten Bindungsaffinitäten der Medikamentenwirkstoffe zum Enzym (Abbildung 3.2).

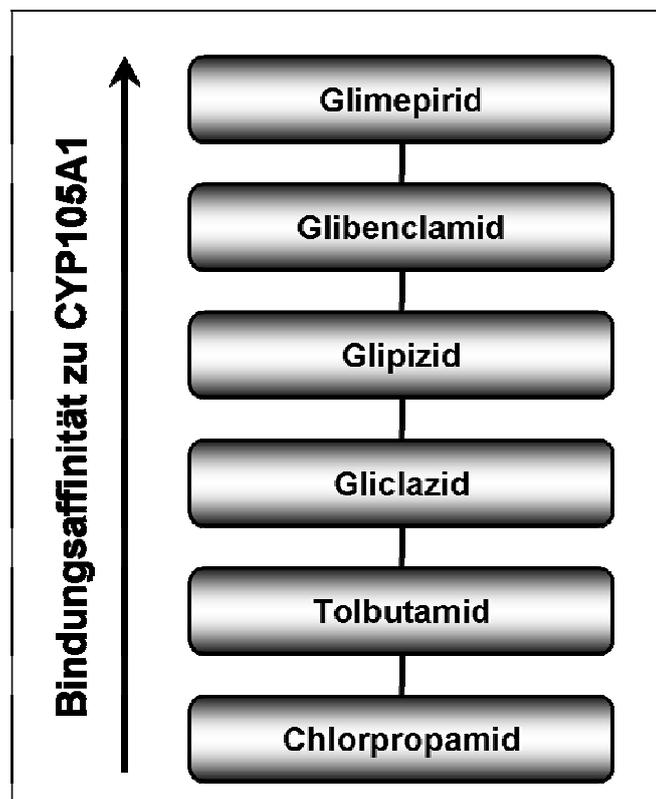


Abbildung 3.2: Rangfolge der berechneten Bindungsaffinitäten verschiedener Antidiabetika vom Sulfonylharnstoff-Typ zu CYP105A1.

Im Zuge der Docking-Experimente zeigten die Verbindungen Glimepirid und Glibenclamid die beste Affinität zu CYP105A1. Überraschenderweise handelt es sich bei diesen Substanzen um die die aktuell in der Humanmedizin bedeutsamsten Antidiabetika vom Sulfonylharnstoff-Typ [Rote Liste, 2011]. Abbildung 3.3 zeigt eine detaillierte Darstellung

von Glimepirid und Glibenclamid im aktiven Zentrum des Enzyms mit der vom Computer errechneten energetisch günstigsten Orientierung zum Häm-Ring.

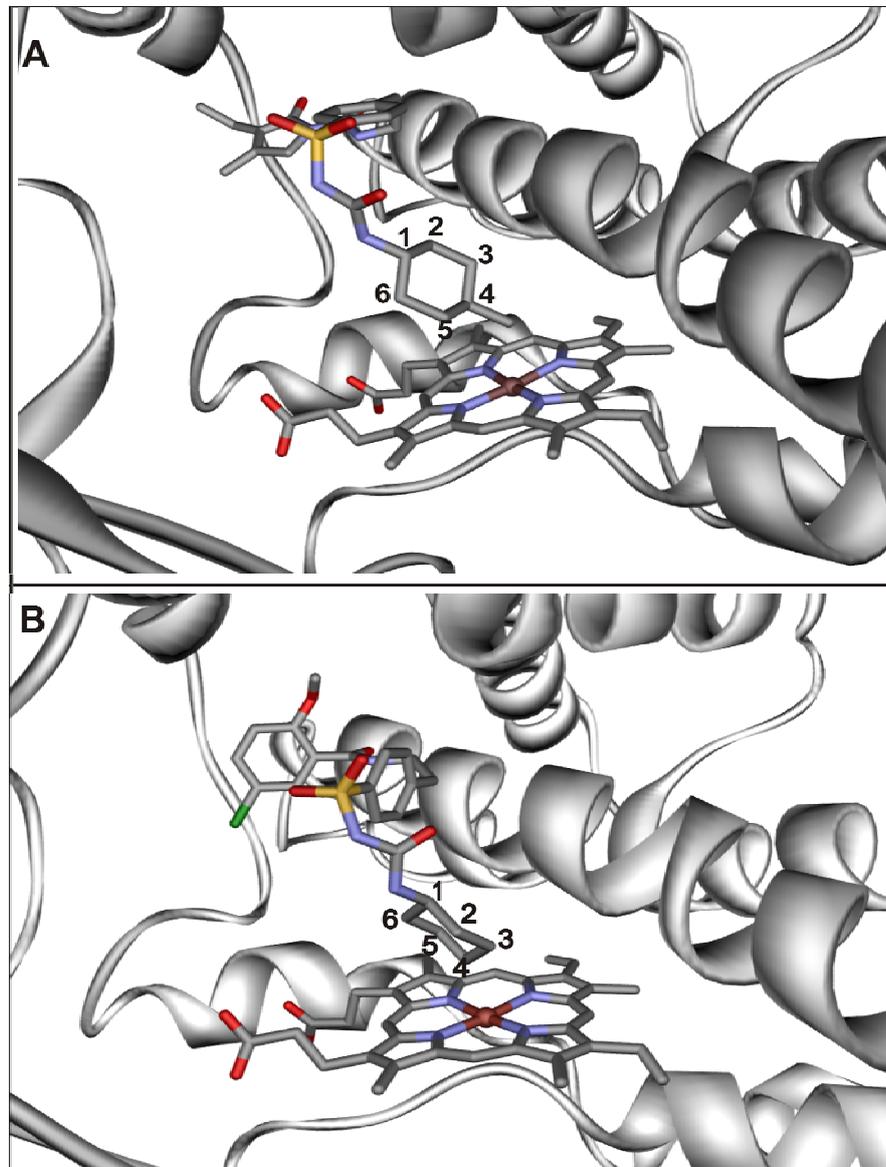


Abbildung 3.3: Docking-Modelle von (A) Glimepirid und (B) Glibenclamid im aktiven Zentrum von CYP105A1. Gezeigt ist die vom Computer errechnete günstigste Orientierung der Substrate in Bezug zum Häm. Die Seitenketten sind aus Gründen der Übersicht nicht gezeigt (Abbildung erstellt von PD. Dr. M. Hutter).

Aufgrund ihrer ausgeprägten Flexibilität könnten die Sulfonylharnstoff-Liganden theoretisch eine Vielzahl von Docking-Positionen im aktiven Zentrum des Enzyms einnehmen. Dennoch zeigen die am energetisch günstigsten Positionen den Cyclohexylring von Glimepirid und Glibenclamid in nächster Orientierung zur Häm-Ebene. Beide Substrate bilden Wasserstoffbrücken zwischen ihren Sulfonylharnstoff-Gruppen und der Seitenkette des Arg 84 aus. Glibenclamid wird durch eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zum Rest Arg 73 stabilisiert [Kleser *et al.*, *submitte*].

3.1.3. Suche nach alternativen Redoxpartnern und dem optimalen Verhältnis der Proteinkomponenten

Da die homologen Redoxpartner von CYP105A1 aus *Streptomyces griseolus* bis heute nicht vollständig charakterisiert sind, wurden Substratumsetzungen *in vitro* bislang mit den Redoxproteinen von *Spinacia oleracea* (Spinat-Ferredoxin und Spinat-Ferredoxin-Reduktase) durchgeführt [Sawada *et al.*, 2004; O'Keefe *et al.*, 1991]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach alternativen heterologen Redoxpartnern gesucht. Alle untersuchten Elektronentransferproteine sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.2 Auflistung aller untersuchten Redoxproteine zur Etablierung eines alternativen Elektronentransfers zur Unterstützung der CYP105A1-Reaktion. AdR, Adx und die entsprechenden Adx-Mutanten wurden freundlicherweise von Herrn W. Reinle in gereinigter Form zur Verfügung gestellt. Etp1^{td} sowie die entsprechenden Mutanten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. F. Hannemann in gereinigter Form zur Verfügung gestellt. Gereinigtes Arh1 wurde freundlicherweise von Frau Dr. K. M. Ewen zur Verfügung gestellt. Das Ferredoxin und die Reduktase von *Spinacia oleracea* wurde über den Feinchemikalienanbieter Sigma Aldrich bezogen.

Reduktase	Bemerkung	Referenz
AdR	Adrenodoxin Reduktase	[Sagara <i>et al.</i> , 1993]
Arh1 (A18G)	Adrenodoxin Reduktase Homolog 1	[Ewen <i>et al.</i> , 2008]
Spinat FdR	Ferredoxin Reduktase aus Chloroplasten von <i>Spinacia oleracea</i>	Sigma Aldrich
Ferredoxin	Bemerkung	Referenz
Adx	Adrenodoxin	[Uhlmann <i>et al.</i> , 1992]
Adx (S112W)	Adrenodoxin Mutante mit Aminosäureaustausch in Position 112	[Schiffler <i>et al.</i> , 2001]
Adx (4-108)	Adrenodoxin Deletionsmutante	[Uhlmann <i>et al.</i> , 1994]
Etp1 ^{td} (516-618)	Etp1 ^{td} Deletionsmutante	[Müller <i>et al.</i> , 2011]
Spinat Fdx	Ferredoxin aus Chloroplasten von <i>Spinacia oleracea</i>	Sigma Aldrich

Kombinationen aus den verschiedenen Ferredoxinen und Ferredoxin-Reduktasen wurden bezüglich ihres Elektronenübertragungspotentials auf CYP105A1 untersucht. Dieses Experiment sollte zeigen, durch welche Redoxpartnerkombination zusammen mit NADPH als Elektronenquelle, 400 pmol CYP105A1 äquivalent zu einer Natriumdithionit-Kontrolle vollständig reduziert werden kann. Die Effizienz dieser Kombinationen in der CYP105A1 Reduktion ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

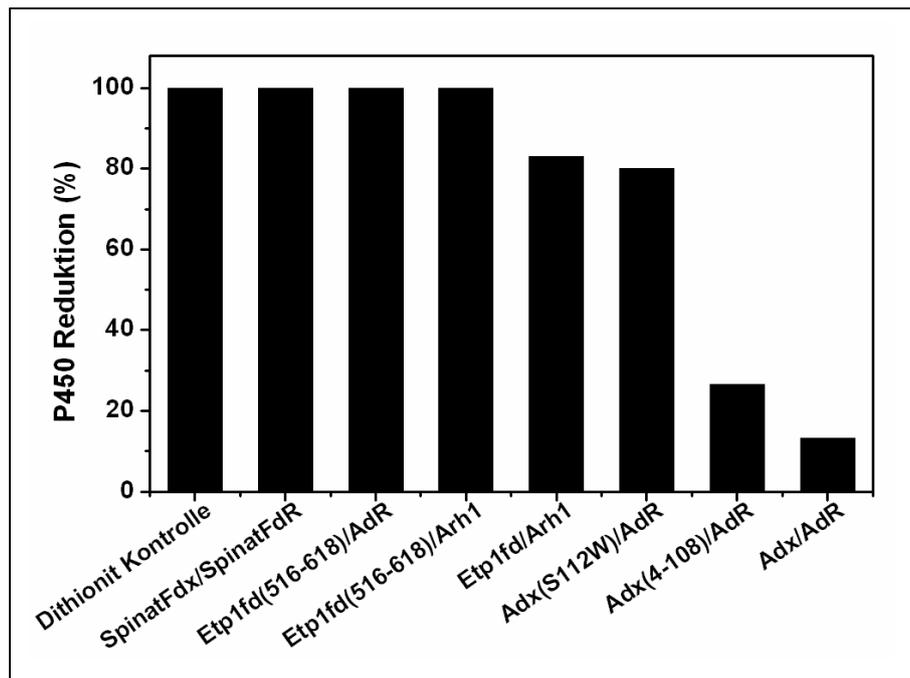


Abbildung 3.4: Reduktionseffizienz verschiedener potentieller Redoxpartnerkombinationen. 400 pmol CYP105A1 wurden für alle Versuche eingesetzt. Als Referenz für die maximale Reduktionseffizienz dieser 400 pmol CYP105A1 wurde eine Kontrolle mit Natriumdithionit durchgeführt (= 100% Reduktion). Das Reduktionsmittel Natriumdithionit wurde durch unterschiedliche Kombinationen aus vorhandenen Ferredoxinen und Ferredoxin-Reduktasen mit NADPH als Elektronendonator ersetzt. Ziel war es, 400 pmol des Enzyms äquivalent zur Dithionit-Kontrolle durch die Redoxproteinkombinationen zu reduzieren. Die Proteine (P450 und potentielle Redoxpartner) wurden mit NADPH (100µM) inkubiert und mit Kohlenmonoxid begast. Die Reduktionseffizienz der einzelnen Kombinationen wurde anschließend via Spektralphotometer über das charakteristische P450-Signal verfolgt.

Abbildung 3.4 zeigt die Reduktionseffizienz unterschiedlicher Redoxpartnerkombinationen. Für das Experiment wurde eine Stoffmenge von 400 pmol CYP105A1 eingesetzt. Neben dem Elektronentransfersystem von *Spinacia oleracea*, welches in diesem Experiment als zusätzliche Kontrolle eingesetzt wurde, konnte von den untersuchten Redoxproteinen die Etp1^{fd} Mutante Etp1^{fd} (516-618) [Müller *et al.*, 2011] mit den Reduktasen AdR und Arh1 die definierte Stoffmenge von CYP105A1 vollständig reduzieren. Bei Adrenodoxin (Adx) und deren Mutanten Adx (4-108) [Uhlmann *et al.*, 1994] und Adx (S112W) [Schiffler *et al.*, 2001] konnte keine vollständige Reduktion des eingesetzten CYP105A1 beobachtet werden.

Mit Etp1^{fd} (516-618) in Kombination mit den Reduktasen Arh1 und AdR konnte eine Redoxkette von gleicher Effizienz wie das Spinatsystem identifiziert werden. Etp1^{fd} (516-618) und die korrespondierende Reduktase Arh1 wurden für alle weiteren Studien als heterologes Elektronentransfersystem verwendet.

3.1.4. Expression und Reinigung der alternativen Redoxpartner

Zur Durchführung weiterer Studien wurden die Redoxproteine Arh1 und Etp1^{fd} (516-618) in *E.coli* exprimiert und gereinigt. Die Expressionsvektoren für die Proteine Arh1 und Etp1^{fd} (516-618) lagen in der Arbeitsgruppe vor.

3.1.4.1. Expression und Reinigung des Ferredoxins Etp1^{fd} (516-618)

Expression und Reinigung von Etp1^{fd} (516-618) wurde gemäß der Literatur durchgeführt [Schiffler *et al.* 2004]. In Abbildung 3.5 A ist das UV/Vis-Spektrum von Etp1^{fd} (516-618) dargestellt. Die Maxima des Proteins im hier gezeigten oxidierten Zustand sind mit 458, 415, 342 und von 305 - 350 nm auch für den Wildtyp Etp1^{fd} charakteristisch. Abbildung 3.5 B zeigt das SDS-Gel des gereinigten Proteins Etp1^{fd} (516-618).

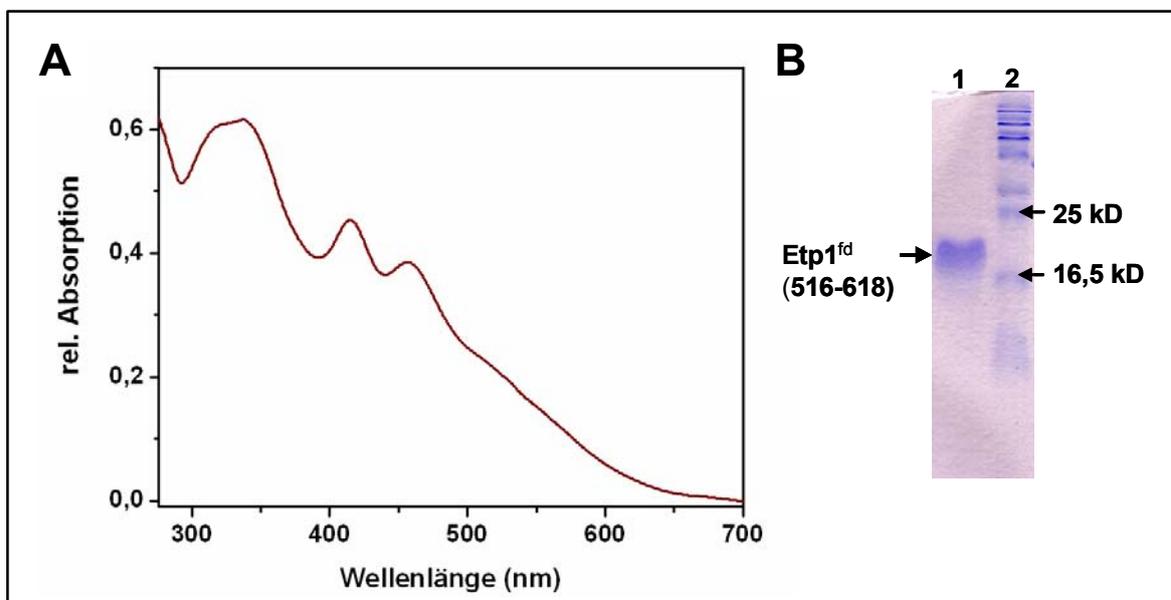


Abbildung 3.5: A) UV/Vis-Spektrum von Etp1^{fd} (516-618). B) SDS-PAGE von gereinigtem Etp1^{fd} (516-618): Spur 1: gereinigtes Etp1^{fd} (516-618), Spur 2: Proteinmarker.

Eine Besonderheit ist die Darstellung der Bande von Etp1^{fd} (516-618) im SDS-Gel zwischen 25 kD und 16,5 kD. Obwohl das theoretische Molekulargewicht des 103 Aminosäuren umfassenden Proteins ca. 11,5 kD beträgt, zeigt sich das Protein trotz denaturierender Bedingungen in der SDS-PAGE als Dimer mit einem Molekulargewicht von etwa 23 kD. Die Ursache für diese auch in der Literatur beschriebene Beobachtung ist noch unklar [Schiffler *et al.*, 2004].

Das Protein konnte mit einer Ausbeute von ca. 1 mmol/l Expressionskultur präpariert werden. Der Reinigungsverlauf von Etp1^{fd} (516-618) ist in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: Reinigungsverlauf von Etp1^{fd} (516-618).

Reinigungsschritt	n (nmol)	Ausbeute (%)	Q-Wert
Zytosolische Fraktion	1317	100	-
Source™30Q	1096	83	
Superdex®200prepgrade	978	74	0,88

Der Q-Wert 0,88 des gereinigten Proteins wurde durch die Bildung des Quotienten A_{414}/A_{276} berechnet. In der Literatur ist dieser Wert mit 0,96 angegeben.

3.1.4.2. Expression und Reinigung der Ferredoxin-Reduktase Arh1

Die Expression und Reinigung von Arh1 wurde ebenfalls gemäß Literatur durchgeführt. Lediglich der Elutionsschritt der Affinitätschromatographie wurde nicht via Säureelution [Ewen *et al.*, 2008], sondern mithilfe eines Imidazolpuffers durchgeführt. In Abbildung 3.6 A ist das UV/Vis-Spektrum von Arh1 dargestellt. Die Maxima bei 272 nm, 376 nm und 450 nm entsprechen den charakteristischen Maxima von Flavoproteinen. Abbildung 3.6 B zeigt das SDS-Gel des gereinigten Flavoproteins Arh1.

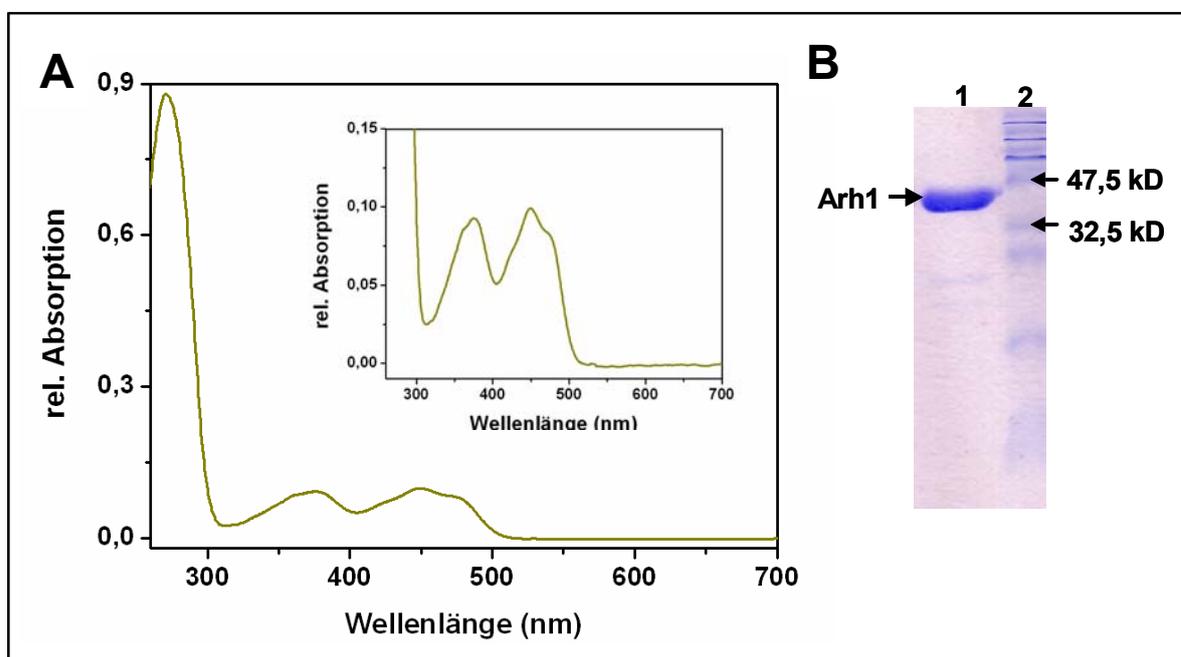


Abbildung 3.6: A) UV/Vis-Spektrum von gereinigtem Arh1. B) SDS-PAGE von gereinigtem Arh1: Spur 1: gereinigtes Arh1, Spur 2: Proteinmarker.

Das Protein wurde mit einer Ausbeute von ca. 500 nmol/l Expressionskultur gereinigt. Der Reinigungsverlauf von Arh1 ist in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Reinigungsverlauf von Arh1.

Reinigungsschritt	n (nmol)	Ausbeute (%)	Q-Wert ($A_{276/450}$)
Zytosolische Fraktion	680	100	-
Talon [®] Metal Affinity Resin	547	80	-
Superdex [®] 200prepgrade	480	70	7,8

Der Quotienten $A_{276/450}$ des gereinigten Proteins betrug 7,8. Der in der Literatur mit 7,5 angegebene Q-Wert von Arh1 ist vergleichbar mit dem Q-Wert für AdR [Sagara *et al.*, 1993].

3.1.5. Optimierung der *in vitro*-CYP105A1-Reaktion

Mit den gereinigten Proteinen Etp1^{fd} (516-618) und Arh1 wurde ein *in vitro*-System für die Substratumsetzung mit CYP105A1 bzw. CYP105A1 (R84A/R73V) aufgebaut.

Zunächst wurde der Elektronentransfer zwischen CYP105A1 und den alternativen Redoxpartnern optimiert. In einem geeigneten Experiment wurde das günstigste Redoxpartnerverhältnis für eine schnellstmögliche Reduktion des CYP105A1 (400 pmol) ermittelt. Die Reduktion wurde spektralphotometrisch untersucht (Abbildung 3.7).

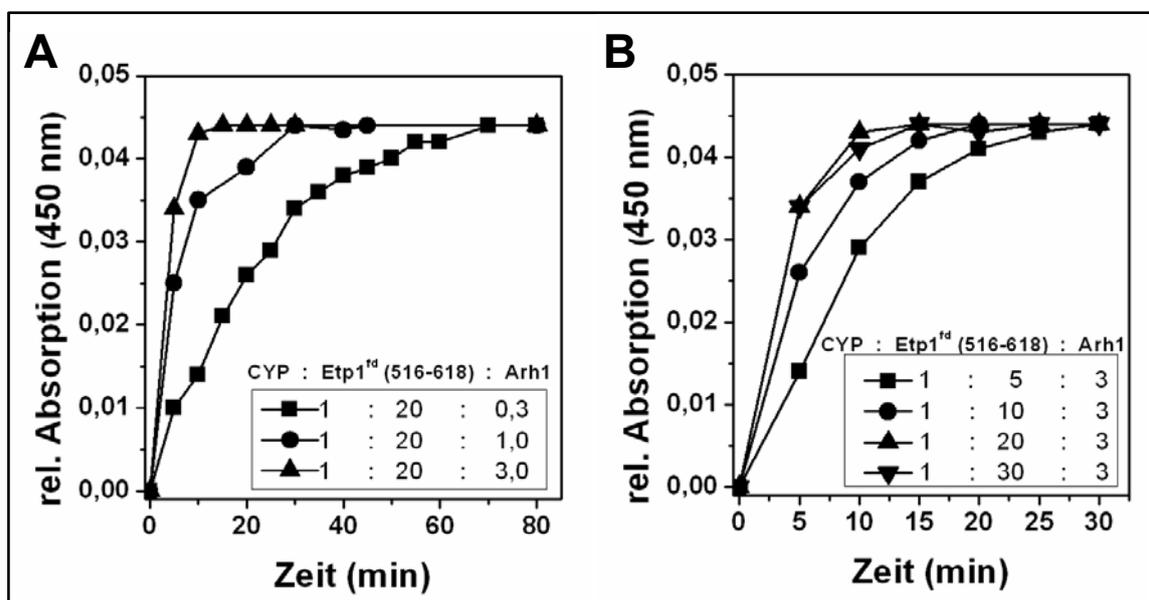


Abbildung 3.7: A) Optimierung der Arh1-Konzentration. 400 pmol CYP105A1 und 8 nmol Etp1^{fd} (516-618) wurden für diesen Test als konstante Proteinmengen verwendet. Die Reduktionseffizienz wurde mit steigenden Konzentrationen von Arh1 in Gegenwart von 100 μ M NADPH als Elektronendonator getestet. B) Optimierung der Etp1^{fd} (516-618) Konzentration. In diesem Test wurden 400 pmol CYP105A1 und 1,2 nmol Arh1 als konstante Proteinmengen verwendet. Die Reduktionseffizienz wurde mit steigenden Etp1^{fd} (516-618)-Konzentrationen in Gegenwart von 1mM NADPH als Elektronendonator getestet. In den Experimenten wurde die Reduktion über die P450-Komplexbildung mit Kohlenmonoxid im Spektralphotometer verfolgt.

Die Untersuchungen zur Optimierung der Redoxkomponenten zeigten, dass die effizienteste Reduktion des CYP105A1 durch das Verhältnis 1:20:3 (CYP105A1: Etp1^{fd} (516-618): Arh1) erzielt wird.

In einem weiteren Optimierungsschritt sollte der Elektronentransfer durch ein geeignetes Elektronendonator-Regenerationssystem ergänzt werden. Dazu wurde die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase mit dem Substrat Glukose-6-Phosphat verwendet. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten des Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Systems wurden aus der Literatur übernommen [Lisurek *et al.*, 2004]. Um die Tragweite der Elektronendonator-Regeneration auf die CYP105A1-Reaktion zu untersuchen, wurde ein Experiment mit und ohne Regenerationssystem durchgeführt. Der Elektronendonator NADPH wurde gemäß Literatur in einer Endkonzentration von 1 mM eingesetzt [Sawada *et al.*, 2004]. Da Glimpirid im Docking-Experiment die höchste Bindungsaffinität zu CYP105A1 zeigte, wurde der Optimierungsfortschritt des CYP105A1-Assays mithilfe dieser Verbindung über eine Substratumsetzung untersucht. In allen Experimenten wurde eine Glimpirid-Konzentration von 250 μ M eingesetzt.

Erwartungsgemäß zeigte die Ergänzung des NADPH-Regenerationssystems eine deutlich gesteigerte Umsetzung des Substrates Glimpirid im Vergleich zu dem Kontrollexperiment. Der Unterschied der Glimpirid-Umsetzung zum Kontrollexperiment betrug etwa 20 % innerhalb einer 17-minütigen Reaktionszeit (Abbildung 3.8 A).

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob die oxidierte und die reduzierte Variante des Elektronendonors NADPH unterschiedliche Auswirkungen auf die Umsetzung von Glimpirid zeigen. Dieses Experiment resultierte aus wirtschaftlichen Überlegungen, da NADP⁺ (1 g = 82 €) kostengünstiger erhältlich ist als NADPH (1 g = 357 €). Aus Abbildung 3.8 B geht hervor, dass durch die Verwendung der oxidierten Form des Elektronendonors NADP⁺ die Effizienz des Systems sogar geringfügig gesteigert werden konnte. Nach einer 17-minütigen Reaktionszeit, wurden unter Verwendung von (NADP⁺) etwa 94 % des Substrates metabolisiert. Mit NADPH als Elektronenquelle wurden in dieser Zeit nur etwa 84 % umgesetzt. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die günstigere, oxidierte Variante - NADP⁺ - für eine *in vitro*-Reaktion unter diesen Bedingungen sehr geeignet ist.

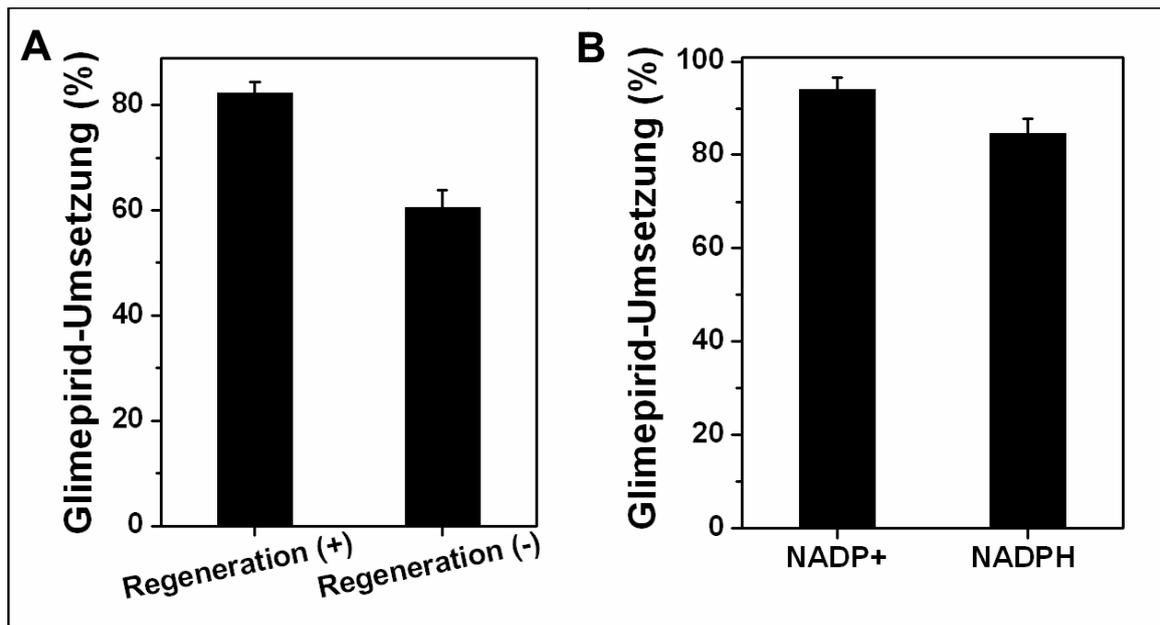


Abbildung 3.8: A) *In vitro*-Umsetzung von 250 μM Glimepirid mit und ohne NADPH-Regeneration. Das Regenerationssystem setzte sich aus 1 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 5 mM Glukose-6-Phosphat zusammen. Die Endkonzentration von NADPH betrug 1 mM. B) *In vitro*-Umsetzung von 250 μM Glimepirid in Anwesenheit von 1 mM NADPH bzw. NADPH⁺ in Kombination mit dem Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasesystem.

Alle Reaktionen wurden mit 1 μM CYP105A1, 20 μM Etp1^{fd} (516-618) und 3 μM Arh1 in Gegenwart eines 50 mM KP-Puffers (pH=7,4) durchgeführt. Die Reaktionszeiten betragen 17 Minuten. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt.

3.1.6. Alternative Elektronenquelle NADH

Die Redoxproteine aus der Spaltheife stellen theoretisch auch unter ökonomischen Aspekten eine interessante Alternative zu der pflanzlichen Elektronentransportkette dar. In der Literatur wurde beschrieben, dass im Gegensatz zur NADPH-abhängigen Spinat FdR die *S. pombe* Reduktase Arh1 sowohl NADPH als auch das deutlich günstigere NADH als Elektronendonator akzeptiert [Ewen *et al.*, 2008].

Aus diesem Grund wurde die Effizienz des NADPH-regenerierenden Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Systems mit einem entsprechenden NADH-regenerierenden Alkoholdehydrogenase-System über eine CYP105A1-abhängige Glimepirid-Umsetzung verglichen (Abbildung 3.9). Als Substrat bzw. Kosubstrat für die Alkoholdehydrogenase (1 U) wurde Ethanol (1 %) und NADH (1 mM) eingesetzt, als Substrat bzw. Kosubstrat für die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1 U) entsprechend Glukose-6-Phosphat (5 mM) und NADPH (1 mM).

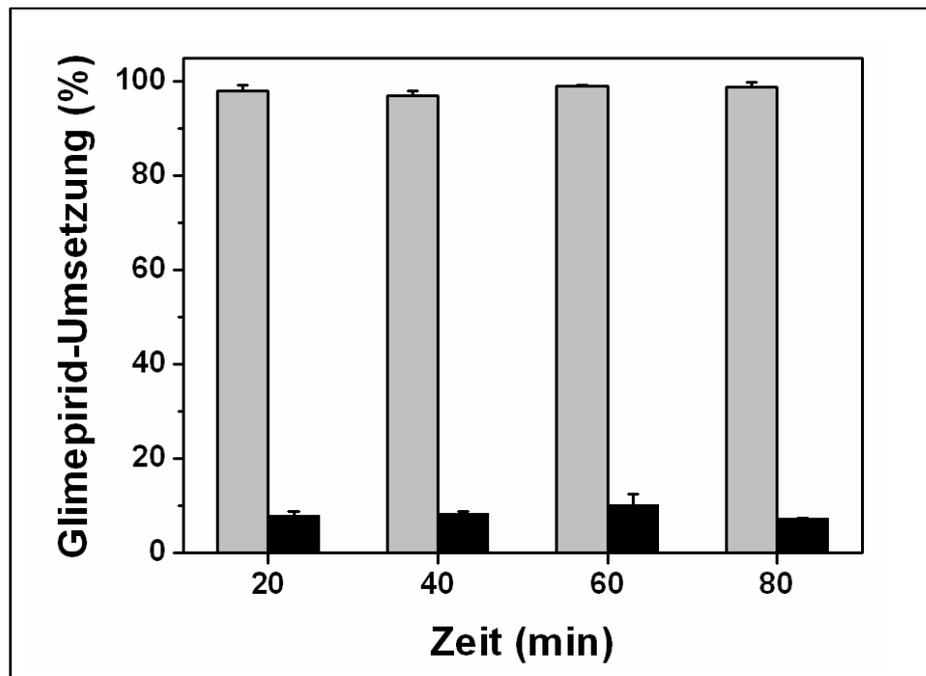


Abbildung 3.9: Vergleich der Elektronendonatoren NADPH und NADH mit den korrespondierenden Regenerationssystemen in *in vitro*-Umsetzungen von 250 μ M Glimepirid über die Zeit (grau: NADPH-Regeneration durch das Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-System, schwarz: NADH-Regeneration durch das Alkoholdehydrogenase-System). Die Standardabweichung der einzelnen Messpunkte resultiert aus drei unabhängigen Experimenten.

Unglücklicherweise betrug die Umsetzung von Glimepirid unter Verwendung von NADH als Elektronenquelle lediglich etwa 10 % der Umsetzung des Kontrollexperimentes, bei dem die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zur NADPH-Regeneration verwendet wurde (Abbildung 3.9). Eine weitere Zunahme des Produktes über die Zeit konnte nicht beobachtet werden.

Aufgrund der deutlich geringeren Effizienz der CYP105A1-Reaktion mit NADH als Elektronendonator, wurde in allen weiteren *in vitro*-Studien NADPH bzw. NADP^+ als Elektronendonator in Kombination mit dem Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-System verwendet.

3.1.7. Verifizierung der Docking-Ergebnisse durch *in vitro*-Umsetzungen der Sulfonylharnstoffe mithilfe der optimierten Reaktionsparameter

Nach der Anpassung der CYP105A1-Reaktion an die Bedingungen des alternativen Elektronentransfers, sollte die aus den bioinformatischen Daten abgeleitete Rangfolge der getesteten Sulfonylharnstoffe (Abbildung 3.2) verifiziert werden. Dazu wurde die Umsetzung der Sulfonylharnstoffe Glimepirid, Glibenclamid, Gliclazid, Glipizid, Tolbutamid und Chlorpropamid im Zuge eines *in vitro*-Experiments miteinander verglichen. Als Bedingungen für dieses Experiment wurde eine Reaktionszeit von 18 Minuten bei einer

Substratkonzentration aller Verbindungen von 250 μM definiert. Nach dem Abstoppen der Reaktionen nach 18 Minuten, wurden die Ansätze via HPLC-Analyse auf Produktbildung untersucht. In Abbildung 3.10 sind die Chromatogramme der Umsetzungen der Sulfonylharnstoffe mit dem CYP105A1-Wildtyp-Enzym dargestellt.

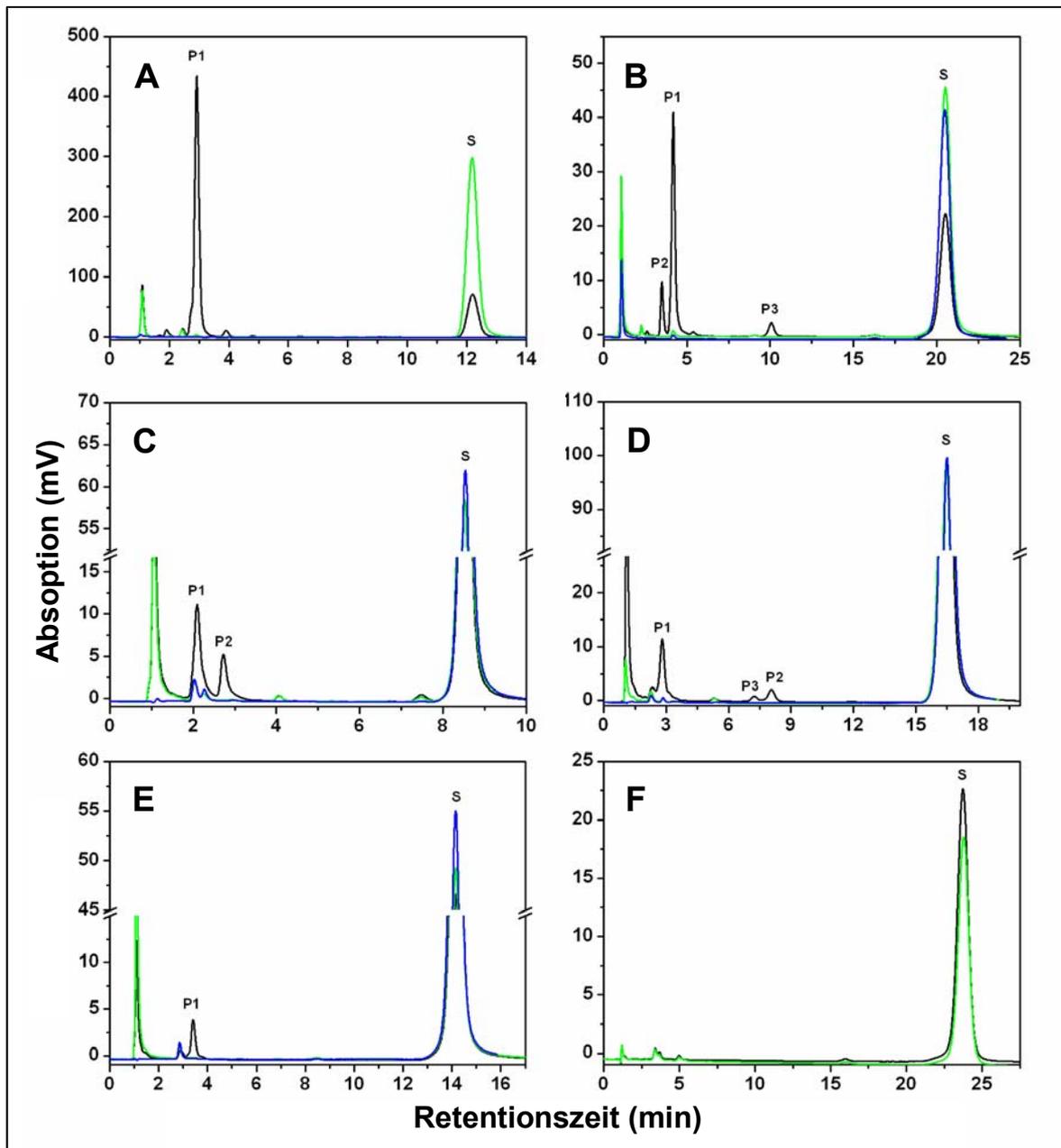


Abbildung 3.10: HPLC-Chromatogramme der *in vitro*-Umsetzungen von jeweils 250 μM (A) Glimperid, (B) Glibenclamid, (C) Gliclazid, (D) Glipizid, (E) Tolbutamid und (F) Chlorpropamid mit CYP105A1. Alle Verbindungen wurden 18 Minuten bei 30°C in einem Reaktionsansatz mit 1 μM CYP105A1, 20 μM Etp1^{fd} (516-618) und 3 μM Arh1 in einem 50 mM KP-Puffer (pH=7,4) inkubiert. Die Endkonzentration von NADPH betrug 1 mM. Das Regenerationssystem setzte sich aus 1 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 5 mM Glukose-6-Phosphat zusammen. Die Chromatogramme zeigen die Substratumsetzungen (S) in die jeweiligen Produkte (P) (schwarze Linie). Den Abbildungen sind die Chromatogramme aus den Kontrollexperimenten ohne Cytochrom P450 (grüne Linie) oder ohne Substrat (blaue Linie) hinzugefügt. Die Laufmittelzusammensetzung zur HPLC-Analytik der jeweiligen Umsetzungen ist in Tabelle 2.24 im Material- und Methodenteil aufgeführt.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Umsetzungen der Sulfonylharnstoff-Substrate zeigen im Einklang mit den Docking-Ergebnissen, dass CYP105A1 gegenüber Glimepirid, gefolgt von Glibenclamid die höchste Aktivität besitzt. Den Chromatogrammen aus Abbildung 3.10 ist zu entnehmen, dass Glimepirid (A) im Zuge der P450-Reaktion zu einem Hauptprodukt (P1) metabolisiert wird, dessen Retentionszeit unter den etablierten Analysebedingungen etwa 2,5 Minuten beträgt. Glibenclamid (B) wird in ein Hauptprodukt (P1) mit einer Retentionszeit von etwa 3,4 Minuten und zwei Nebenprodukte (P2, P3) mit den Retentionszeiten 3 Minuten (P2) und 9 Minuten (P3) derivatisiert. Die Umsetzungen von Gliclazid, Glipizid und Tolbutamid entsprechen aufgrund der Intensität der Produktbildung ebenfalls der Vorhersage aus den Docking-Studien.

Gemäß den HPLC-Chromatogrammen wird Gliclazid (C) in zwei Produkte (P1, P2), Glipizid (D) in ein Hauptprodukt (P1) sowie zwei Nebenprodukte (P2, P3) und Tolbutamid (E) in ein Produkt (P1) umgesetzt. Mit Chlorpropamid (F), welches im Docking-Experiment die niedrigste Affinität zum CYP105A1 zeigte, wurde während der Reaktionszeit von 18 Minuten keine Produktbildung beobachtet.

3.1.8. Bestimmung der kinetischen Parameter der Umsetzung von Glimepirid und Glibenclamid

Aufgrund der experimentellen Bestätigung der bioinformatischen Vorhersage, wurde mit den Verbindungen Glimepirid und Glibenclamid die CYP105A1-abhängige Reaktionskinetik bestimmt. Dazu wurden für Glimepirid Substratkonzentrationen von 2,5-50 μM und für Glibenclamid die Substratkonzentrationen von 2,5-100 μM untersucht. Die daraus resultierenden Daten wurden via hyperbolischem Kurvenfit mittels Origin pro 8.1G Software analysiert. Die Ergebnisse der jeweiligen Kurvenfits sind in Abbildung 3.11 dargestellt und in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

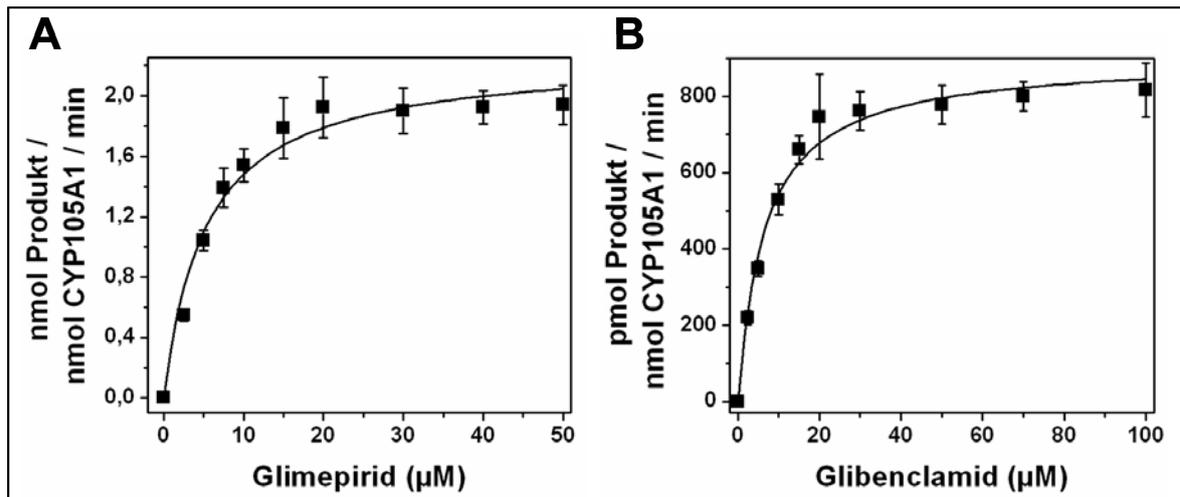


Abbildung 3.11: Michaelis-Menten-Plot der CYP105A1-abhängigen Umsetzungs kinetik von A) Glibenclamid und B) Glimepirid. Der hyperbolische Kurvenfit wurde mittels Origin pro 8.1G software durchgeführt.

Tabelle 3.5: Kinetische Parameter der CYP105A1-abhängigen Umsetzung von Glimepirid und Glibenclamid.

Substrat	K_m (μM)	V_{max} (nmol/min/nmol P450)	k_{cat} ($\times 10^{-3} \text{s}^{-1}$)
Glimepirid	$5,28 \pm 0,83$	$2,26 \pm 0,09$	$37,6 \pm 1,3$
Glibenclamid	$6,59 \pm 0,84$	$0,9 \pm 0,03$	$15,0 \pm 0,5$

Aus den kinetischen Daten geht hervor, dass sich die K_m -Werte für die Substrate im mikromolaren Bereich bewegen. Der V_{max} -Wert sowie der k_{cat} -Wert sind für die Glimepirid Umsetzung etwa dreimal höher, verglichen mit den Werten für Glibenclamid.

3.1.9. *In vitro*-Umsetzung mit Vitamin D₃

Nach der Etablierung der *in vitro*-Reaktion mithilfe des Sulfonylharnstoffs Glimepirid, wurde eine Vitamin D₃-Umsetzung zur Reproduktion des publizierten CYP105A1-abhängigen Vitamin D-Metabolismus [Sawada *et al.* 2004, Hayashi *et al.*, 2008] unter den für das alternative Redoxsystem angepassten Reaktionsbedingungen durchgeführt. Das Substrat wurde in einer Endkonzentration von 100 μM eingesetzt und zuvor mit Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin (HP-beta-CD) solubilisiert [Tuckey *et al.*, 2008]. Die Bedeutung dieses Lösungsvermittlers für Vitamin D als Substrat wird im Kontext der Vitamin D-Ganzzellumsetzung verdeutlicht.

Zunächst wurde eine Vitamin D₃-Umsetzung unter Verwendung des CYP105A1-Wildtyps bei einer Reaktionszeit von 90 Minuten durchgeführt. Dabei konnte allerdings nur eine sehr geringe Produktbildung beobachtet werden (Abbildung 3.12 A). Eine Steigerung der Produktbildung konnte erwartungsgemäß mit der CYP105A1-Doppelmutante CYP105A1

(R84A/R73V) unter gleichen Reaktionsbedingungen beobachtet werden (Abbildung 3.12 B). In dem HPLC-Chromatogramm zeigte sich das erwartete Produkt 25-OH-Vitamin D₃ bei einer Retentionszeit von etwa 4 Minuten. Die Retentionszeit des Produktes unter den hier verwendeten Analysebedingungen wurde mithilfe eines Produktstandards ermittelt (Abbildung 3.12 C).

Die ebenfalls in der Literatur beschriebenen Derivatisierungen des Vitamin D zu 1 α -OH-Vitamin D₃ oder 1 α , 25-(OH)₂-Vitamin D₃ [Sawada *et al.*, 2004] konnten hingegen nicht detektiert werden.

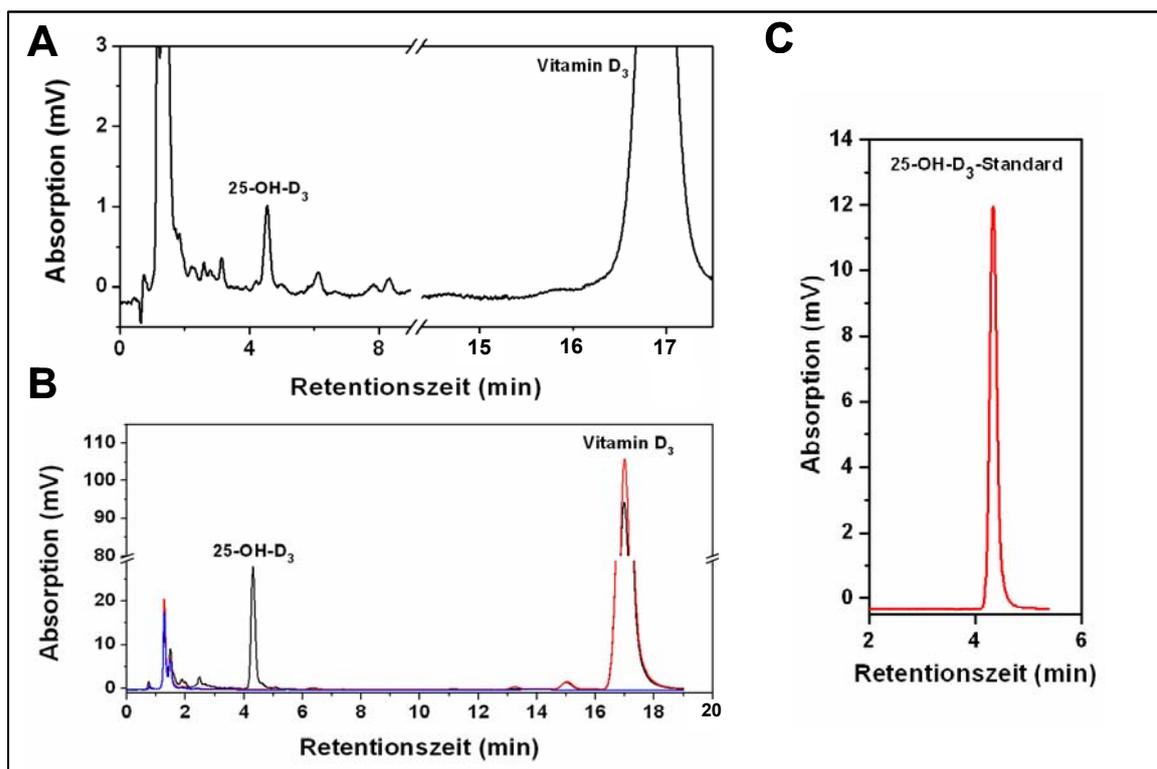


Abbildung 3.12: A) *In vitro*-Umsetzung von Vitamin D₃ (100 μ M) unter Verwendung des CYP105A1-Wildtyps. B) *In vitro*-Umsetzung von Vitamin D₃ (100 μ M) unter Verwendung der CYP105A1-Doppelmutante CYP105A1 (R84A/R73V). Die Reaktionen wurden mit 1 μ M CYP105A1, 20 μ M Etp1^{fd} (516-618) und 3 μ M Arh1 in Gegenwart eines 50 mM KP-Puffers (pH=7,4) durchgeführt. Als Elektronendonator wurde 1 mM NADP⁺ verwendet. Vitamin D₃ wurde vor der Zugabe zu dem Reaktionsansatz in einer 45 %igen HP-beta-CD-Lösung solubilisiert. Die Endkonzentration des Cyclodextrins im Reaktionsansatz betrug 2,25 %. Die Reaktionszeit betrug 90 Minuten. C) HPLC-Chomatogramm des 25-OH-Vitamin D₃-Standards.

3.2. Etablierung eines auf *Bacillus megaterium* basierenden Ganzzellsystems

3.2.1. Klonierung der Expressionsvektoren und Transformation von *Bacillus megaterium* MS941

Im Hinblick auf die Etablierung einer kommerziell nutzbaren Bereitstellung der Sulfonylharnstoff-Derivate und des 25-OH-Vitamin D wurde ein Ganzzellbiokatalysator basierend auf *Bacillus megaterium* entwickelt. Der transformierbare *Bacillus megaterium* Stamm MS941 sowie das kompatible Expressionsplasmid pKMBm4 wurden freundlicherweise von Prof. Jahn (TU-Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Für den pKMBm4-Shuttlevektor wurde zunächst eine neue MCS entworfen, um die Gene der entsprechenden CYP105A1-Varianten sowie die Gene der heterologen Redoxproteine Etp1^{fd} (516-618) und Arh1 zu integrieren. Die geeignete MCS wurde von der Firma Geneart synthetisiert und von Frau Dipl. Chem. S. Bleif über die Schnittstellen *PacI* und *NotI* in den Vektor kloniert [Bleif *et al.*, 2011]. Der resultierende pSMF-Vektor wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Sequenz der MCS ist im Anhang dargestellt. Vor jedes Gen wurde die Sequenz einer für *Bacillus megaterium* optimierten Ribosomenbindestelle [Malten *et al.*, 2005] kloniert.

Abbildung 3.13 liefert eine Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten *Bacillus megaterium*-Systeme.

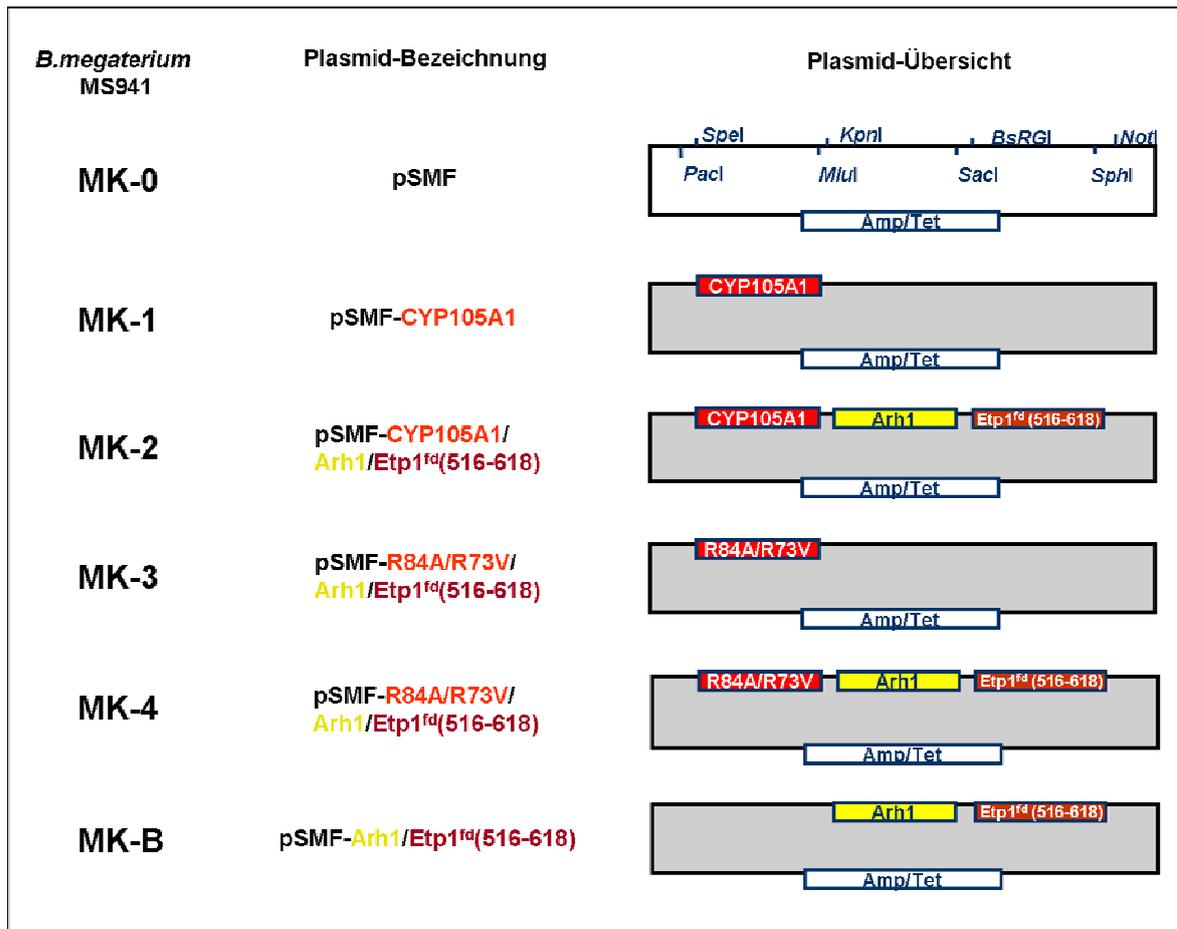


Abbildung 3.13: Übersicht und Nomenklatur über die *B. megaterium* MS94-Expressionssysteme mit schematischer Darstellung der Plasmide und der dazugehörigen Plasmidbezeichnung. Die Farbkodierung entspricht den typischen Färbungen der Proteine, bedingt durch die jeweiligen Kofaktoren (Cytochrom P450: rot; Etp1^{fd} (516-618): braun; Arh1: gelb).

Die erfolgreiche Transformation von *Bacillus megaterium* MS941 in die jeweiligen Expressionssysteme wurde anhand einer Plasmidreisolierung der Transformanten mit anschließender Kontrollrestriktion überprüft. Das Ergebnis dieser Überprüfung ist am Beispiel der Ganzzellsysteme MK-1 und MK-2 in Abbildung 3.14 gezeigt.

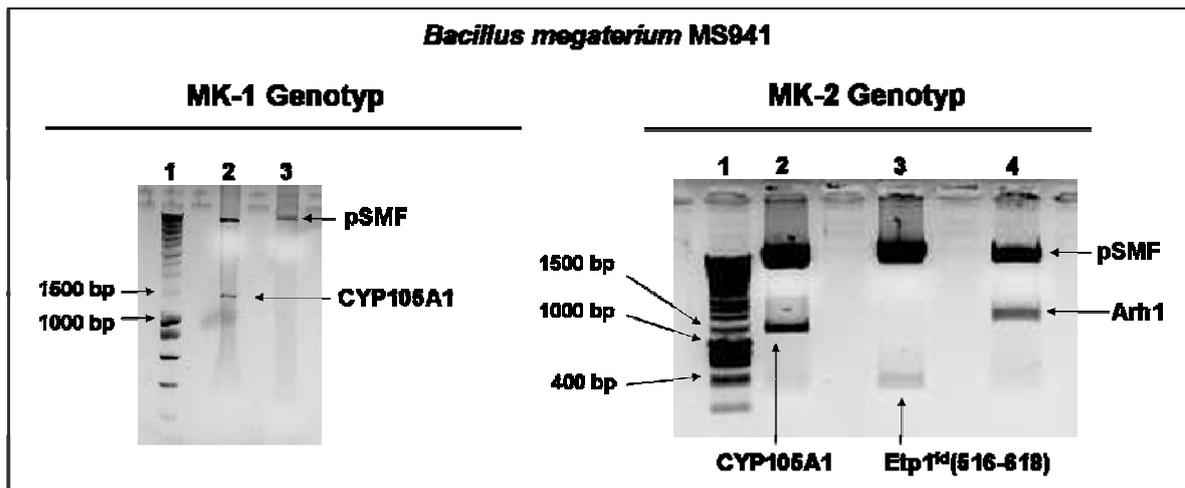


Abbildung 3.14: Genotyp der *Bacillus megaterium*-Systeme MK-1 und MK-2. Die Plasmid-DNA wurde reisoliert und via Kontrollrestriktionen auf das Vorhandensein der gewünschten DNA-Fragmente untersucht.

3.2.2. Umsatzoptimierung durch Verbesserung der heterologen Proteinexpression

Nach der Klonierung der entsprechenden *Bacillus megaterium*-Systeme, wurden die resultierenden Transformanten bezüglich ihrer Umsatzaktivität untersucht. Als Substrat wurde Glimepirid verwendet, da dieser Sulfonylharnstoff von allen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Substraten die besten kinetischen Eigenschaften in der Umsetzung mit CYP105A1 zeigte. Demzufolge wurden die Ganzzellumsetzungen auch zunächst mit den CYP105A1-Wildtyp exprimierenden Systemen MK-1 und MK-2 durchgeführt, wobei MK-1 als Kontrolle verwendet werden sollte. Die Kultivierung wurde in 50 ml LB-Medium in einem Schikanekolben durchgeführt. Die Zugabe von Glimepirid (50 μ M), gelöst in 500 μ l DMSO erfolgte 24 Stunden nach Induktion der heterologen Proteinexpression. Die Ergebnisse der Ganzzelleexperimente sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

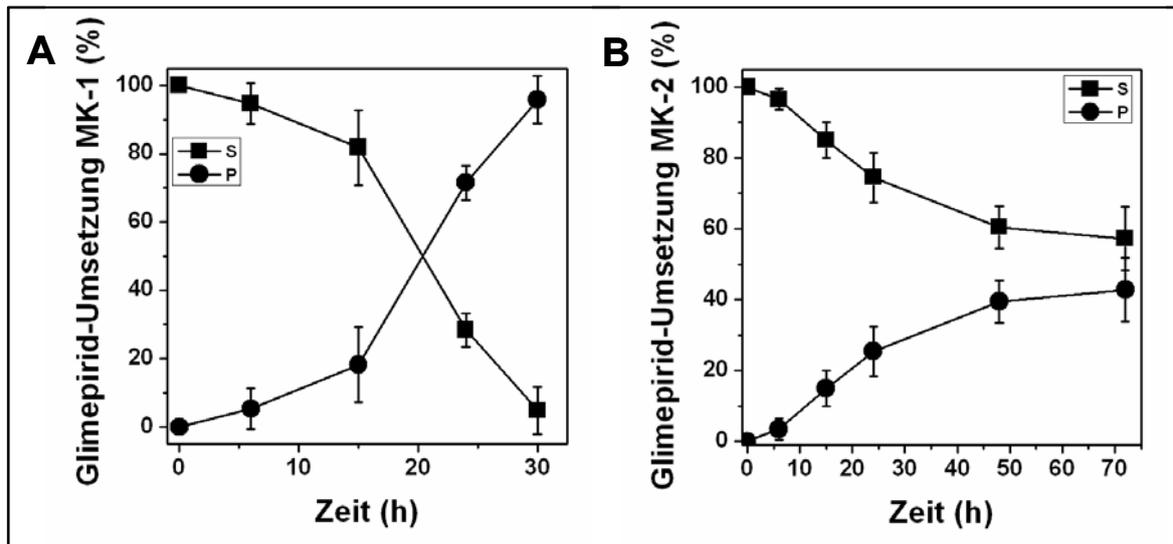


Abbildung 3.15: A) Glimperid-Umsetzung (50 μ M) mit MK-1. B) Glimperid-Umsetzung (50 μ M) mit MK-2. Die Zellen wurden in LB-Medium kultiviert. Die Substratzugabe erfolgte 24 Stunden nach der Induktion der heterologen Proteinexpression mit Xylose. Der zeitliche Verlauf der Substratmetabolisierung ist durch die Substratabnahme S (Quadrat) und die Produktzunahme P (Kreis) dargestellt. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Überraschenderweise zeigte sich, dass das Substrat ebenfalls durch das lediglich CYP105A1-exprimierende Ganzzellensystem MK-1 metabolisiert wurde (Abbildung 3.15 A). Ursprünglich sollte dieses System neben dem mit dem leeren pSMF-Vektor transformierten MK-0 nur als Kontrollsystem dienen. Da die HPLC-Profile der Produktbildung durch MK-1 und MK-2 mit denen der *in vitro*-Umsetzungen identisch waren (Abbildung 3.10 A, 3.29 A), konnte die Glimperid-Metabolisierung auf das heterolog exprimierte CYP105A1 zurückgeführt werden. Dies wurde durch ein entsprechendes Kontrollexperiment mit MK-0 bestätigt, in dem keine Glimperid-Umsetzung beobachtet wurde. Die Ergebnisse führten daher zu der Schlussfolgerung, dass der Wirtsorganismus *Bacillus megaterium* über ein Redoxsystem verfügt, welches die CYP105A1-Reaktion effektiv unterstützen kann.

Des Weiteren zeigte der Vergleich der Glimperid-Umsetzung zwischen dem MK-1 und dem MK-2-System, dass MK-1 im Gegensatz zu MK-2 die eingesetzte Substratkonzentration (Abbildung 3.15 B) vollständig metabolisieren konnte. Als Ursache der unterschiedlichen Umsetzungskapazität der Systeme MK-1 und MK-2 wurde ein quantitativ unterschiedliches Expressionslevel von CYP105A1 vermutet. Zur Untersuchung dieser These wurde ein Western-Blot-Experiment zum Vergleich der CYP105A1-Expression in beiden Systemen mit normierten Zellzahlen durchgeführt. Zusätzlich sollte das Experiment darüber Aufschluss geben, nach welcher Zeit die maximale CYP105A1-Menge exprimiert wird. Das Ergebnis der CYP105A1

Expressionsstudien mit MK-1 und MK-2, 24 und 48 Stunden nach Induktion ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

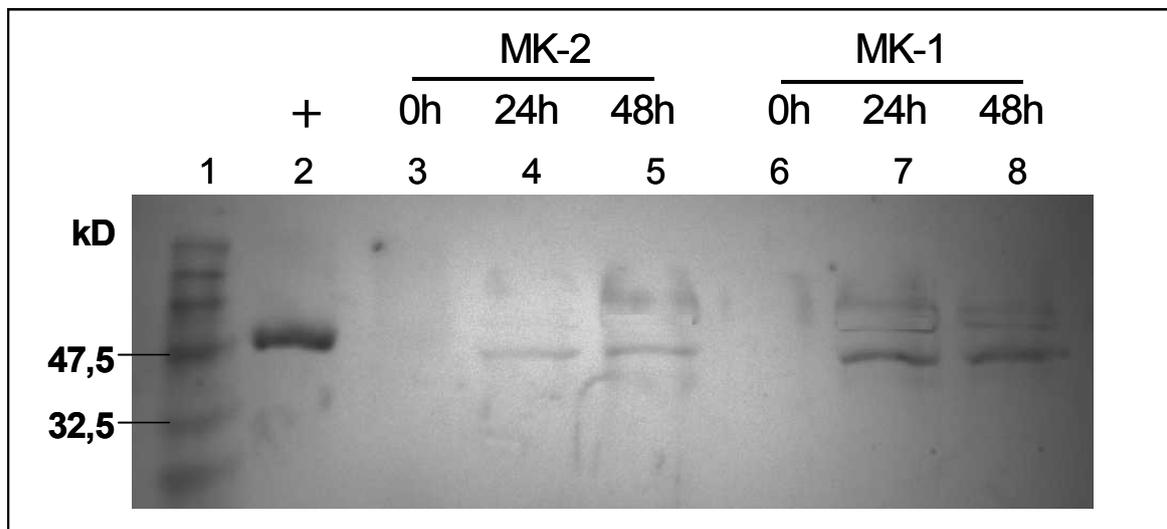


Abbildung 3.16: Western-Blot der CYP105A1-Expression in *B. megaterium* MS941 MK-1 und MK-2 in LB-Medium. Nach einer 24- bzw. 48-stündigen Expressionszeit wurde eine zuvor normierte Zellkonzentration lysiert. Das heterolog exprimierte Cytochrom P450 wurde mithilfe von Anti-CYP105A1-Antikörpern nachgewiesen. Spur1: Marker; Spur2: Positivkontrolle mit gereinigtem CYP105A1; Spur 3, 4, 5 CYP105A1-Expression mit MK-2 nach 0, 24 und 48 Stunden; Spur 6, 7, 8 CYP105A1-Expression mit MK-1 nach 0, 24 und 48 Stunden.

Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass die CYP105A1-Expression durch MK-2 im Vergleich zu MK-1 deutlich geringer ist. Das MK-1 System, welches nur mit dem CYP105A1-Gen transformiert wurde, lieferte ein deutlich stärkeres Expressionssignal. Diese Beobachtung bestätigte die Vermutung, dass die Expression von CYP105A1 mit MK-2 durch die zusätzliche Koexpression der Redoxproteine Arh1 und Etp1^{fd} (516-518) reduziert war. Aus dem Ergebnis geht weiterhin hervor, dass das Maximum der CYP105A1-Expression bereits nach 24 Stunden erreicht ist. Ein stärkeres Signal war im Immuno-Blot nach 48 Stunden nicht zu beobachten.

Um den Ganzzellumsatz für eine potenzielle biotechnologische Anwendung weiter zu optimieren, wurden zunächst Studien zur Verbesserung der heterologen Proteinexpression durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde zur Steigerung des Nährstoffangebots und zur Stabilisierung des pH-Wertes das anfangs zur Kultivierung verwendete LB-Medium durch das reichhaltigere und gepufferte TB-Medium ersetzt. Der Effekt auf die CYP105A1-Expression wurde erneut durch Western-Blot-Experimente mithilfe des MK-1-Systems untersucht. Als Kontrolle diente eine MK-1-abhängige CYP105A1-Expression in LB-Medium. Für das Western-Blot-Experiment wurden die Zellzahlen der jeweiligen Kulturen ebenfalls normiert. Zusätzlich wurde die

optische Dichte der Kulturen in den jeweiligen Medien gemessen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 3.17 dargestellt.

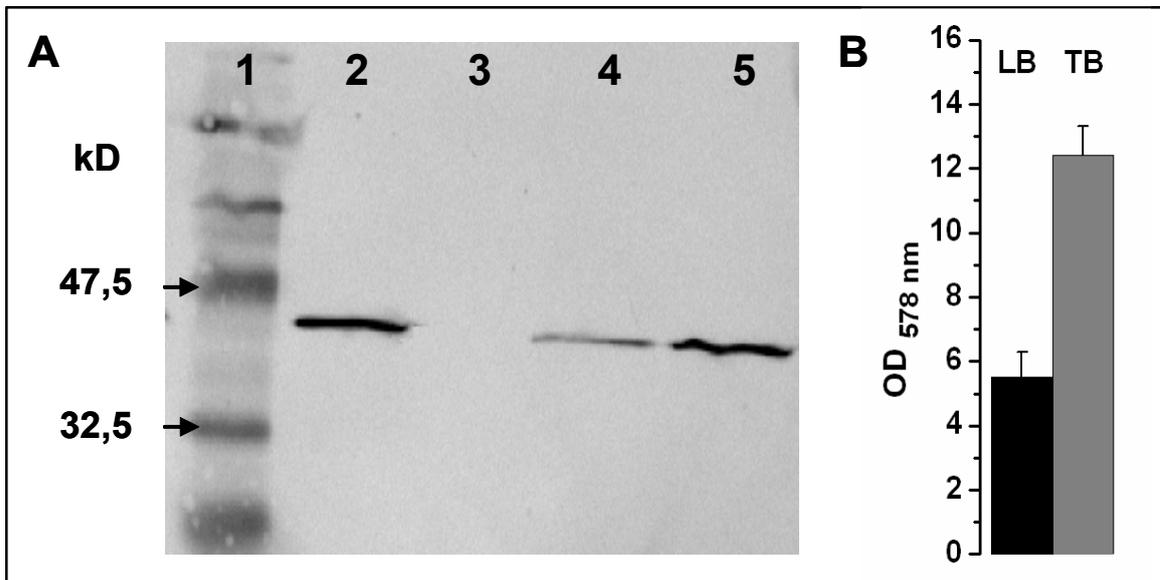


Abbildung 3.17: Expressionsvergleich von CYP105A1 unter Verwendung verschiedener Kulturmedien. A) Western-Blot mit Anti-CYP105A1: Spur 1: Marker; Spur 2: Signal von gereinigtem CYP105A1 als Positivkontrolle. Spur 3 induziertes Kontrollsystem MK-0; Spur 4: CYP105A1-Signal nach 24-stündiger Expression in LB-Medium, Spur 5: CYP105A1-Signal nach 24-stündiger Expression in TB-Medium.

B) OD_{587 nm} von *Bacillus megaterium* MS941 MK-1, 24 Stunden nach Induktion. Die Standardabweichung der einzelnen Messpunkte resultiert aus drei unabhängigen Experimenten.

Bei Verwendung von TB-Medium zeigte sich im Western-Blot-Experiment ein deutlich stärkeres CYP105A1-Signal (Abbildung 3.17 A). Auch eine Verdoppelung der optischen Dichte der Kultur konnte beobachtet werden (Abbildung 3.17 B). Demnach steht einer Biotransformation neben einer stärkeren CYP105A1-Expression aufgrund einer gesteigerten Teilungsrate eine größere Anzahl von Wirtsorganismen zur Verfügung. Unter diesen Bedingungen wurde erneut eine Umsetzung von 50 µM Glimperid durchgeführt. Die daraus resultierende Umsatzsteigerung ist in Abbildung 3.18 dargestellt.

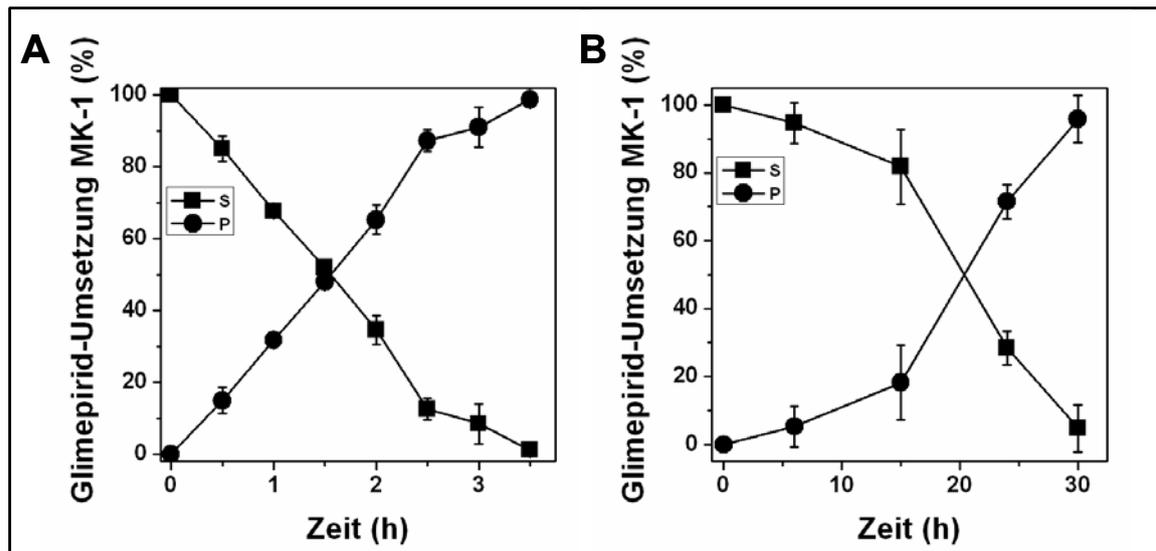


Abbildung 3.18: A) Umsetzung von 50 μM Glimepirid mit MK-1 in TB-Medium B) Umsetzung von 50 μM Glimepirid mit MK-1 in LB-Medium MK-1. Bei den jeweiligen Umsetzungen ist der Verlauf von Substratabnahme S (Quadrat) und Produktzunahme P (Kreis) gezeigt. Die einzelnen Messpunkte stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar.

Aus der Abbildung geht hervor, dass das Glimepirid (50 μM) durch die Kultivierung des Ganzzellsystems MK-1 in TB-Medium deutlich effektiver metabolisiert werden konnte. Das Substrat konnte nach einer 3,5-stündigen Reaktionszeit nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 3.18 A), während für die vollständige Umsetzung derselben Substratkonzentration in einer Kultur mit LB-Medium über 30 Stunden benötigt wurden (Abbildung 3.18 B). Somit konnte die Effizienz des Systems durch Verwendung von TB-Medium nahezu verzehnfacht werden.

Nachdem die Katalyseeffizienz des rekombinanten *Bacillus megaterium* MK-1 im Vergleich zu den Anfangsbedingungen deutlich verbessert werden konnte, wurden die Systeme MK-1 und MK-2 erneut in einer Glimepirid-Umsetzung (50 μM) miteinander verglichen (Abbildung 3.19).

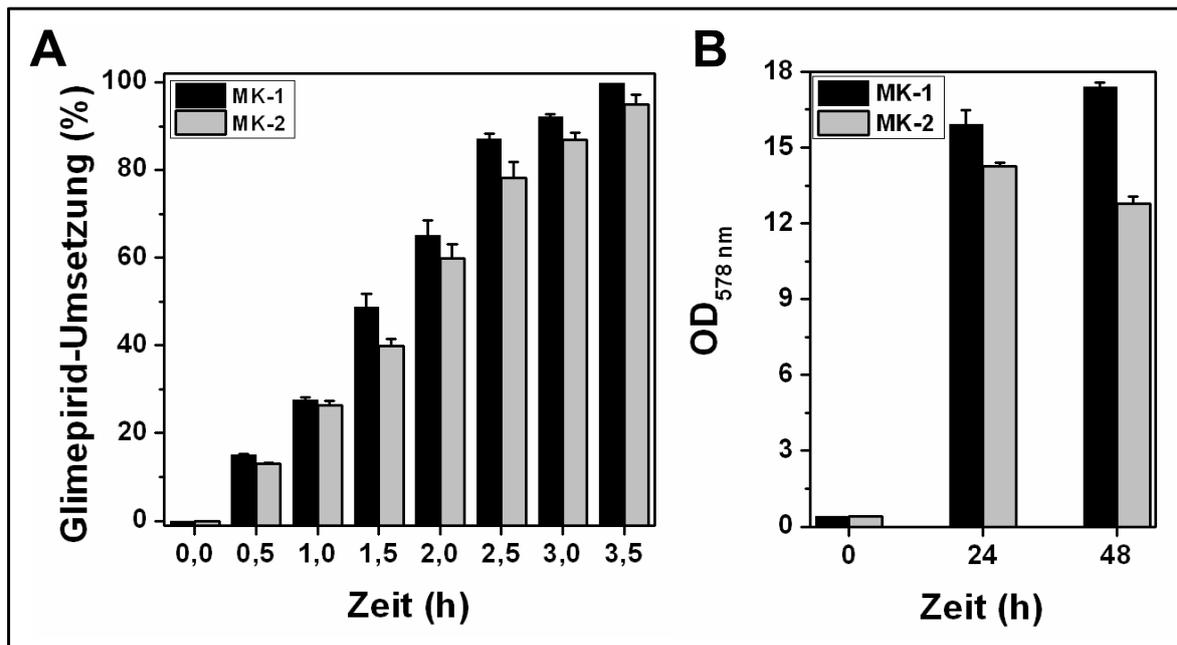


Abbildung 3.19 A) Vergleich der Ganzzellsysteme MK-1 und MK-2 in der Umsetzung von 50 µM Glimperid in TB-Medium. Das Substrat wurde 24 Stunden nach Induktion in einer Endkonzentration von 50 µM zu den Kulturen gegeben. B) Verlauf der optischen Dichte. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dreier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar.

Aus Abbildung 3.19 A geht hervor, dass auch die Aktivität von *Bacillus megaterium* MK-2 unter Verwendung von TB-Medium deutlich gesteigert werden konnte. Allerdings zeigte sich MK-1 gegenüber MK-2 immer noch etwas effektiver in der Umsetzung von 50 µM Glimperid (Abbildung 3.19 A). Auch bei dem Vergleich der ODs beider Kulturen wurden geringfügige Unterschiede beobachtet. Die OD der MK-2-Kultur war im Vergleich zur MK-1-Kultur etwas niedriger und zeigte im zeitlichen Verlauf sogar eine leicht rückläufige Tendenz (Abbildung 3.19 B).

In dem folgenden Experiment sollte die Koexpression der Proteine Arh1 und Etp1^{fd} (516-618) nachgewiesen werden. Dazu wurden die Systeme MK-2 und MK-0, 24 Stunden nach Induktion der Expression lysiert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Lysate via Western-Blot analysiert. Die Immuno-Blots wurden mit den Antikörpern Anti-Etp1^{fd} und Anti-Arh1 durchgeführt. Der Nachweis der heterologen Expression von Arh1 und Etp1^{fd} (516-618) durch das MK-2-Ganzzellsystem ist in Abbildung 3.20 dargestellt.

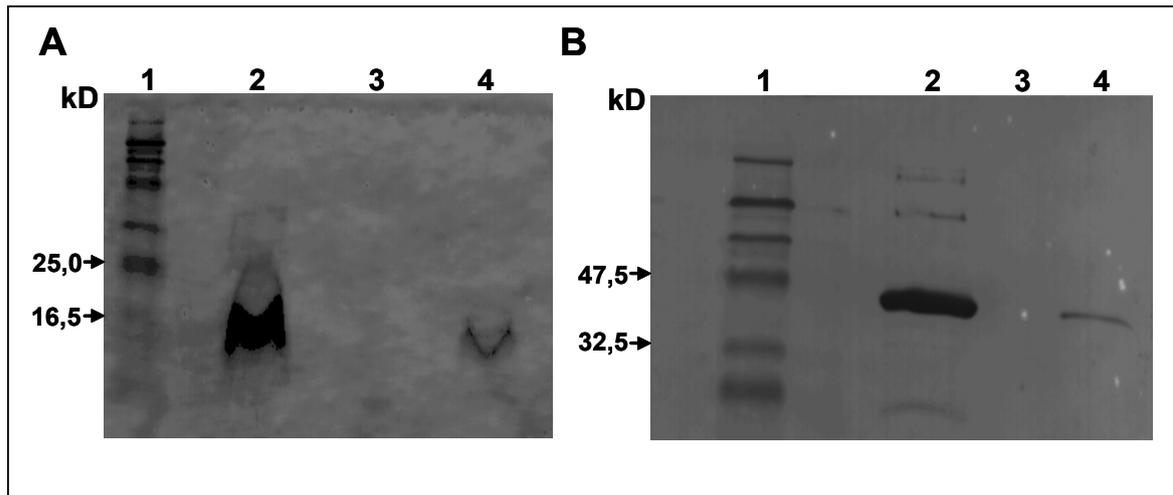


Abbildung 3.20: Western-Blot von MK-2-Kulturlysaten 24 h nach Induktion. Das MK-1-System wurde als Negativkontrolle verwendet. A) Anti-Etp1^{fd}: Spur 1: Marker; Spur 2: Signal von gereinigtem Etp1^{fd} (516-518); Spur 3: MK-1-Lysat; Spur 4: Etp1^{fd} (516-518) Signal aus MK-2-Lysat nach 24-stündiger Expression in TB-Medium. B) Anti-Arh1: Spur 1: Marker; Spur 2: Signal von gereinigtem Arh1; Spur 3 MK-1 Lysat; Spur 4: Arh1-Signal nach 24-stündiger Expression in TB-Medium.

Aufgrund der höheren Aktivität von MK-1 gegenüber MK-2, wurde das MK-1-System für weitere Optimierungen herangezogen. In dem folgenden Schritt wurde der Effekt von δ -Aminolaevulinat (δ -Ala) untersucht. Dieser Häm-Vorläufer wird üblicherweise zur Steigerung der heterologen Expression von Cytochromen P450, so auch zur Steigerung der CYP105A1-Expression in *E.coli* zeitgleich mit dem Induktor zugegeben. Gemäß der Literatur wurde eine Endkonzentration von 0,5 mM δ -Ala für das Experiment verwendet [Hussain und Ward, 2003; Sawada *et al.*, 2004; Hayashi *et al.*, 2008]. Das Ergebnis der Umsetzung von 50 μ M Glimpirid in Gegenwart von δ -Ala ist in Abbildung 3.21 dargestellt.

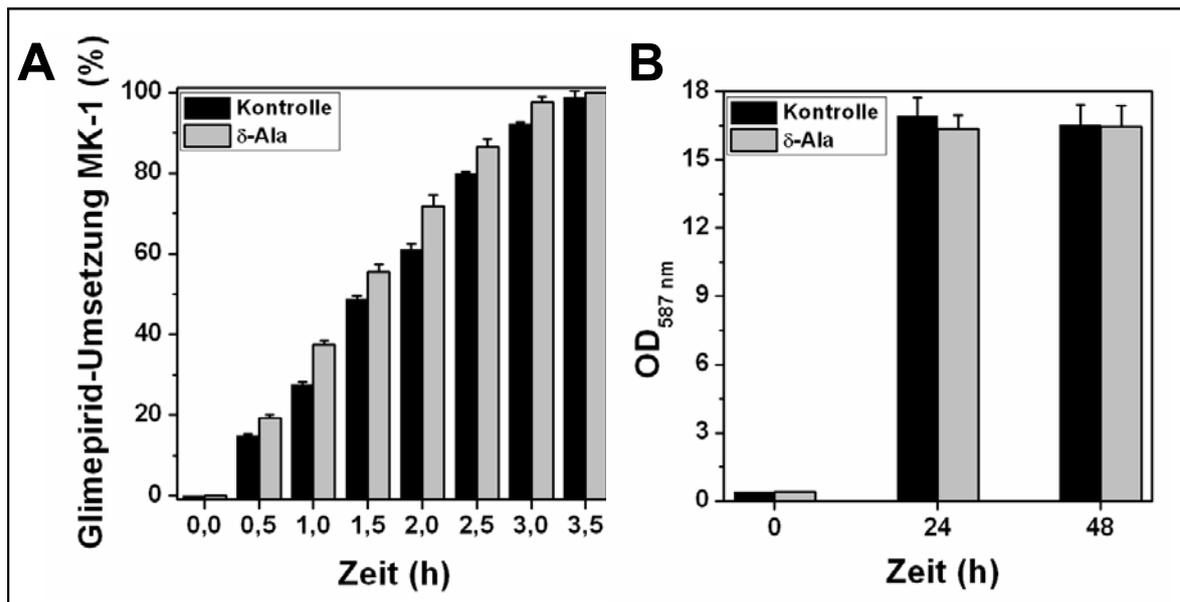


Abbildung 3.21: Vergleich einer (A) Glimepirid-Umsetzung (50 µM) und (B) der optischen Dichte von MK-1-Kulturen mit und ohne Zugabe der Häm-Vorstufe δ-Ala. Die Substratzugabe erfolgte 24 Stunden nach der Induktion. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt.

Durch den Zusatz von δ-Aminolaevulinat konnte die Metabolisierung von Glimepirid erneut leicht gesteigert werden (Abbildung 3.21 A). Damit scheint der Zusatz von δ-Aminolaevulinat auch im Ganzzellsystem mit *Bacillus megaterium* eine positive Wirkung auf die Häm-Assemblierung aufzuweisen. Ein Unterschied in der optischen Dichte konnte im Vergleich zum Kontrollexperiment nicht beobachtet werden (Abbildung 3.21 B).

3.2.3. Optimierung durch Verbesserung der Bioverfügbarkeit der Substrate

Es ist bekannt, dass die Bioverfügbarkeit von Vitamin D₃ für biotechnologische Anwendungen durch Solubilisierung mit Cyclodextrinen erhöht werden kann [Tuckey *et al.*, 2008]. Auch im Zusammenhang mit Sulfonylharnstoffen sind durch die Verwendung von Cyclodextrinen optimierte Effekte beschrieben. So wurde beispielsweise mit Gliquidon, einem Sulfonylharnstoff-Medikament der 2. Generation, durch Solubilisierung mit Cyclodextrinen eine gesteigerte Hypoglykämie am Rattenmodell beobachtet [Miro *et al.*, 2004]. Entsprechend sollte im Rahmen dieser Arbeit der Effekt einer Solubilisierung von Glimepirid und Glibenclamid, auf die Effizienz des Ganzzellsystems untersucht werden.

Um solubiliertes Glimepirid und Glibenclamid in wässriger Lösung quantifizieren zu können, war zunächst die Bestimmung der jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten erforderlich. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe beider Verbindungen via Spektralphotometer im Wellenlängenbereich zwischen 200 und 300 nm gemessen. Anhand der λ_{max} -Werte der Sulfonylharnstoffe Glibenclamid und Glimepirid bei der

Wellenlänge $\lambda = 230 \text{ nm}$ wurde mithilfe der Origin pro 8.1 G Software eine Bestgerade erstellt (Abbildung 3.22).

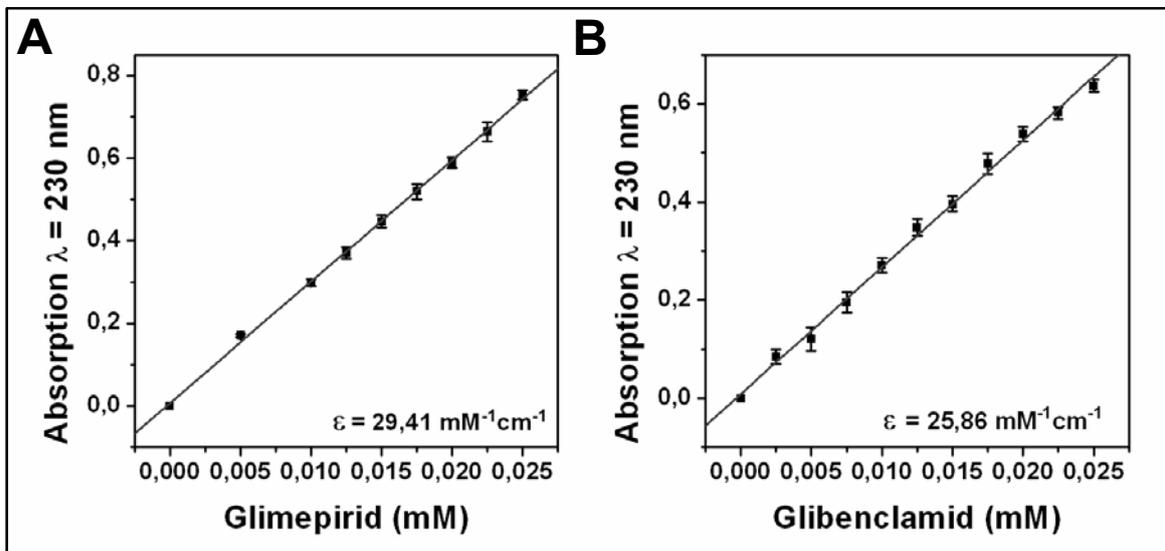


Abbildung 3.22: Linearer Kurvenfit einer Verdünnungsreihe von A) Glimepirid und B) Glibenclamid. Der Kurvenfit wurde mittels Origin pro 8.1 G Software durchgeführt. Die entsprechenden Materialkonstanten ergeben sich aus der Steigung der jeweiligen Geraden.

Die jeweiligen Materialkonstanten ϵ ergeben sich aus der Steigung der jeweiligen Geradengleichungen. Für Glimepirid wurde ein Extinktionskoeffizient von $29,41 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und für Glibenclamid wurde ein Extinktionskoeffizient von $25,86 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ errechnet. Diese Materialkonstanten erlauben die Konzentrationsbestimmung der mithilfe der Cyclodextrine in Lösung gebrachten Sulfonylharnstoffe über das Lambert-Beersche-Gesetz.

Neben den Basis-Cyclodextrinen gamma-CD und beta-CD, wurden auch die derivatisierten beta-Cyclodextrinvarianten RAMEB und HP-beta-CD untersucht. Dazu wurden zunächst gesättigte Lösungen der einzelnen Cyclodextrinderivate in destilliertem Wasser hergestellt. Die Sulfonylharnstoff-Substrate Glimepirid und Glibenclamid wurden im Überschuss zu den Ansätzen gegeben und 16 Stunden auf einem Magnetrührer gerührt. Nach Filtration der Lösungen über eine CME-Membran, konnte die Konzentration von Glimepirid und Glibenclamid in den Lösungen über das Lambert-Berrsche-Gesetz berechnet werden. Die Ergebnisse der Solubilisierungsexperimente sind in Abbildung 3.23 dargestellt.

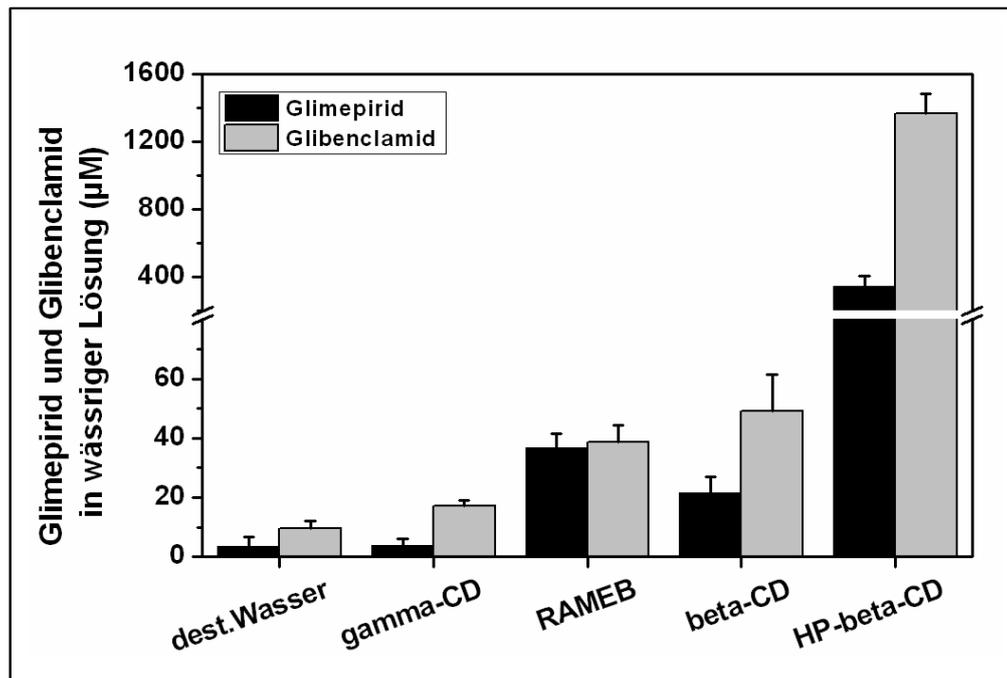


Abbildung 3.23: Solubilisierungseffektivität verschiedener Cyclodextrinderivate von Glibenclamid und Glimepirid. Die Standardabweichung der einzelnen Messpunkte resultiert aus drei unabhängigen Experimenten.

HP-beta-CD zeigte in diesem Experiment die beste Lösungsvermittlung für beide Substrate. Hier konnte die Löslichkeit von 2,3 mg/l auf $670 \text{ mg/l} \pm 29 \text{ mg/l}$ nahezu um das 300-fache gesteigert werden. Die Löslichkeit von Glimepirid konnte von weniger als 1 mg/l auf $170 \text{ mg/l} \pm 13 \text{ mg/l}$ gesteigert werden. Mit den anderen untersuchten Cyclodextrinderivaten wurde ebenfalls eine Löslichkeitssteigerung beobachtet, die jedoch vergleichsweise sehr gering ausfiel. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde HP-beta-CD neben der Solubilisierung von Vitamin D₃ auch zur Solubilisierung der Sulfonylharnstoffe eingesetzt. Vor dem Einsatz von HP-beta-CD in Umsatzexperimenten sollte jedoch zunächst eine potentielle Toxizität von HP-beta-CD auf den Wirtsorganismus untersucht werden.

In der Literatur sind bakterizide Effekte von Cyclodextrinen auf verschiedene Mikroorganismen beschrieben. Zhang und Mitarbeiter haben sowohl eine Wachstumsinhibierung als auch eine Zellyse im Zusammenhang mit den Cyclodextrinderivaten α -CD und Methyl-beta-CD gegenüber *Bacillus halodurans* nachgewiesen [Zhang *et al.*, 2008]. Das für diese Studien verwendete HP-beta-CD zeigt wiederum einen toxischen Effekt gegenüber *Mycoplasma capricolum* und *Acholeplasma laidlawii* [Greenberg-Ofrath *et al.*, 1992]. Ein Effekt von HP-beta-CD auf *Bacillus megaterium* wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Eine Wachstumskurve wurde mit dem Expressionssystem MK-1 in Gegenwart einer HP-beta-CD Konzentration von 4,5 % (w/v) aufgenommen. Das Cyclodextrin wurde zeitgleich mit der Inokulation der

Hauptkultur zugegeben. Einer Kontrollkultur wurde entsprechend kein Cyclodextrin zugegeben. Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB-Medium, allerdings ohne Induktion der heterologen Proteinexpression. Der Verlauf der Wachstumskurven ist in Abbildung 3.24 dargestellt.

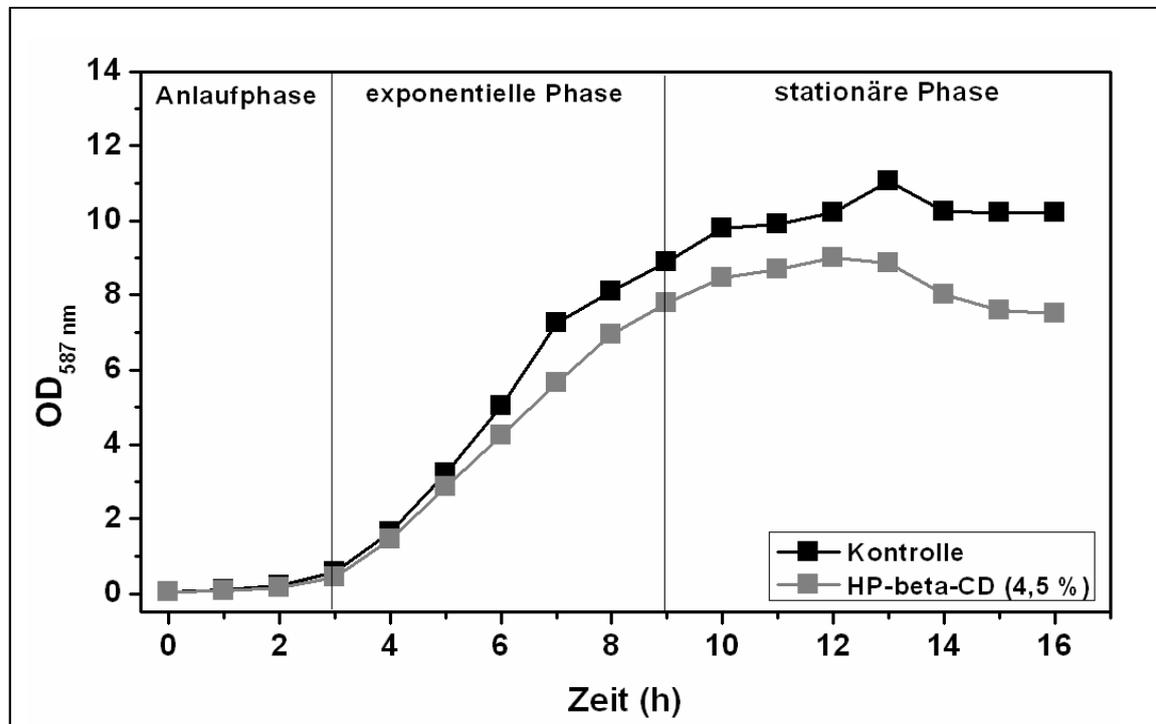


Abbildung 3.24: Wachstumskurve einer *Bacillus megaterium* MK-1 Kultur in Gegenwart einer HP-beta-CD-Konzentration von 4,5 % in LB-Medium. Als Kontrolle diente eine MK-1-Kultur ohne Cyclodextrinzusatz. Beide Kulturen wurden nicht induziert.

Beide Kulturen erreichten nach einer ca. 2,5-stündigen Anlaufphase die exponentielle Wachstumsphase. Die stationäre Phase der mit Cyclodextrinen kultivierten Zellen wurde bereits bei einer geringeren OD erreicht. Diese Beobachtung, die als geringfügiger toxischer Effekt des Cyclodextrins gegenüber *Bacillus megaterium* interpretiert werden könnte, ist allerdings aufgrund der Einfachbestimmung des Experiments nicht gesichert. Im Falle der Sulfonylharnstoff-Umsetzungen wird das Substrat mit dem Cyclodextrin allerdings erst 24 Stunden nach Induktion der Kultur zugegeben. Zu diesem Zeitpunkt liegt bereits eine hohe Zelldichte mit der maximal exprimierten Menge an CYP105A1 vor. Bei einer erforderlichen Abweichung dieser experimentellen Vorgehensweise, wie bei der Umsetzung von Vitamin D₃ praktiziert, wird dieser Effekt als Kompromiss in Kauf genommen. Des Weiteren wurde festgelegt, dass in allen Experimenten eine Cyclodextrinkonzentration von maximal 2,25 % (w/v) verwendet wird.

Nach erfolgreicher Steigerung der Löslichkeit von Glimperid und Glibenclamid, wurde im folgenden Experiment der Effekt der Löslichkeitssteigerung auf die Ganzzellumsetzung untersucht. HP-beta-CD wurde 5 Minuten vor Substratzugabe der bereits 24 Stunden

zuvor induzierten MK-1-Kultur zugegeben. Die jeweiligen Sulfonylharnstoffe wurden vor der Zugabe zur Kultur in 500 µl DMSO gelöst. Die Endkonzentration der Substrate betrug 50 µM. Das Ergebnis der Ganzzellumsetzungen ist in Abbildung 3.25 gezeigt.

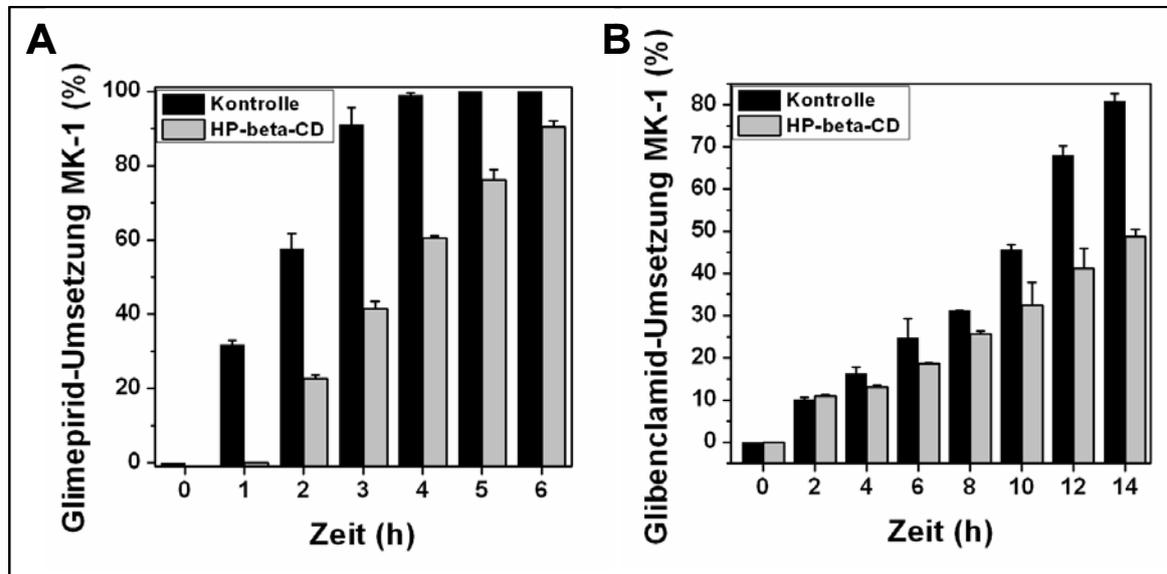


Abbildung 3.25: Umsetzungen der Sulfonylharnstoffe mit und ohne Zusatz von HP-beta-CD. Die Kultivierung wurde in TB-Medium in Gegenwart von 50 µM (A) Glimepirid und (B) Glibenclamid durchgeführt. Die Cyclodextrinzugabe erfolgte 5 min vor der Substratzugabe. Die Endkonzentration des Cyclodextrins in der Kultur betrug 2,25 % (w/v). Die Substrate wurden vor der Zugabe zu den Kulturen in 500 µl DMSO gelöst. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt.

Obwohl die Löslichkeit der Substrate um ein Vielfaches gesteigert werden konnte, zeigte sich durch die Zugabe von CD eine deutliche Reduktion der Umsatzeffizienz mit beiden Sulfonylharnstoff-Substraten. Demnach ist HP-beta-CD zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit der Substrate Glibenclamid und Glimepirid für eine verbesserte Ganzzellumsetzung unter diesen Kulturbedingungen ungeeignet.

3.2.4. Umsatzoptimierung durch Membranpermeabilisierung

Ein weiterer Ansatzpunkt für die Optimierung einer Ganzzelltransformation niedermolekularer Verbindungen ist die Permeabilisierung der Zellmembranen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Steigerung der Membranpermeabilität das oberflächenaktive *Quillaja*-Saponin (aus *Quillaja saponaria*) verwendet. In dem folgenden Experiment sollte mithilfe des Substrates Glimepirid die günstigste Saponin-Konzentration ermittelt werden. Das Ergebnis dieser Studie ist in Abbildung 3.26 dargestellt.

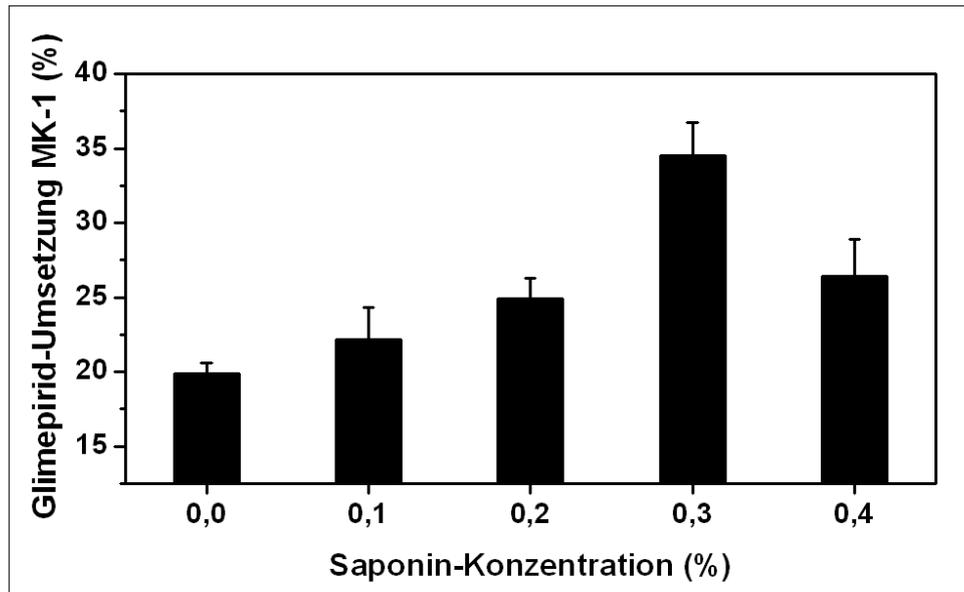


Abbildung 3.26: MK-1-Metabolisierung von Glimepirid (50 μ M) in Gegenwart verschiedener Saponin-Konzentrationen. Die Saponin-Zugabe erfolgte 30 Minuten vor der Substratzugabe. Der Effekt des Saponins wurde eine Stunde nach Substratzugabe analysiert. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt.

Abbildung 3.26 zeigt eine kontinuierliche Steigerung der Umsetzung von Glimepirid bis zu einer Saponin-Konzentration von 0,3 %. Diese Konzentration scheint unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen die optimale Konzentration darzustellen. Bei einer weiteren Steigerung der Saponin-Konzentration wurde wieder ein Rückgang der Umsatzeffizienz beobachtet.

Im folgenden Experiment wurde ein CYP105A1-abhängige Ganzzellumsetzung mit Glimepirid und Glibenclamid in Gegenwart der Saponin-Konzentration von 0,3 % durchgeführt (Abbildung 3.27).

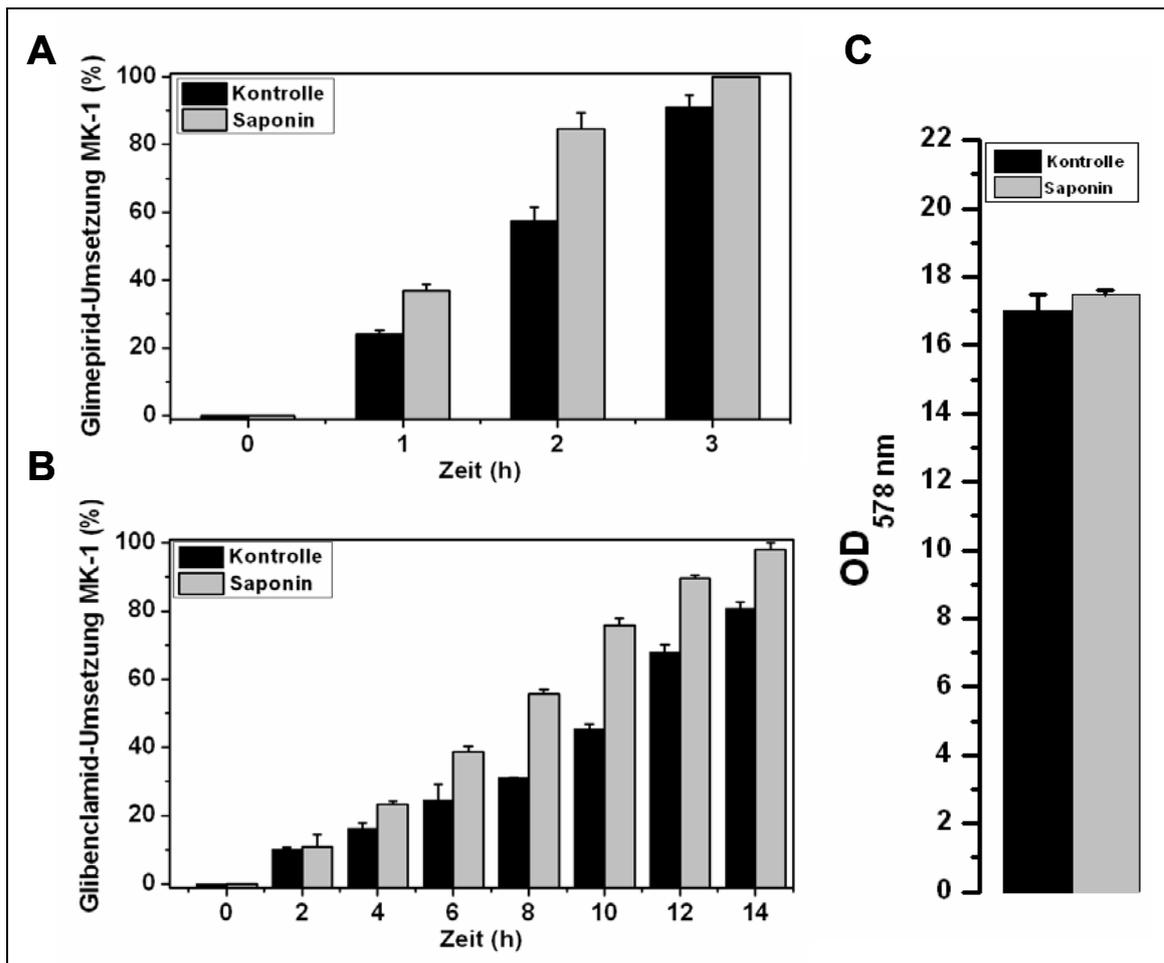


Abbildung 3.27: Ganzzellumsetzung mit *Bacillus megaterium* MK-1 von A) 50 μ M Glimpepid und B) 50 μ M Glibenclamid in Gegenwart von 0,3 % Saponin. Die Zugabe des Saponins erfolgte 30 min vor der Substratzugabe. (C) Vergleich der optischen Dichte einer *Bacillus megaterium*-Kultur in Gegenwart von 0,3 % Saponin nach 24 Stunden Kultivierungszeit. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt.

Die Abbildungen 3.27 A und 3.27 B zeigen für beide Sulfonylharnstoff-Substrate eine deutlich gesteigerte Umsetzung bei der Kultivierung in Gegenwart von 0,3 % Saponin. So ist die eingesetzte Glimpepid-Menge nach zwei Stunden bereits über 80 % metabolisiert worden, während im Kontrollexperiment in dieser Zeitspanne nur etwa 60 % des Glimpepids umgesetzt wurden. Glibenclamid wurde in Anwesenheit des Saponins nach 14 Stunden fast vollständig umgesetzt. Der Vergleichswert der Kontrolle betrug nach 14 Stunden etwa 80 %. Ein Unterschied der Zelldichte durch die Kultivierung mit Saponin wurde nicht beobachtet (Abbildung 3.35 C). Zusätzlich zu der OD-Messung wurden die Zellen 24 Stunden nach Substrat- und Saponin-Zugabe mikroskopiert. In der Kultur mit Saponin-Zusatz wie auch in der Kontrolle war eine hohe Dichte intakter Stäbchen zu erkennen. Ein toxischer Effekt durch Saponin (0,3 %) konnte damit nicht festgestellt werden.

3.2.5. Kombination aller optimierten Parameter in der Umsetzung mit Glimepirid und Glibenclamid.

Nach eingehender Optimierung der heterologen Proteinexpression sowie des Substratimports durch Etablierung geeigneter Kulturbedingungen, wurden alle, aus den Optimierungsschritten erzielten Parameter, in einer Ganzzellumsetzung mit Glimepirid und Glibenclamid kombiniert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.28 dargestellt.

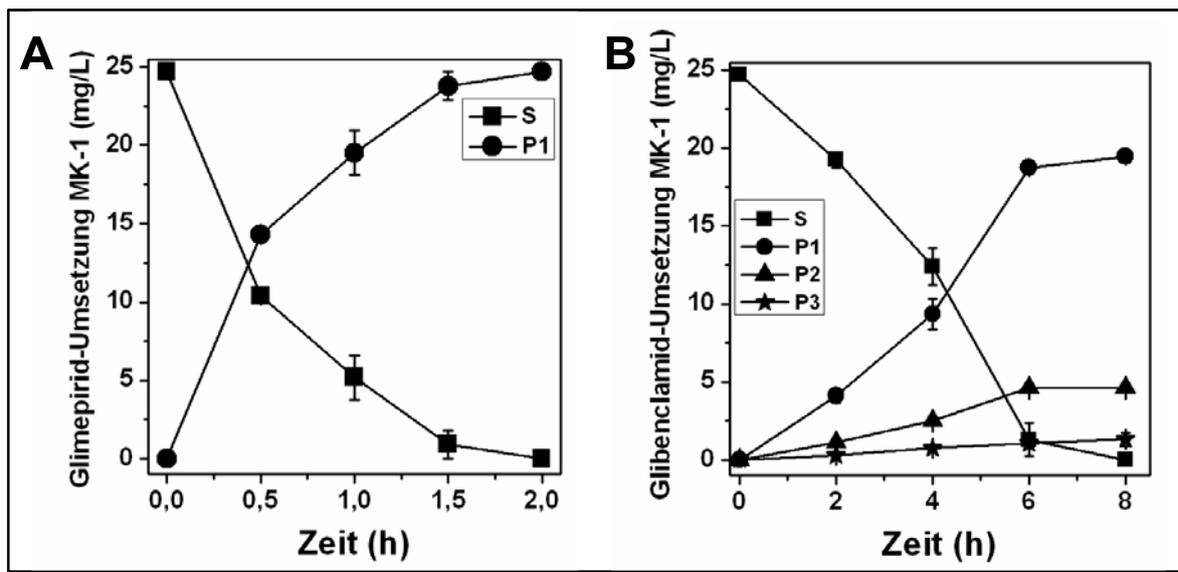


Abbildung 3.28: Umsetzung von (A) 50 µM Glimepirid (S) in das Produkt P1 (Kreis) und (B) 50 µM Glibenclamid (S) in die Produkte P1(Kreis), P2 (Dreieck) und P3 (Stern) unter optimierten Bedingungen mit 0.3% Saponin, 0.5 mM δ -Ala in TB-Medium mit dem MK-1-System. Die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt.

Im Zuge der Optimierung konnte die Effizienz des Ganzzellkatalysators um mehr als das 15-fache gesteigert werden. Vor Beginn der Optimierung wurde für eine Glimepirid-Umsetzung (50 µM) mehr als 30 Stunden (Abbildung 3.15 A) benötigt. Unter den optimierten Kulturbedingungen wurde dieselbe Glimepirid-Konzentration in ca. zwei Stunden umgesetzt. Die Reaktionsdauer einer vollständigen Umsetzung von 50 µM Glibenclamid konnte durch die angepassten Bedingungen auf 12 Stunden reduziert werden. Zu Beginn der Optimierung des Systems konnte keine vollständige Umsetzung von 50 µM Glibenclamid beobachtet werden (nicht gezeigt).

In Abbildung 3.29 sind die Chromatogramme der Ganzzellumsetzungen von Glimepirid und Glibenclamid dargestellt.

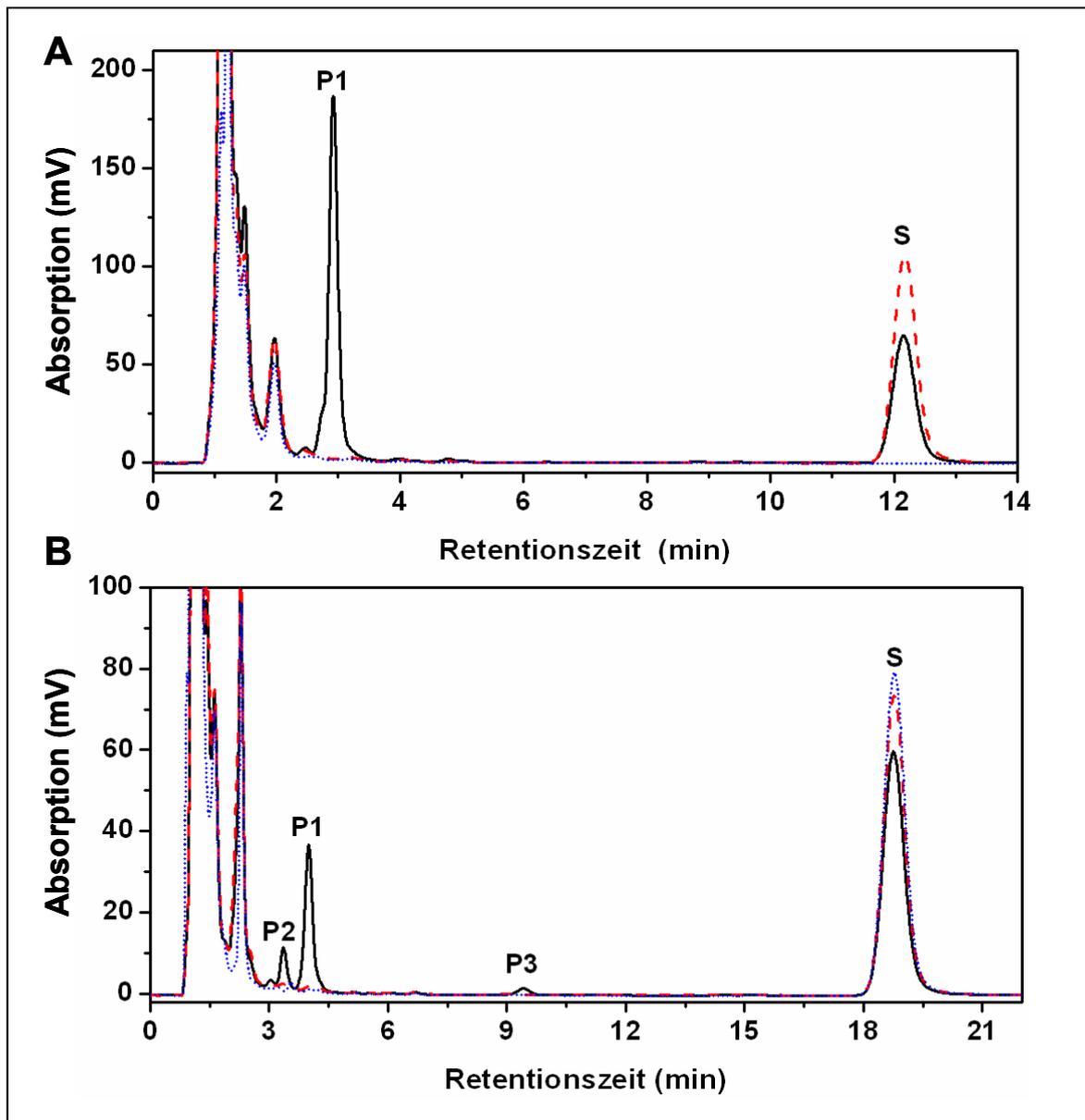


Abbildung 3.29: HPLC-Chromatogramme von *in vivo*-Umsetzungen mit dem rekombinanten *Bacillus megaterium* MS941-System MK-1 in TB-Medium von (A) Glimepirid (durchgezogene schwarze Linie: Glimepirid-Umsetzungen mit MK-1, gestrichelte rote Linie: Kontrolle mit MK-0, gepunktete blaue Linie: TB-Mediumextrakt) und (B) Glibenclamid (durchgezogene schwarze Linie: Glibenclamid-Umsatz mit MK-1, gestrichelte rote Linie: Kontrolle mit MK-0, gepunktete blaue Linie: TB-Mediumextrakt mit Substrat) Alle nicht bezeichneten Chromatogrammsignale stellen Verunreinigungen aus dem Ganzzellextrakt dar. Die Probenentnahmen zur Analyse der Glimepirid-Umsetzungen erfolgten eine Stunde und zur Analyse der Glibenclamid-Umsetzungen 6 Stunden nach der Substratzugabe.

Wie aus der Abbildung 3.29 zu entnehmen ist, sind die Produktmuster der *in vivo*-Umsetzungen von Glimepirid und Glibenclamid mit *Bacillus megaterium* MK-1 identisch mit den Produktmustern der *in vitro*-Umsetzungen (Abbildung 3.10 A, B) mit gereinigtem CYP105A1. Die HPLC-Signale, die keinem Produkt zuzuordnen sind, stellen Verunreinigungen aus dem Kulturmedium dar. Die Chromatogramme der Kontrollexperimente mit dem MK-0-System belegen, dass *Bacillus megaterium* keine

Aktivität gegenüber Glimepirid und Glibenclamid besitzt. Daraus wurde abgeleitet, dass Sulfonylharnstoffe nicht zum Substratspektrum von *Bacillus megaterium* gehören.

3.2.6. NMR-Strukturaufklärung

Mithilfe des Ganzzellbiokatalysators MK-1 erfolgte die Produktion der Hauptmetabolite der Sulfonylharnstoffe Glimepirid und Glibenclamid zur Strukturaufklärung via NMR. Die Produkte der Ganzzellumsetzungen konnten mit einer Ausbeute von ca. 25 mg (Glimepirid P1) bzw. ca. 35 mg (Glibenclamid P1) aus den jeweiligen *Bacillus megaterium*-Extrakten gereinigt werden. Diese Mengen waren absolut ausreichend für die Strukturaufklärung. Die Durchführung der Ganzzellumsetzung sowie der Präparation der Hauptmetabolite sind im Material- und Methodenteil der vorliegenden Arbeit beschrieben. Die HPLC-Chromatogramme der gereinigten Hauptprodukte von Glimepirid und Glibenclamid sind der Abbildung 7.7 des Anhangs zu entnehmen.

Die NMR-Messung sowie die Auswertung der Strukturdaten (siehe Anhang) der gereinigten Produkte wurden von Herrn Dr. J. Zapp am Lehrstuhl für pharmazeutische Chemie durchgeführt. In Abbildung 3.30 sind die Reaktionsgleichungen des CYP105A1-abhängigen Metabolismus der Sulfonylharnstoffe Glimepirid und Glibenclamid dargestellt.

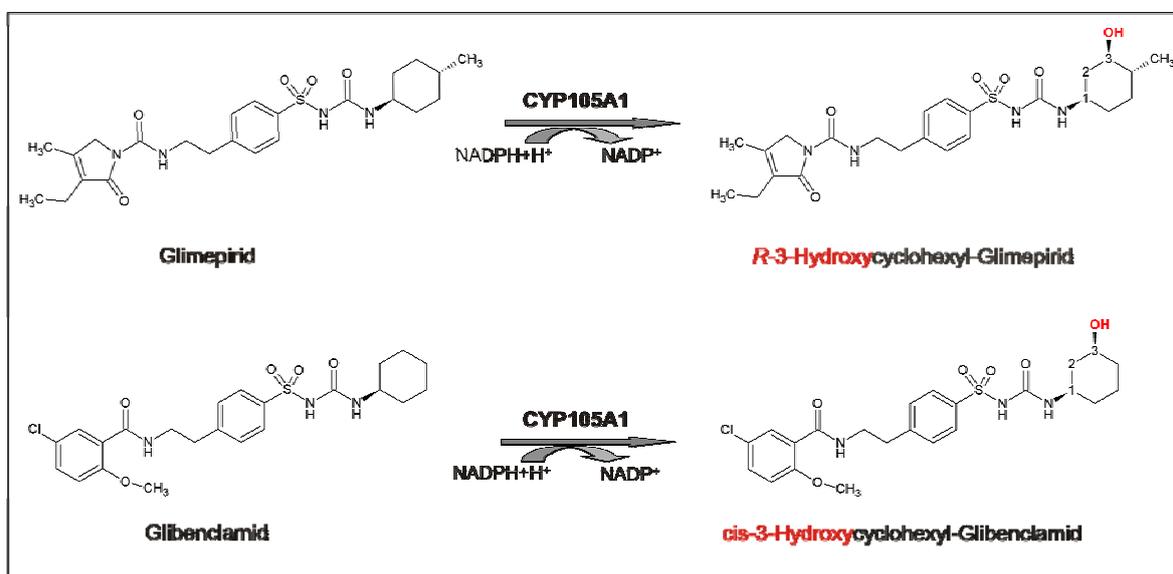


Abbildung 3.30: Reaktionsgleichungen des CYP105A1-abhängigen Metabolismus von Glimepirid und Glibenclamid. Die durch die Reaktion mit den jeweiligen Sulfonylharnstoffen eingeführten OH-Gruppen der Hauptprodukte sind rot markiert.

3.2.7. Stabilität der Derivate von Glimepirid und Glibenclamid

Glibenclamid wird im Zuge der CYP105A1-abhängigen Reaktion zu einem Hauptprodukt (P1) und zwei Nebenprodukten (P2, P3) metabolisiert. In diesem Zusammenhang wurde ein stabiles Verhältnis von Haupt- und Nebenprodukten (P1: P2: P3 = 7.5: 2.5: 0.5) über einen langen Beobachtungszeitraum festgestellt. Keines der Experimente lieferte Hinweise auf eine Folgemetabolisierung oder Degradation eines dieser Produkte.

Die Metabolisierung von Glimepirid durch den Ganzzellkatalysator führt zu einem Produkt (P1), welches im Zuge der HPLC-Analytik mit einer Retentionszeit von 2,5 Minuten eluiert wird. Obwohl zunächst ebenfalls von einer Stabilität dieses Produkts ausgegangen wurde, lieferte die NMR-Strukturaufklärung den Hinweis auf eine Folgemetabolisierung. Im Rahmen der Strukturaufklärung wurde eine auffällige Struktur mit einem Phenolrest identifiziert, die mit dem Glimepirid-Metabolismus in Verbindung gebracht werden konnte. Aufgrund dieser Beobachtung wurde das Produktmuster einer Umsetzung von 50 µM Glimepirid 24 Stunden nach Substratzugabe untersucht. Die Analyse dieser Kultur zeigte die vollständige Metabolisierung des Glimepirids nach 3 Stunden in das Produkt (P1). Das Substrat konnte bei einer Retentionszeit von etwa 12 Minuten nicht mehr nachgewiesen werden und das resultierende Produkt P1 wurde erwartungsgemäß bei einer Retentionszeit von 2,5 Minuten detektiert. Die HPLC-Analyse der 24 Stunden Probe zeigte überraschenderweise eine fast vollständige Bildung eines Folgeprodukts (P1f) mit einer Retentionszeit von 1,8 Minuten (Abbildung 3.31).

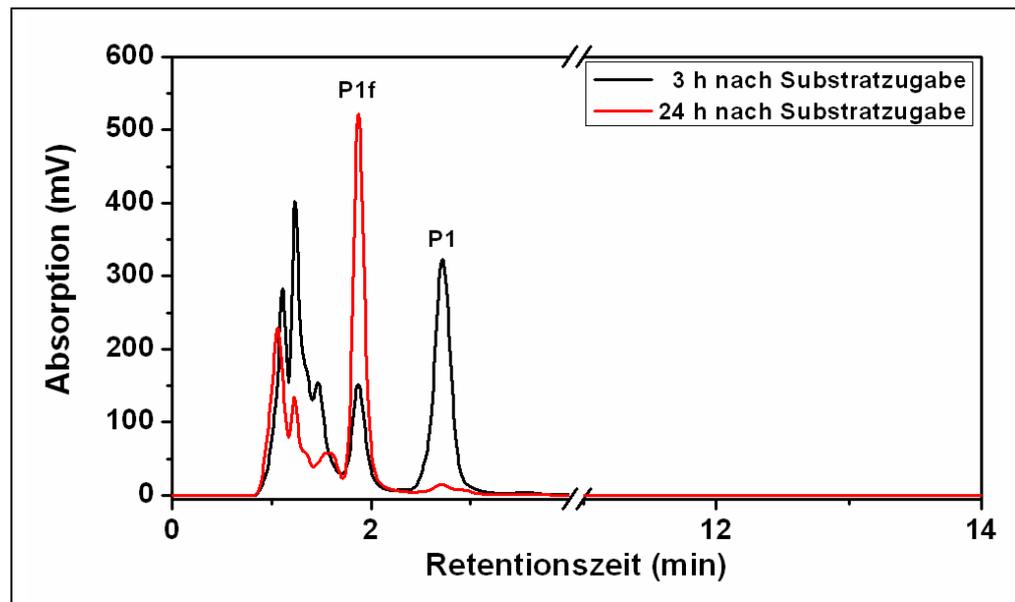


Abbildung 3.31: Folgeproduktbildung (P1f) von 3-*R*-Hydroxy-Cyclohexylglimepirid (P1) durch Verlängerung der Kultivierungszeit. Die Probenanalysen erfolgten 3 Stunden und 24 Stunden nach der Substratzugabe (Glimepirid 50 μ M) zu einer MK-1-Kultur, welche 24 Stunden zuvor induziert wurde.

In den HPLC-Analysen der vorherigen Experimente, wurde das Folgederivat (P1f) durch Verunreinigungen aus dem Kulturmedium maskiert. Denn sowohl das Folgeprodukt (P1f) als auch eine Verunreinigung des Kulturmediumextraktes zeigen ein Signal bei der Retentionszeit von 1,8 Minuten (vergl. Abbildung 3.29 A).

3.2.8. Einfluss der Batch-Kultivierung auf die Aktivität des Ganzzellsystems

Zum Aufbau des Ganzzellsystems wurde das so genannte Batch-Kultivierungsverfahren verwendet. Aufgrund der Diskontinuität dieser Kultivierungsmethode lässt sich das Wachstum der Mikroorganismen anhand einer typischen Wachstumskurve mit den Stationen der Anlaufphase, der exponentiellen Phase, der stationären Phase sowie der Absterbephase beschreiben. Die Ursache des Erreichens der stationären- und der Absterbephase liegt zum einen an einer beginnenden Nährstoffverarmung des Kulturmediums und zum anderen in der Anhäufung toxisch wirksamer Stoffwechselprodukte [Richter, 2003]. Der limitierende Effekt dieser Methode auf die heterologe Proteinexpression des Ganzzellsystems wurde anhand mehrerer Experimente beobachtet und konnte durch die Verwendung des reichhaltigen TB-Mediums deutlich verbessert werden. In den folgenden Experimenten sollte die Auswirkung der Batch-Kultivierungsmethode auf die Umsetzungsaktivität des Systems unter den optimierten Kultivierungsbedingungen untersucht werden.

Zunächst wurde ermittelt, ob das System bei der Substratzugabe nach einer 48-stündigen Expressionszeit dieselbe Umsetzungsaktivität zeigt, wie nach der 24-stündigen

Expressionszeit. Dieses Experiment erfolgte in Anlehnung an die Ergebnisse der Western-Blot-Experimente zum Nachweis der heterologen CYP105A1-Expression. Dabei wurden nach 24- und 48-stündiger Expressionsanalyse CYP105A1-Signale von nahezu gleicher Intensität beobachtet (vergl. Abbildung 3.16). Zur Durchführung des Experiments wurde das *Bacillus megaterium*-System MK-1 verwendet. Die Endkonzentration des Glimepirids betrug 50 μM . Die Kultivierung wurde in TB-Medium, allerdings ohne Zugabe von Saponin durchgeführt (Abbildung 3.32).

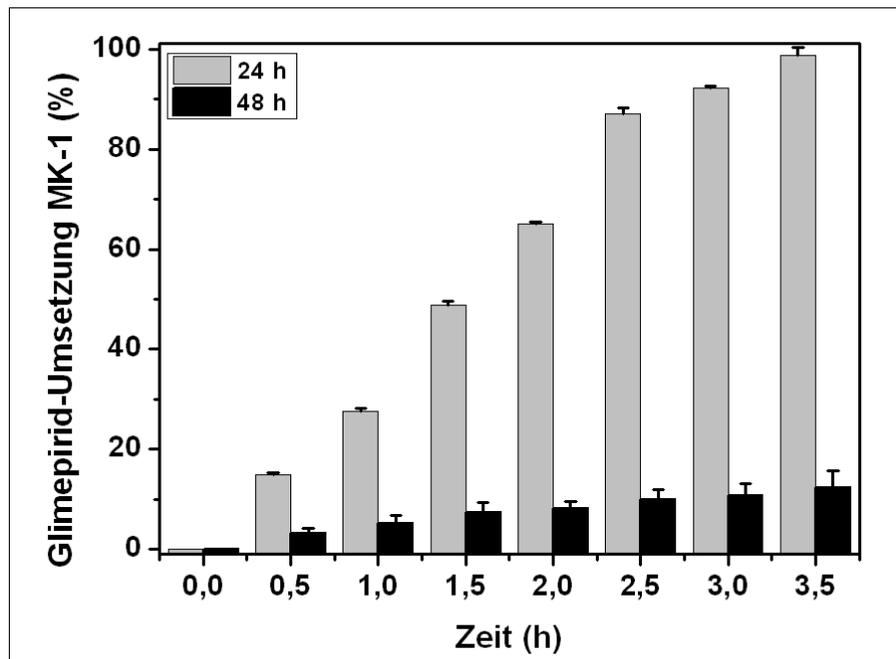


Abbildung 3.32: Substratzugabe (50 μM Glimepirid), 24- und 48 Stunden nach der CYP105A1-Expressionstart mit 5 mg/ml Xylose. Die Kultivierung erfolgte in TB-Medium (ohne Saponin- und δ -Ala-Zusatz). Der Fortschritt der Substratumsetzung wurde via HPLC-Analyse verfolgt. Die Standardabweichung der einzelnen Messpunkte resultiert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Bei der Substratzugabe nach einer Expressionszeit von 48 Stunden wurde ein 8-facher Rückgang der Umsatzkapazität beobachtet. Anstelle von nahezu 100 % (24 mg/l) wurden im Zeitraum von 3,5 Stunden nur etwa 12,5 % (3 mg/l) des Glimepirids metabolisiert.

In einem weiteren Experiment wurde die Aktivität des Systems in Gegenwart einer hohen Substrat-Konzentration (400 μM Glimepirid) untersucht. Dieses Experiment sollte zeigen, ob und in welchem Zeitraum diese Substratkonzentration vollständig metabolisiert werden kann. Abbildung 3.34 zeigt den Vergleich einer Substratumsetzung mit den Glimepirid Endkonzentrationen 50 μM und 400 μM .

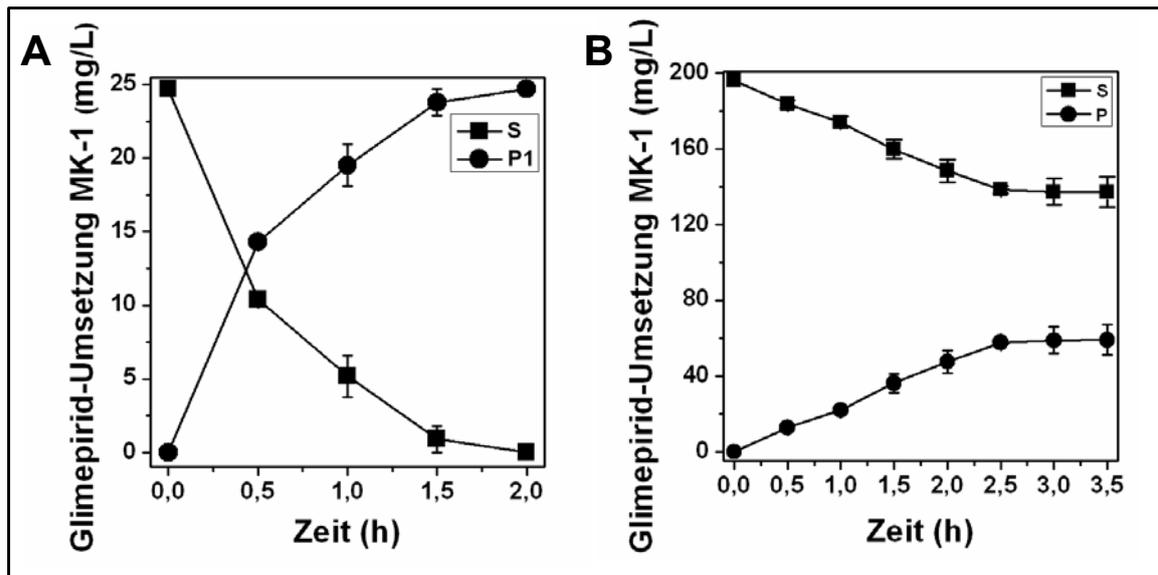


Abbildung 3.33: Umsetzungsexperiment mit den Glimepirid-Konzentrationen A) 50 μM und B) 400 μM in Gegenwart von 0.3% Saponin und 0,5 mM δ -Ala. Die Kultivierung erfolgte in TB-Medium. Die Substratzugabe erfolgte 24 Stunden nach der Induktion der CYP105A1-Expression der Mittelwert und die Standardabweichung der einzelnen Messpunkte resultiert aus drei unabhängigen Experimenten.

Aus der Abbildung geht hervor, dass die Glimepirid-Konzentration von 400 μM nur zu etwa 25 % metabolisiert werden konnte. Die Produktbildung stagnierte nach etwa 2,5 Stunden (Abbildung 3.33 B). Bis zu diesem Zeitpunkt wurden etwa 47,5 mg/l Glimepirid (ca. 100 μM) in das hydroxylierte Produkt umgewandelt.

Die Kulturen wurden 12 Stunden nach der Substratzugabe mikroskopisch untersucht. In der Probe der Kultur in Gegenwart der geringen Glimepirid-Konzentration (50 μM) konnte eine hohe Stäbchendichte beobachtet werden. Abbildung 3.34 A zeigt eine teilungsaktive *Bacillus megaterium*-Zelle. Die Mikroskopie der Kultur, die einer hohen Glimepirid-Konzentration (400 μM) ausgesetzt wurde, zeigte hingegen eine deutlich reduzierte Stäbchendichte. Vorherrschend wurden protoplasten-ähnliche Formationen sowie Debris beobachtet (Abbildung 3.34 B).

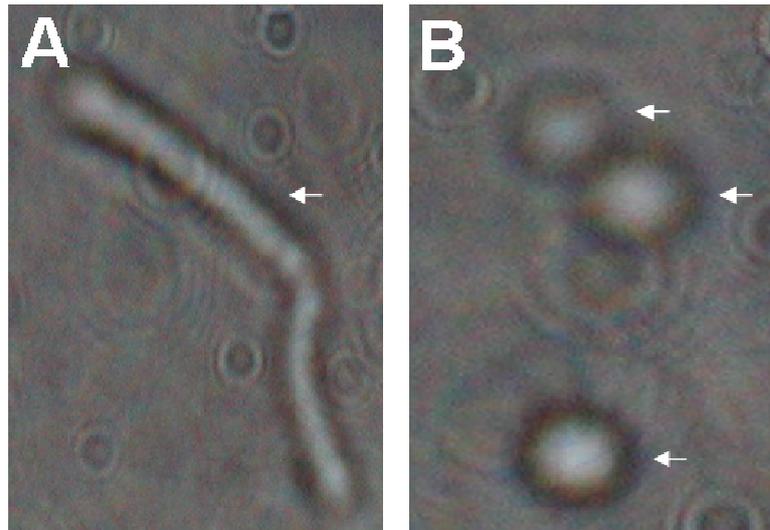


Abbildung 3.34: Mikroskopie einer *Bacillus megaterium*-Kultur MK-1 mit A) 12 Stunden nach Zugabe von 24 mg/l Glimepirid (50 µM) und B) 12 Stunden nach Zugabe von 196 mg/l Glimepirid (400 µM). Die *Bacillus megaterium*-Zellen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet. (Vergrößerung: 1000-fach Ölimmersion; Fotografie: Adrian Gerber)

Die vorliegenden Ergebnisse belegen eindeutig eine Methoden-bedingte Aktivitätslimitierung. Die Umsetzungsaktivität des Ganzzellsystems unterliegt sowohl einer zeitlichen Abhängigkeit, als auch einer Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

3.2.9. Ganzzellbiokonversion von Vitamin D₃.

Nach der erfolgreichen Etablierung des Ganzzellsystems mithilfe der Sulfonylharnstoffe wurde unter Einbeziehung der gewonnenen Erkenntnisse eine Biotransformation mit dem Substrat Vitamin D₃ durchgeführt. Aufgrund der nachgewiesenen Aktivitätsminderung durch die Koexpression der heterologen Redoxpartner Arh1 und Etp1^{fd}(516-618) und der effizienten Elektronenunterstützung durch wirtseigene Redoxproteine wurde für die folgenden Experimente lediglich das CYP105A1 (R73V/R84A) exprimierende MK-3-System als Wirtssystem für die Vitamin D₃-Umsetzung herangezogen. Der Umgang mit Vitamin D als Substrat im Vergleich zu den Sulfonylharnstoffen deutlich anspruchsvoller. So ist beispielsweise die Verwendung von Cyclodextrinen aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit essentiell. Um dies zu verdeutlichen, wurde eine Vitamin D₃ *in vivo*-Umsetzung mit und ohne Verwendung von HP-beta-CD durchgeführt. In dem Kontrollexperiment ohne Cyclodextrinsolubilisierung, wurde Vitamin D₃ gelöst in 500 µl Ethanol zugegeben. Abweichend zu der experimentellen Vorgehensweise bei den Sulfonylharnstoff-Umsetzungen, wurde das Substrat der Kultur bereits zwei Stunden nach der Induktion der CYP105A1 (R84A/R73V)-Expression zugegeben.

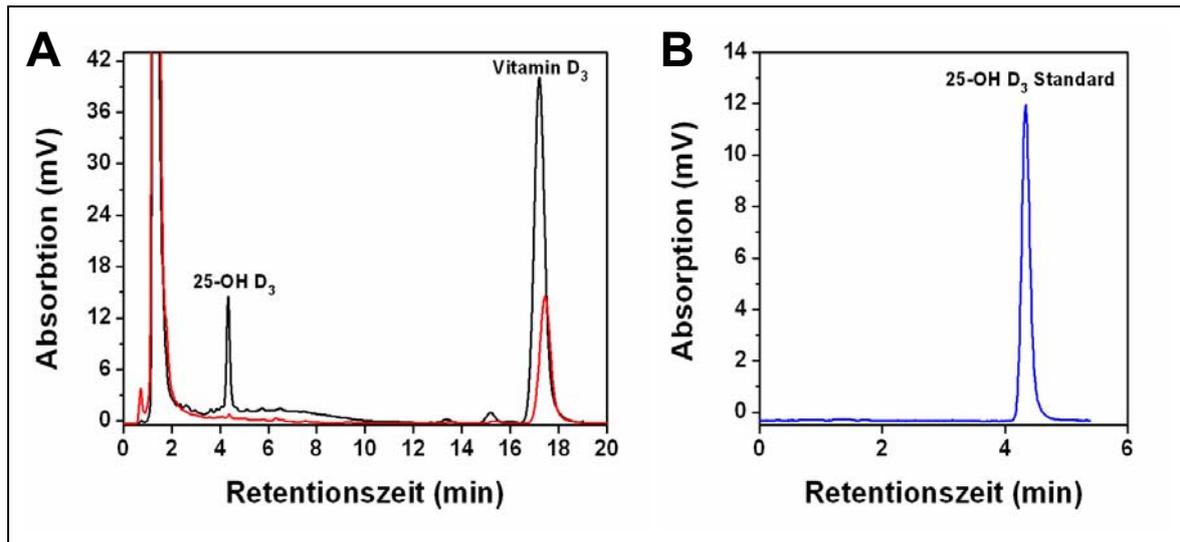


Abbildung 3.35: HPLC-Chromatogramme einer Vitamin D₃-Umsetzung mit *Bacillus megaterium* MK-3 in TB-Medium mit 0,5 mM δ -Ala und 0,3 % Saponin. Das Substrat wurde vor der Zugabe zur Kultur mit HP-beta-CD solubilisiert (schwarze Linie) oder in 500 μ l Ethanol gelöst (rote Linie) und zwei Stunden nach der Induktion der heterologen Proteinexpression zu der Kultur gegeben. Die Endkonzentration des Cyclodextrins im Kulturmedium betrug 2,25% (w/v) und die des Ethanols 2 % (v/v). Die gezeigten HPLC-Chromatogramme entsprechen der Analyse von 0,5 ml Probenvolumen, 24 Stunden nach der Substratzugabe. Die Endkonzentration von Vitamin D₃ in den Kulturen betrug 50 μ M. Die Extraktion erfolgte mit 4-fachem Volumen von Chloroform/Methanol (3:1) [Hayashi et al, 2010]. B) HPLC-Chomatogramm des 25-OH-Vitamin D₃-Standards.

Während unter Verwendung von Ethanol als Lösungsvermittler keine Umsetzung beobachtet werden konnte, zeigte die HPLC-Analyse von 0,5 ml Kulturvolumen nach einer 24-stündigen Kultivierungszeit ein Signal bei einer Retentionszeit von 4 Minuten (Abbildung 3.35 A). Dieses Signal konnte mithilfe eines Produktstandards (Abbildung 3.35 B) dem gewünschten Produkt 25-OH-Vitamin D₃ zugeordnet werden.

In einem weiteren Experiment wurde eine Vitamin D-Umsetzung in Abhängigkeit steigender Substratkonzentrationen (50-, 100- und 150 μ M) untersucht. Die jeweiligen Substratmengen wurden vor der Zugabe zu den jeweiligen Kulturen in HP-beta-CD-Lösungen solubilisiert. Mit dieser experimentellen Vorgehensweise wurde unter anderem sichergestellt, dass jede Kultur trotz unterschiedlicher Substratkonzentrationen dieselbe Cyclodextrinendkonzentration von 2,25 % (w/v) beinhaltete. Die Substratzugabe erfolgte zwei Stunden nach Induktion der Proteinexpression.

Parallel dazu wurde in diesem Experiment auch der Effekt des Saponins untersucht. Dazu wurde die an das System angepasste Endkonzentration von 0,3 % (w/v) verwendet. Die Kulturen des Kontrollexperimentes wurden entsprechend ohne Saponin kultiviert. Die Saponin-Zugabe erfolgte zusammen mit der Substratzugabe zwei Stunden nach Induktion der CYP105A1 (R84A/R73V)-Expression. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.36 dargestellt.

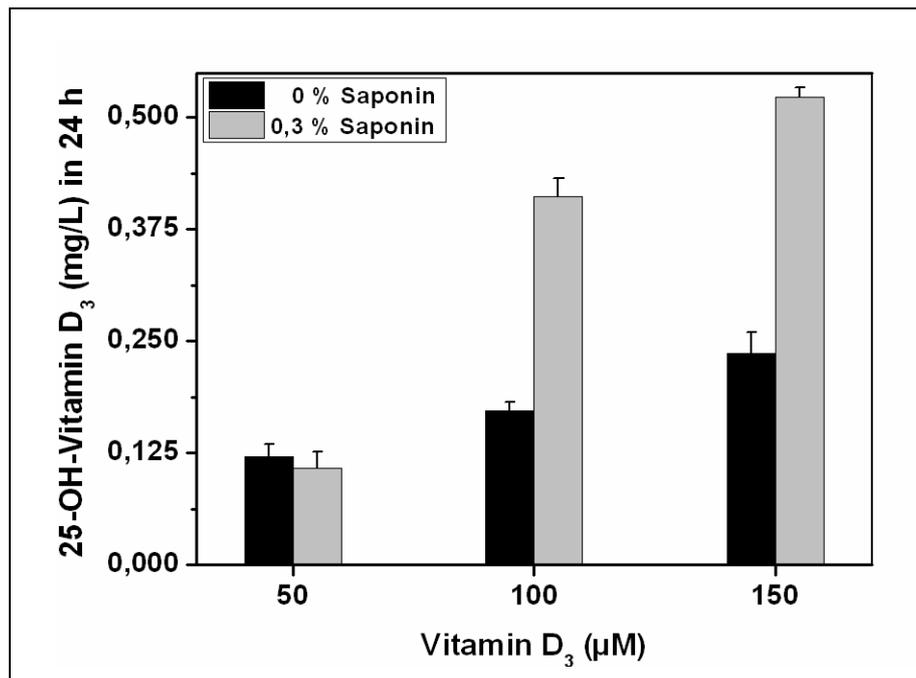


Abbildung 3.36: Vitamin D₃-Metabolismus mit *Bacillus megaterium* MK-3 in Abhängigkeit der Substratkonzentration und Saponin (0,3 %). Die Substrate wurden 2 Stunden nach Induktion, solubilisiert in HP-beta-CD zugegeben. Die Saponin-Zugabe erfolgte 30 Minuten nach Induktion. Die Konzentrationen der Produkte 25-OH-Vitamin D₃ wurden anhand des HPLC-Produktintegrals über eine Eichgerade quantifiziert. Die Analyse der Reaktionen erfolgte 24 h nach Substratzugabe. Die Standardabweichung der einzelnen Messpunkte resultiert aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Aus der Abbildung 3.36 geht hervor, dass das Ausmaß der 25-OH-Vitamin D₃-Bildung abhängig von der eingesetzten Substratkonzentration zu sein scheint. Es zeigte sich mit zunehmender Substratkonzentration eine zunehmende Produktbildung, obwohl das eingesetzte Substrat in keinem Fall annähernd vollständig metabolisiert wurde (siehe Tabelle 3.6).

In Kombination mit Saponin (0,3 %) wurde ab einer Substratkonzentration von 100 µM eine deutliche Steigerung dieses Effekts beobachtet. Bei der Substratkonzentration von 50 µM konnte hingegen kein Saponin-Effekt festgestellt werden.

Tabelle 3.6: 25-OH-Vitamin D₃-Ausbeuten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen, mit und ohne Saponin binnen 24 Stunden. Die Cyclodextrinkonzentration betrug bei allen Ansätzen 2,25 % (w/v).

Substrat Vitamin D ₃		25-OH-Vitamin D ₃ (0 % Saponin)		25-OH-Vitamin D ₃ (0,3 % Saponin)	
(μM)	(mg/l)	(μM)	(mg/l)	(μM)	(mg/l)
50	19,2	0,31	0,12	0,28	0,11
100	38,5	0,46	0,17	1,07	0,41
150	57,7	0,61	0,24	1,36	0,52

Die aktuell höchste Produktbildung wurde im Zusammenhang mit 0,3 % Saponin bei der Substratkonzentration 150 μM mit ca 0,5 mg/l Kultur in 24 Stunden erzielt. Die Besonderheit dieses Ergebnisses ist, dass hier eine Vervierfachung der Produktbildung gänzlich ohne Beeinflussung des Ganzzellsystems auf der Ebene der Proteinexpression oder der Zelldichte erzielt wurde. Die Steigerung ist ausschließlich auf die Darreichungsform des Substrates zurückzuführen.

Die Derivate 1 α -OH-Vitamin D₃ sowie 1 α , 25-(OH)₂-Vitamin D₃ konnten, wie schon bei den *in vitro*-Experimenten mit gereinigtem CYP105A1 (R84A/R73V), auch im Rahmen der Ganzzellbiotransformation nicht nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1. CYP105A1-abhängiger Sulfonylharnstoff-Metabolismus im Kontext der bioinformatischen Docking-Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neben der 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃, ein kommerziell nutzbares Ganzzellsystem zur Herstellung interessanter Derivate von ausgewählten Sulfonylharnstoffen zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 zu etablieren. Im Rahmen einer bioinformatischen Voruntersuchung wurden die Sulfonylharnstoffe Glimepirid, Glibenclamid, Glipizid, Gliclazid, Tolbutamid und Chlorpropamid in die Kristallstruktur des CYP105A1 gedockt. Mithilfe dieses Experiments sollte durch die Berechnung der Bindungsaffinitäten eine Rangfolge der einzelnen Sulfonylharnstoffe zur Isolierung der beiden für eine Umsetzung mit CYP105A1 am besten geeigneten Verbindungen erstellt werden. Diese Rangfolge ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Zur Verifizierung der bioinformatischen Docking-Ergebnisse wurden die Verbindungen in einer CYP105A1-abhängigen *in vitro*-Umsetzung miteinander verglichen (Abbildung 3.10). Es zeigte sich, dass die aus den Berechnungen abgeleitete Rangfolge durch die *in vitro*-Umsetzungen bestätigt werden konnten und Glimepirid, gefolgt von Glibenclamid, die höchste Affinität zum CYP105A1 besitzt. Interessanterweise repräsentieren diese Wirkstoffe die aktuell bedeutsamsten Medikamente dieser Substanzklasse [Rote Liste, 2011].

Interessanterweise zeigte die Verbindung Chlorpropamid, ein Sulfonylharnstoff der 1. Generation im Docking-Experiment die geringste Affinität zu CYP105A1. In dem *in vitro*-Assay konnte in der vorgegebenen Reaktionszeit kein Produkt detektiert werden (Abbildung 3.10 F). Sulfonylharnstoffe werden in der Leber überwiegend über das Cytochrom P450 CYP2C9 metabolisiert [Holstein und Beil, 2009]. Das brachte dem Enzym den zusätzlichen Namen Tolbutamid-Hydroxylase ein [Jones *et al.*, 1996]. Erstaunlicherweise wird Chlorpropamid im menschlichen Organismus ebenfalls kaum in der Leber über CYP2C9 metabolisiert und fast vollständig renal eliminiert [Wellhöner, 1992]. Die Ebenfalls sehr geringe Affinität von CYP105A1 gegenüber Chlorpropamid kann damit als Beispiel für die molekulare Mimikry eines löslichen bakteriellen Cytochrom P450 zu einem membranständigen mikrosomalen Säuger-Cytochrom P450 gedeutet werden.

Die Strukturen der Hauptprodukte von Glimepirid und Glibenclamid wurden via NMR-Analyse aufgeklärt. Im menschlichen Organismus wird Glimepirid im Zuge des hepatischen Phase-I-Metabolismus an der Methylgruppe des Cyclohexylrings in zwei aufeinander folgenden Hydroxylierungen zur Carbonsäure oxidiert [Badian *et al.*, 1996]. Im Docking-Experiment mit CYP105A1 stellte dieser Methylrest ebenfalls die bevorzugte Hydroxylierungsposition dar. Allerdings wurde das Hauptprodukt in der NMR-Strukturaufklärung als *R*-3-Hydroxycyclohexyl-Glimepirid identifiziert. Die tatsächliche

Hydroxylierung befindet sich demnach ein C-Atom neben der vom Modell vorhergesagten Position.

Für Glibenclamid sind in der Literatur zwei Derivate beschrieben, die im Zuge des Phase-I-Metabolismus gebildet werden. Diese wurden als cis-3-Hydroxycyclohexyl-Glibenclamid und trans-4-Hydroxycyclohexyl-Glibenclamid identifiziert [Rydberg *et al.*, 1991]. Im Docking-Experiment wurde sowohl Position 3 als auch Position 4 als bevorzugtes Ziel der Funktionalisierung des Cyclohexylrings dargestellt. Durch den errechneten kürzeren Bindungsabstand zum Häm-Eisen (2.50 Å) wurde Position 4 im Modell als die wahrscheinlichste Hydroxylierungsposition ermittelt. Aber auch in diesem Fall wurde via NMR-Strukturaufklärung eine Hydroxylierung in Position 3 festgestellt. Stereochemisch betrachtet handelt es sich bei dem Glibenclamid-Derivat um cis-3-Hydroxycyclohexyl-Glibenclamid und demnach um einen der beiden beschriebenen Phase-I-Metabolite.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich das verwendete CYP105A1-Modell und das durchgeführte Substrat-Docking gut eignet, um Bindungsaffinitäten verschiedener Verbindungen vorherzusagen und auch um eine wahrscheinliche Orientierung der Verbindungen zum Hämring zufrieden stellend darzustellen. Für eine exakte Beschreibung der tatsächlichen Hydroxylierungspositionen, was anhand der Verbindungen Glimepirid und Glibenclamid gezeigt wurde, war das Modell aber nicht geeignet. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Flexibilität des Enzyms im Sinne einer *induced fit*-Konformationsänderung bei dem verwendeten Modell nicht berücksichtigt werden konnte.

Mithilfe des Substrat-Dockings wurde weiterhin beobachtet, dass die Reste R84 und R73 an der Stabilisierung der Sulfonylharnstoff-Substrate im aktiven Zentrum von CYP105A1 von großer Bedeutung sind (nicht gezeigt). Interessanterweise wurden diese für den Sulfonylharnstoff-Metabolismus essentiellen Arginin-Reste, im Zuge der Optimierung für die Vitamin D-Umsetzung durch 84A und 73V ersetzt, was in einer deutlichen Steigerung des Vitamin D-Metabolismus resultierte [Hayashi *et al.*, 2008; Hayashi *et al.*, 2010]. Daher wurde im Umkehrschluss eine gesteigerte Umsetzung der Sulfonylharnstoffe mit der Mutante (R84A/R73V) nicht erwartet und demzufolge von einer Sulfonylharnstoff-Umsetzung mit der CYP105A1-Mutante abgesehen.

4.1.1. Etablierung eines geeigneten Regenerationssystems unter Einbeziehung wirtschaftlicher Aspekte für *in vitro*-Studien

In dieser Arbeit wurde ein alternatives Redoxsystem zur Unterstützung der CYP105A1-Reaktion etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Redoxproteine Etp1^{fd} (516-618) und Arh1 aus *Schizosaccharomyces pombe* eine CYP105A1-abhängige Substratumsetzung sehr effizient unterstützen können. In der Literatur ist beschrieben,

dass die Reduktase Arh1 neben NADPH auch das deutlich günstigere NADH als Elektronendonator akzeptiert. Daher wurden im Zuge der Etablierung der *in vitro*-Reaktion beide Optionen (NADPH mit dem Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-System und NADH mit dem Alkohol-Dehydrogenase-System) miteinander verglichen. Mit NADH als Elektronendonator konnte zwar eine Umsetzung mit Glimepirid beobachtet werden, die Produktbildung betrug allerdings nur etwa ein zehntel der Produktbildung die unter Verwendung des NADPH-regenerierenden Systems erzielt wurde. Daher war die Verwendung von NADH nicht geeignet.

Ein weiterer Ansatz zur Kostenreduktion des *in vitro*-Systems war es zu untersuchen, ob die günstigere, oxidierte Variante des Elektronendonors -NADP⁺- anstelle von NADPH verwendet werden kann. Überraschend zeigte sich, dass die Umsetzungseffizienz in *in vitro*-Experimenten mit 250 µM Glimepirid unter Verwendung von NADP⁺ im Vergleich zu NADPH sogar geringfügig gesteigert werden konnte (Abbildung 3.8 B). Den Ansatz einer möglichen Erklärung für diese Beobachtung liefert der Umstand, dass für eine produktive Umsetzung mit CYP105A1 ein hoher Elektronendruck erforderlich zu sein scheint. So ist beispielsweise in der Literatur die Verwendung einer NADPH-Konzentration von 1 mM für eine CYP105A1-Reaktion beschrieben, welche einer deutlich geringeren Substratkonzentrationen von 2,5-25 µM Vitamin D gegenübersteht [Sawada *et al.*, 2004]. Des Weiteren wurde durch die Ergänzung des Elektronendonor-Regenerationssystems eine deutlich gesteigerte Substratumsetzung erzielt (Abbildung 3.8 A), da es die Aufrechterhaltung des notwendigen Elektronendrucks gewährleistet. Es stellt sich nun die Frage, welchen Einfluss die jeweiligen Zustandsformen des NADPH auf das Regenerationssystem ausüben. Jede Enzymreaktion, so auch die der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, wird durch ihre kinetischen Parameter bestimmt. Demzufolge beeinflusst die Konzentration des Kosubstrates NADP⁺ die Regenerationsgeschwindigkeit bis zum Erreichen des V_{max} -Wertes des Enzyms. Im Falle von initial eingesetztem NADPH muss das Kosubstrat NADP⁺ erst durch die Reduktion der Redoxpartner und der anschließenden CYP-Reaktion für das Regenerationssystem bereitgestellt werden. Bei der Verwendung von NADP⁺ hingegen ist diese Abhängigkeit nicht gegeben. Die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase kann dadurch weitaus effizienter arbeiten und das Gleichgewicht liegt weit auf der Seite der NADPH-Bildung.

4.2. Ganzzellsystem

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden durch Transformation von *Bacillus megaterium* MS941-Zellen CYP105A1-exprimierende Ganzzellbiokatalysatoren generiert. Anhand optimierter Kultivierungsbedingungen konnte mit den entsprechenden Stämmen eine effiziente Hydroxylierung der Sulfonylharnstoffe Glimepirid und Glibenclamid sowie die

Umsetzung von Vitamin D₃ in den Metaboliten 25-OH-Vitamin D₃ gezeigt werden. Die heterologe Expression von CYP105A1 bzw. der für die Vitamin D-Hydroxylierung verwendeten Doppelmutante CYP105A1 (R73V/R84A) wurde mithilfe einer Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Obwohl auch die Koexpression der heterologen Redoxpartner Etp1^{fd} (516-618) und Arh1 nachgewiesen werden konnte, stellte sich heraus, dass *Bacillus megaterium* MS941 über ein Elektronentransfersystem verfügt, welches die CYP105A1-Reaktion sehr effizient unterstützen kann. *Bacillus megaterium* zeichnete sich darüber hinaus durch seine einfache Kultivierbarkeit, die geringe Generationszeit sowie die stabile und funktionell aktive Expression der heterologen Proteine als sehr gutes Wirtssystem aus.

4.2.1. Wirtseigener Elektronentransfer zur Unterstützung der CYP105A1-Reaktion

Die CYP105A1-abhängige Hydroxylaseaktivität gegenüber den Substraten ohne Koexpression der heterologen Redoxpartner Etp1^{fd} (516-618) und Arh1 wurde nicht erwartet. Dies bedeutet aber, dass der Elektronentransfer zum CYP105A1 durch wirtseigene Redoxproteine unterstützt wird. Daraus ergibt sich der weitere wesentliche Vorteil des Wirtsorganismus, nämlich dass eine Koexpression zusätzlicher Redoxproteine nicht erforderlich ist. Anhand mehrerer Experimente konnte gezeigt werden, dass eine Koexpression durch den gesteigerten Nährstoffbedarf (vergl. Abbildung 3.16) in einer reduzierten Substratumsetzung resultiert (vergl. Abbildungen 3.15 und 3.19).

Es stellt sich die Frage, welches wirtseigene Redoxsystem für den Elektronentransport zum CYP105A1 verantwortlich ist. Aktuell werden in der Arbeitsgruppe alle Cytochrome P450 sowie die Redoxproteine aus dem Genom von *Bacillus megaterium* MS941 kloniert, heterolog exprimiert und charakterisiert. Neben BM-1 und BM-3 sind noch zwei weitere Vertreter der CYP109-Familie im Genom von *Bacillus megaterium* MS941 codiert. Während der Elektronentransport von BM-3 durch eine 66 kDa Domäne innerhalb des Proteins realisiert wird [Narhi *et al.*, 1987] (vergl. Tabelle 1.2), zählen BM-1 sowie die beiden Vertreter der CYP109-Familie zu den klassischen bakteriellen Cytochromen P450, die auf zusätzliche Redoxproteine zur Bereitstellung von Elektronen für die Reaktion angewiesen sind. Es ist davon auszugehen, dass das Elektronentransfersystem eines dieser drei löslichen Cytochrome P450 auch für die Reduktion von CYP105A1 verantwortlich ist.

4.2.2. Batch-Kultivierungsmethode

Die Entwicklung des Ganzzellsystems erfolgte mithilfe der so genannten Batch-Kultivierungsmethode. Bei diesem Verfahren werden Zellen in einem festgelegten

Kulturvolumen mit einem definierten Nährstoffangebot kultiviert. Aufgrund des einfachen experimentellen Aufbaus und der geringen Anforderungen an die Labor-Ausstattung, ist diese Methode zur Entwicklung eines Ganzzellsystems prädestiniert. Sie erlaubt eine umfangreiche Austestung verschiedener Kulturbedingungen, da sie einen hohen experimentellen Durchsatz in geringem Kulturvolumenmaßstab gewährleistet. Daher wurden Experimente zur Etablierung und Optimierung des Ganzzellkatalysators in Form dieses diskontinuierlichen Kultivierungsverfahrens durchgeführt. Mithilfe des Batch-Verfahrens konnten geeignete Bedingungen zu einer effizienten heterologen Proteinexpression bei gleichzeitiger Bereitstellung hoher Zelldichten etabliert werden. Auch spezielle Anforderungen der einzelnen Substrate an die Ganzzellbiokonversion konnten mit dieser Methode erfolgreich untersucht werden.

Ein Nachteil des Verfahrens ist allerdings die Abhängigkeit der Aktivität des Biokatalysators von der Nährstoffsituation.

Beispielsweise haben Western-Blot-Experimente eines in LB-Medium kultivierten MK-2-Systems gezeigt, dass eine Koexpression heterologer Redoxpartner zu Lasten der CYP105A1-Expression stattfindet. Auch im reichhaltigeren und gepufferten TB-Medium verursachte die Koexpression von Arh1 und Etp1^{fd} (516-618) immer noch eine geringfügig reduzierte Umsetzungsaktivität gegenüber Glimepirid.

Ein weiteres Experiment zeigte die zeitlich begrenzte Aktivität des Systems. In diesem Experiment erfolgte die Substratzugabe (50 µM Glimepirid) 24- und 48 Stunden nach Induktion der CYP105A1-Expression. Bei der Substratzugabe, 48 Stunden nach Induktion zeigte sich ein 8-facher Rückgang der Hydroxylierungsaktivität im Vergleich zu dem Kontrollexperiment mit einer Substratzugabe 24 Stunden nach Induktion. Aufgrund der reduzierten intrinsischen Proteaseaktivität von *Bacillus megaterium* [Vary, 1994; Vary *et al.*, 2007] wird eine Degradation des heterolog exprimierten CYP105A1 nicht erwartet. Auch entsprechende Western-Blot-Experimente haben gezeigt, dass diese Beobachtung nicht im Zusammenhang mit einer CYP105A1-Degradation steht, da die Signalintensitäten des CYP105A1, 24- und 48 Stunden nach der Induktion identisch waren (vergl. Abbildung 3.16).

In einem weiteren Experiment wurde das System mit einer hohen Substratkonzentration konfrontiert. Im Rahmen dieses Experiments sollte untersucht werden, ob und in welchem Zeitraum 400 µM Glimepirid vollständig durch den Ganzzellkatalysator metabolisiert werden kann. Es stellte sich heraus, dass diese Substratkonzentration (196 mg/l) nur zu etwa 25 % umgesetzt wurde und die Metabolisierung nach etwa 2,5 Stunden stagnierte. Eine Mikroskopie dieser Kultur (400 µM) zeigte vorherrschend Protoblasten-ähnliche *Bacillus megaterium*-Zellen (Abbildung 3.35 B) sowie Debris. Es wird vermutet, dass es sich bei den zellulären, Protoblasten-ähnlichen Gebilden um Sporen handelt. Die

mikroskopische Analyse der Kontrollkultur, die lediglich eine 50 μM Glimepirid-Konzentration beinhaltet, zeigte eine hohe Dichte an teilungsaktiven Stäbchen.

Ein wichtiges aus diesen Erkenntnissen resultierendes Fazit ist, dass das Ganzzellsystem bei einer entsprechenden Kultivierungsmethode weitaus leistungsfähiger ist und dementsprechend auch zur Metabolisierung größerer Substratmengen in der Lage ist. Es ist nachvollziehbar, dass das System durch die heterologe Proteinexpression sowie die kontinuierliche Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für eine Substrathydroxylierung einen entsprechenden Nährstoffanspruch besitzt. Folglich führt eine Kultivierung ohne Nährstoffsubstitution - je nach Beanspruchung - früher oder später zum Aktivitätsverlust des Systems.

4.2.3. Sulfonylharnstoff-Umsetzung

4.2.3.1. Stabilität der Sulfonylharnstoff-Derivate

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, ein effizientes Ganzzellsystem zur Umsetzung der aktuell am meisten verordneten Arzneimittelwirkstoffe zur Behandlung von Typ 2 zu etablieren. Im Rahmen einer derartigen biotechnologischen Anwendung ist die Stabilität der gewünschten Reaktionsprodukte sehr wichtig. Während im Zuge der Glibenclamid-Umsetzung die Bildung eines stabilen Haupt- und zwei Nebenprodukten in einem konstanten Verhältnis ($P1: P2: P3 = 7.5: 2.5: 0.5$) beobachtet wurde, zeigte die Umsetzung von Glimepirid eine Folgemetabolisierung des entstandenen Produkts *R*-3-OH-Glimepirid. Während der Strukturanalyse konnte eine zunächst nicht nachvollziehbare Verunreinigung der Probe beobachtet werden, die zuerst als Nebenprodukt gedeutet wurde. Durch eine intensivere Betrachtung der Strukturdaten dieses vermeintlichen Nebenprodukts konnte der Verbindung eindeutig ein Phenolrest zugeordnet werden. Aufgrund dieses Befundes wurde eine Spaltung des Moleküls angenommen.

Durch eine entsprechend gewählte längere Kultivierungszeit von *Bacillus megaterium* MK-1 in Gegenwart von 50 μM Glimepirid konnte die ursprünglich als Nebenprodukt vermutete Verbindung via HPLC als Folgeprodukt (P1f) identifiziert werden (vergl. Abbildung 3.31). Anfangs konnte eine eventuell beginnende Folgemetabolisierung nicht beobachtet werden, da das Folgeprodukt P1f bei einer Retentionszeit von 1,8 Minuten von einem Signal aus dem Kulturmedium überlagert wurde (vergl. Abbildung 3.29 A). Aufgrund der geringen Konzentration dieser Verbindung war eine genaue Strukturaufklärung nicht möglich.

Für die Bildung eines Phenolderivates, ausgehend von *R*-3-OH-Glimepirid, existieren im Zuge einer Spaltungsreaktion insgesamt zwei Möglichkeiten. Diese sind in Abbildung 4.1 C dargestellt.

Auch seitens der Ergebnisse aus den Docking-Experimenten wäre eine derartige Folgereaktion durchaus denkbar. Da Glimepirid nämlich eine flexible Molekülstruktur besitzt, konnten aufgrund dieser Flexibilität mehrere theoretische Orientierungen für das Substrat im aktiven Zentrum errechnet werden. Es wird daher vermutet, dass das hydroxylierte Produkt *R*-3-OH-Glimepirid das aktive Zentrum verlässt und dann unter Berücksichtigung der Flexibilität des Moleküls eine alternative Orientierung für die Folgereaktion einnimmt (Abbildung 4.1 B). Ein derartiges Szenario erscheint sehr wahrscheinlich, da auch im Falle der Vitamin D-Umsetzung mit CYP105A1 (R84A/R73V) eine Reorientierung des Substratmoleküls nach dem ersten Hydroxylierungsschritt diskutiert wurde [Sugimoto *et al.*, 2008].

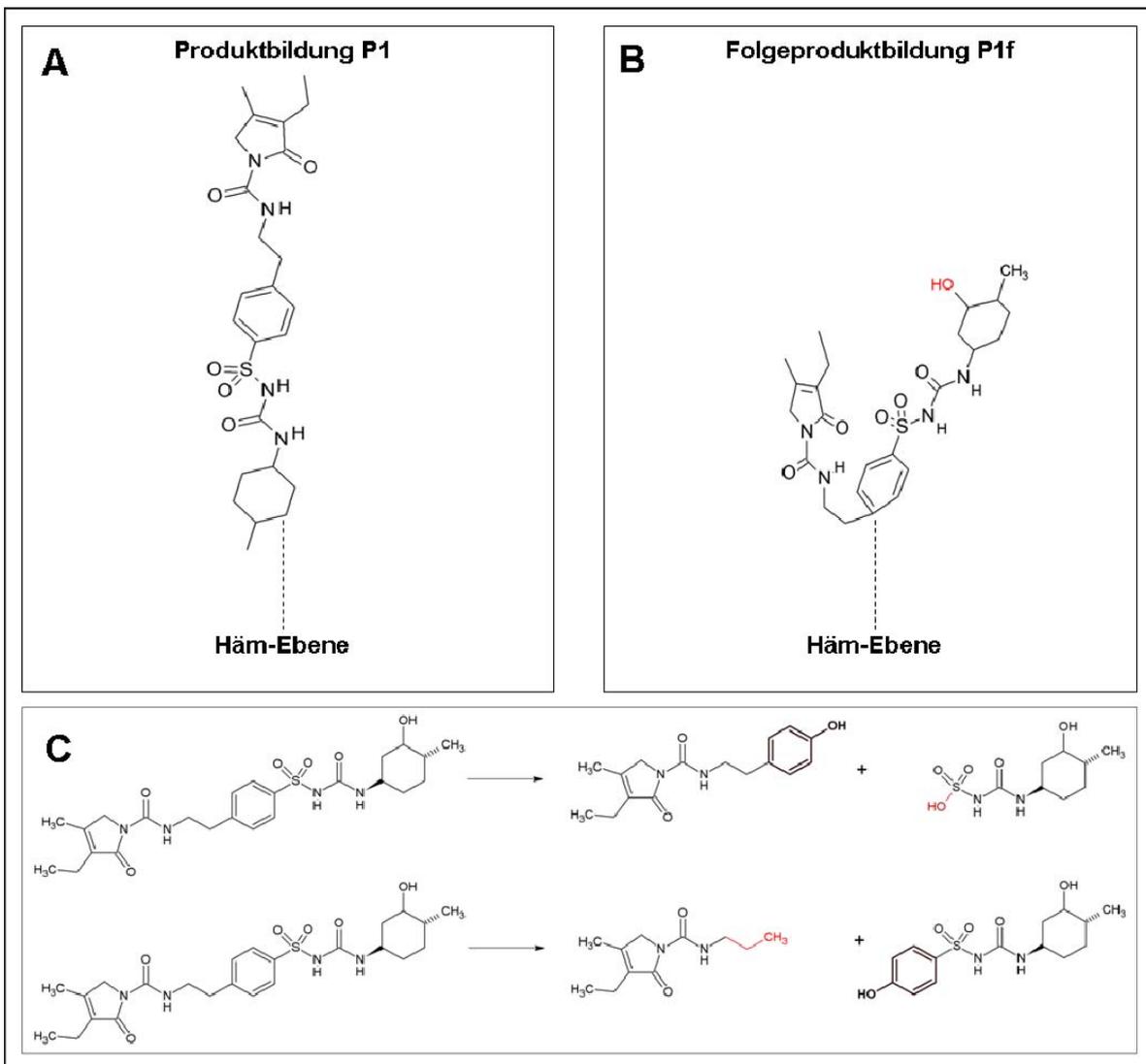


Abbildung 4.1: A) Darstellung der Orientierung von Glimepirid im aktiven Zentrum des CYP105A1 bei der Produktbildung. B) Hypothetische Orientierung von *R*-3-Hydroxycyclohexylglimepirid im aktiven Zentrum des CYP105A1 im Sinne der Folgeproduktbildung P1f C) Potentielle Reaktionen der Folgeproduktbildung P1f von *R*-3-Hydroxycyclohexylglimepirid. Die roten Markierungen am Sulfonylharnstoffrest sowie dem Dihydro-Pyrrolrest beschreiben die strukturelle Unklarheit der jeweiligen abgespaltenen Reste. Eine exakte Beschreibung ist ohne genaue Strukturaufklärung nicht möglich.

Es ist unwahrscheinlich, dass die Folgemetabolisierung des Produktes P1 durch wirtseigene P450-Enzyme verursacht wird. Anhand entsprechender Kultivierungen des Kontrollsystems MK-0 in Gegenwart von Glimepirid und Glibenclamid konnte gezeigt werden, dass Sulfonylharnstoffe nicht zum Substratspektrum für die Enzyme von *Bacillus megaterium* MS941 gehören.

4.2.3.2. Auswirkungen der Substratsolubilisierung und Permeabilisierung auf die Biokonversion von Sulfonylharnstoffen

In der Literatur ist ein gesteigerter hypoglykämischer Effekt bei Ratten mit dem Sulfonylharnstoff Gliquidon unter Verwendung von HP-beta-CD beschrieben [Miro *et al.*, 2004]. Entsprechend wurde dieses Cyclodextrinderivat ebenfalls zu Solubilisierungsexperimenten mit Glimepirid und Glibenclamid verwendet. Tatsächlich konnte mithilfe dieses Cyclodextrins die Löslichkeit von Glimepirid auf $170 \text{ mg/l} \pm 13 \text{ mg/l}$ und die von Glibenclamid auf $670 \text{ mg/l} \pm 29 \text{ mg/l}$ gesteigert werden (Abbildung 3.23). Allerdings führte die Anwendung dieser Verbindungen im Ganzzellsystem zu einem deutlichen Rückgang der Substratumsetzung (Abbildung 3.25). Im Idealfall fungieren Cyclodextrine als Substratreservoir für eine enzymatische Reaktion [Harper *et al.*, 2000]. So werden einem Enzym oder einem Ganzzellsystem aus dem Pool der Wirt-Gast-Komplexe ständig Substratmoleküle bereitgestellt (Abbildung 4.2). Die Austauschrate des Substrates zwischen freier und komplexierter Form ist normalerweise so schnell, dass die Geschwindigkeit einer Enzymreaktion dadurch nicht beeinflusst wird [Harper *et al.*, 2000].

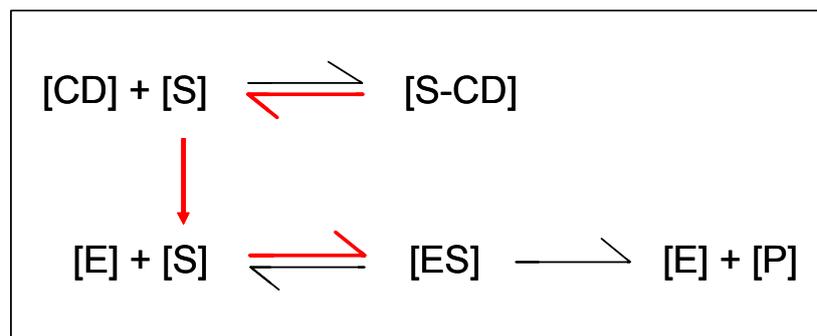


Abbildung 4.2: Cyclodextrine (CD) als Substratreservoir für eine Enzymreaktionen. Die roten Pfeile kennzeichnen den Übergang des Substrates (S) von dem Wirt-Gast-Komplex (S-CD) bis zu dem Enzym- Substrat-Komplex (ES).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird vermutet, dass das HP-beta-CD mit den Sulfonylharnstoffen Glimepirid und Glibenclamid unter den Kulturbedingungen einen sehr stabilen Komplex bildete und dadurch als Molekülfalle fungierte. Diese Schlussfolgerung würde eine Erklärung für die gesteigerte Löslichkeit bei einer gleichzeitig reduzierten Bioverfügbarkeit der Substrate liefern. Ein vergleichbarer Effekt konnte in der Literatur auch in einem Ganzzellumsatz mit dem Steroidhormon Progesteron beobachtet werden. Auch hier führte die Verwendung von Cyclodextrinen trotz gesteigerter Löslichkeit zu einer reduzierten Substratumsetzung [Nguyen, 2010]. Aufgrund der reduzierten Effektivität der Biokonversion konnte HP-beta-CD für die Umsetzung der Sulfonylharnstoffe nicht verwendet werden.

In vielen Fällen kann die Effizienz einer Ganzzellumsetzung durch Unterstützung des unselektiven Substratimports durch die Verwendung von oberflächenaktiven Substanzen gesteigert werden. In dieser Arbeit wurde dazu *Quillaja*-Saponin verwendet. In eukaryotischen Biomembranen interagiert Saponin mit Cholesterin und eine Porenbildung wird über eine Aggregation von Cholesterin-Saponin-Komplexen initiiert [Armah *et al.*, 1999] (vergl. Abbildung 1.15). Die Membranfluidität prokaryotischer Organismen wird allerdings bis auf wenige Ausnahmen nicht durch Cholesterin sondern durch so genannte Hopanoide reguliert [Madigan, 2002]. Hopanoide sind pentacyclische Triterpene, deren Grundgerüst als Hopan bezeichnet wird. Da die Hopanoide, bezogen auf die Regulation der Membranfluidität dem Cholesterin funktionell sehr ähnlich sind, wird ein vergleichbarer Mechanismus der Porenbildung vermutet. Durch den Zusatz von Saponin bis zu einer Endkonzentration von 0,3 % konnte eine deutlich gesteigerte Produktbildung in den Sulfonylharnstoff-Umsetzungen beobachtet werden, was auf eine erfolgreiche Permeabilitätssteigerung der Wirtsmembran zurückgeführt wird. Dieser Effekt war ab einer Konzentration von 0,4 % wieder rückläufig, wahrscheinlich bedingt durch eine beginnende Zytotoxizität des Saponins gegenüber den *Bacillus megaterium*-Zellen. Es ist bekannt, dass Saponine ab einer bestimmten Konzentration Zellsystemen gegenüber einen lysierenden Effekt entfalten. Diese Eigenschaft des Saponins wurde unter anderem an Erythrozytenmembranen eingehend untersucht [Yeager, 1928, Takechi *et al.*, 1992].

4.2.4. Vitamin D₃-Umsetzung

4.2.4.1. Auswirkungen der Substratsolubilisierung und Permeabilisierung auf die Biokonversion von Vitamin D₃

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Hydroxylierung der Sulfonylharnstoffe im Rahmen eines BMBF-Projekts auch eine Ganzzellumsetzung zur Hydroxylierung von Vitamin D₃ in das Produkt 25-OH-Vitamin D₃ etabliert. Dazu wurde durch die Transformation mit dem Gen der verbesserten CYP105A1-Mutante CYP105A1 (R84A/R73V) [Hayashi *et al.*, 2008] ein eigens an die Vitamin D-Hydroxylierung angepasstes *Bacillus megaterium*-Ganzzellsystem generiert. Mithilfe dieses Systems konnte eine Hydroxylierung in das gewünschte Produkt nachgewiesen werden. Demzufolge konnten auch bei dieser Anwendung alle erforderlichen Kriterien für ein funktionsfähiges System, wie z.B. die funktionsfähige heterologe Expression der CYP105A1-Doppelmutante oder der Vitamin D-Import in das Zytosol des Ganzzellsystems, erfüllt werden. Die aktuelle Kapazität des Systems beträgt unter

Verwendung aller optimierten Parameter eine 25-OH-Vitamin D₃-Bildung von etwa 0,5 mg/l in 24 Stunden.

Diese Produktmenge konnte allerdings erst durch eine Kombination aus einer Steigerung der Substratkonzentration und Saponin erzielt werden (vergl. Abbildung 3.32). Bei einer Substratkonzentration von 50 µM konnte kein Unterschied zu dem Kontrollexperiment ohne Saponin beobachtet werden. Dass eine Saponin-Konzentration von 0,3 % Saponin für eine gute Permeabilisierung der Zellen ausreichend ist, konnte anhand der Studien mit den Sulfonylharnstoffen eindeutig gezeigt werden. Die gesteigerte Produktbildung bei höheren Substratkonzentrationen wird daher nicht alleine auf den permeabilisierenden Effekt des Saponins zurückgeführt. Aufgrund der strukturellen Beschaffenheit des oberflächenaktiven Glykosids besitzt Saponin auch emulgierende Eigenschaften. Demzufolge wird ein synergistisches Zusammenspiel aus Membran-Permeabilisierung und der Emulgierung des Substrates vermutet. Es kann festgestellt werden, dass die Verwendung von Saponin auch im Zuge der Biotransformation von Vitamin D eine sinnvolle Optimierung darstellt.

Eine weitere Besonderheit im Umgang mit Vitamin D ist die Tatsache, dass die Verwendung von Cyclodextrinen im Gegensatz zu den Sulfonylharnstoff-Umsetzungen essentiell ist. Eine Metabolisierung von Vitamin D₃ konnte ohne die Verwendung dieser Lösungsvermittler nicht beobachtet werden.

Allerdings gestaltet sich der Umgang mit Vitamin D trotz Verwendung von Cyclodextrinen weiterhin sehr schwierig. Diese Schwierigkeit beruht unter anderem auf einer unzulänglichen Wiederfindung der eingesetzten Vitamin D-Menge, die auch durch die Verwendung von Cyclodextrinen nur bedingt verbessert werden kann. Dies wird in dem folgenden Experiment verdeutlicht. Dazu wurde Vitamin D₃ (50 µM) zu entsprechenden *Bacillus megaterium*-Kulturen gegeben und der Vitamin D-Gehalt unmittelbar nach der Substratzugabe sowie nach einer 24-stündigen Kultivierungszeit quantifiziert. Zur Hervorhebung des Cyclodextrineffekts, wurde in einem Parallelexperiment das Substrat gelöst in 1 ml Ethanol zur Kultur gegeben. Für dieses Experiment wurde das *Bacillus megaterium*-System MK-0 ohne Vitamin D-Hydroxylaseaktivität verwendet. Aufgrund der nach 24 Stunden vorliegenden hohen Zelldichte wurden Überstand und Zellpelletfraktion getrennt voneinander untersucht. Die Chromatogramme der jeweiligen HPLC-Analysen sind in Abbildung 4.3 gezeigt.

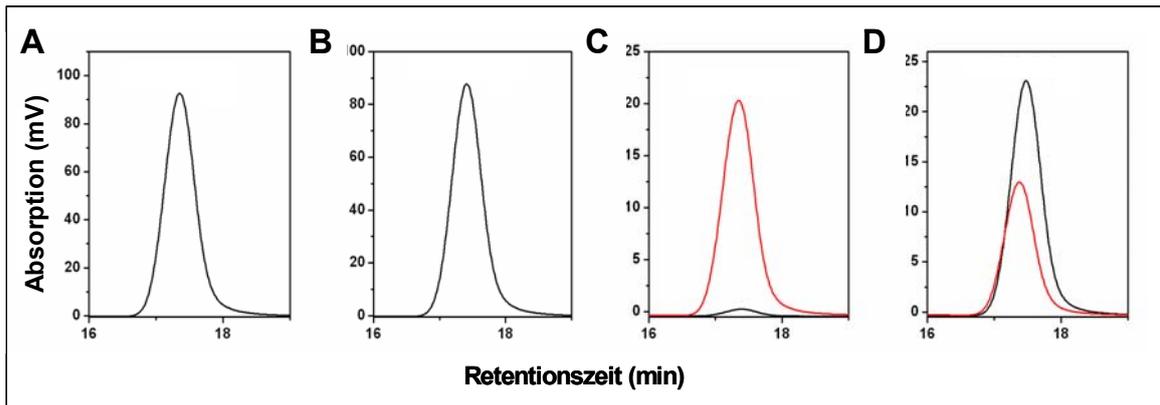


Abbildung 4.3: HPLC-Analyse von Vitamin D₃ unmittelbar nach Inokulation des Substrates zur Kultur in (A) 1 ml Ethanol gelöst und (B) solubilisiert in HP-beta-CD. (C) Analyse der Vitamin D₃-Restmenge nach 24 h Kultivierungszeit mit dem Kontrollsystem *Bacillus megaterium* MK-0 in 1 ml Ethanol (2% v/v) gelöst und (D) solubilisiert in HP-beta-CD (2,25 % w/v). Die Kultivierung wurde mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 180 rpm bei 30°C im Schikane Kolben durchgeführt. Um den Verbleib des Vitamin D exakter lokalisieren zu können, wurden Überstand (schwarze Linie) und Pellet (rote Linie) getrennt untersucht. Die Endkonzentration der eingesetzten Vitamin D₃-Menge betrug 50 µM. Die Extraktion des Substrats aus dem Kultumedium wurde gemäß Literatur durchgeführt [Hayashi *et al.*, 2010].

Unmittelbar nach der Substratzugabe konnte in allen Kulturen noch eine vergleichbare Vitamin D-Menge detektiert werden (Abbildung 4.6 A, B). Nach 24 Stunden Kultivierungszeit, konnte in dem Überstand der Kultur mit Ethanol als Lösungsvermittler nahezu kein Vitamin D₃ mehr nachgewiesen werden. Eine Restmenge von 20 % der ursprünglich eingesetzten Menge wurde in der Pelletfraktion wieder gefunden. Mit der Verwendung von HP-beta-CD konnte etwa 20 % der ursprünglich eingesetzten Menge im Überstand und weitere 10 % in der Pelletfraktion nachgewiesen werden. Demzufolge konnte mithilfe der Cyclodextrine die Substratwiederfindung um 10 % gesteigert werden. In einer Zellkultur sind theoretisch mehrere Möglichkeiten über den Verbleib des hydrophoben Vitamin D denkbar. Die wichtigsten Möglichkeiten für den Vitamin D-Verbleib in einer *Bacillus megaterium*-Kultur sind in Abbildung 4.4 schematisch dargestellt.

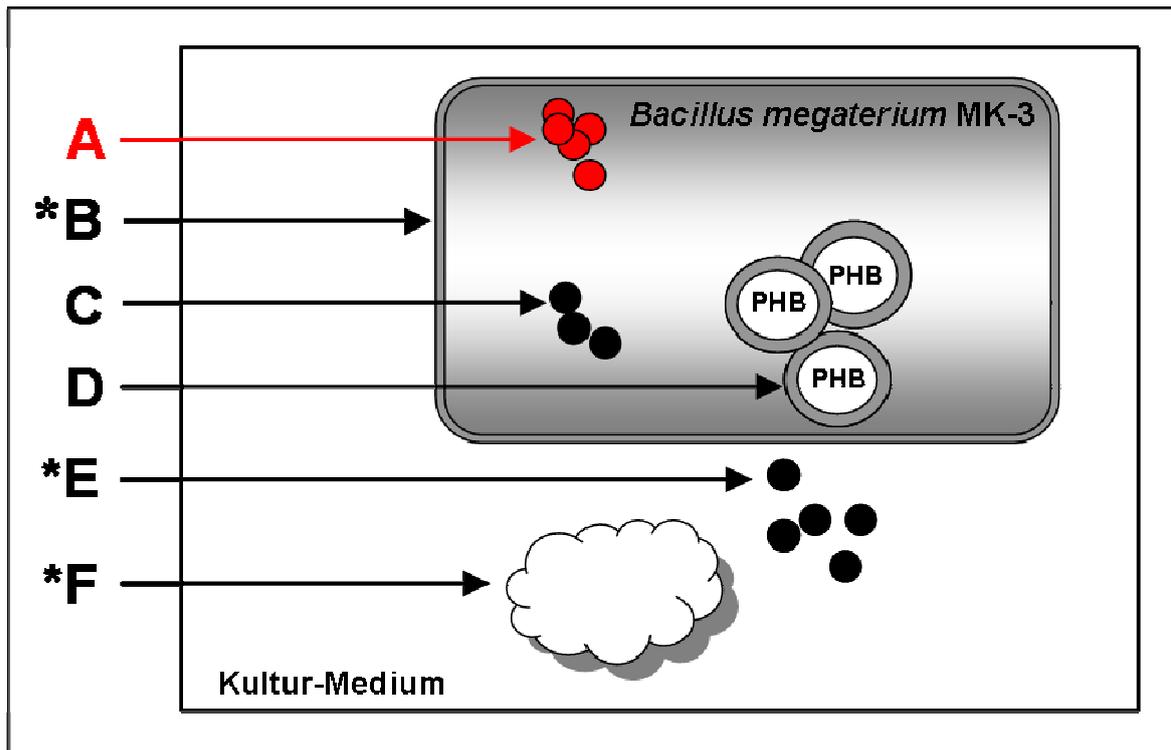


Abbildung 4.4: Assoziations- und Verbleibemöglichkeiten von Vitamin D in einer *Bacillus megaterium* MK-3-Kultur: A) Metabolismus durch das zytosolisch lokalisierte CYP105A1 (R84A/R73V) B) Assoziation an die Membran des Wirtes C) Assoziation an wirtseigene Proteine, D) Assoziation an PHB-Körperchen, E) Assoziation an Peptide des Kulturmediums, F) Degradation und Agglomeration in der wässrigen Phase des Kulturmilieus. (Das * Symbol kennzeichnet die Verbesserung der Problematik mithilfe der Cyclodextrine.)

Im Idealfall gelangt Vitamin D in das Zytosol des Wirtsorganismus und wird dort durch das heterolog exprimierte CYP105A1 (R84A/R73V) in das hydroxylierte Produkt umgesetzt (Abbildung 4.4 A). Um aber in das Zytosol zu gelangen, ist zunächst ein Membrandurchtritt des Moleküls erforderlich. Biomembranen bieten aufgrund ihrer Beschaffenheit eine hydrophobe Akzeptorphase für Vitamin D, was einen Durchtritt ins Zytosol erschweren kann (Abbildung 4.4 B). Bei erfolgtem Membrandurchtritt bietet das Zytosol wiederum einige Assoziationsmöglichkeiten für Vitamin D. Intrazelluläre Wirtspoteine stellen beispielsweise eine solche Assoziationsmöglichkeit dar (Abbildung 4.4 C). Eine solche Proteinassoziation ist sehr wahrscheinlich, denn auf diese Weise wird auch der Transport des Secosteroids im Blutgefäßsystem realisiert. Dort wird Vitamin D an ein lösliches Plasmaprotein, das so genannte Vitamin D-Bindeprotein (DBP) gebunden [Cooke und Haddad, 1989]. Eine weitere Assoziationsmöglichkeit für Vitamin D bieten die so genannten PHB-Körperchen (Abbildung 4.4 D). *Bacillus megaterium* ist für die Produktion von Polyhydroxybuttersäure bekannt, die der Mikroorganismus in Abwesenheit eines oder mehrerer Nährstoffe als Kohlenstoffquelle nutzen kann [Vazquez *et al.*, 2003]. Dieses Nährstoffspeicherungspolymer ist intrazellulär in Form der PHB-Körperchen organisiert, die von einer Biomembran umgeben sind. Diese Membran kann ebenfalls als intrinsischer

Akzeptor für das Substrat dienen. Bei einem Membrandurchtritt des Vitamin D in die PHB-Körperchen würde das Substrat einer Umsetzung im Zytosol nicht zur Verfügung stehen. Aber nicht nur die Zellen selbst sondern auch das wässrige Kulturmedium dürfte für die Schwierigkeiten im Umgang mit Vitamin D verantwortlich sein. Neben einer möglichen Assoziation an Oligopeptide oder Polypeptide des Kulturmediums (Abbildung 4.4 E), muß auch die Labilität des Vitamin D gegenüber diversen Umgebungseinflüssen als potentielle Ursache in betracht gezogen werden (Abbildung 4.4 F). Zu diesen Einflüssen zählen unter anderem UV-Strahlung, molekularer Sauerstoff, Temperatur sowie Lösemittelkonzentration [Chen und Marsh 1965]. Unglücklicherweise stehen essentielle Kulturbedingungen von *Bacillus megaterium* demzufolge nicht im Einklang mit einer Vitamin D-Umsetzung. So wird beispielsweise die Kultivierung des Ganzzellkatalysators bei 180 rpm im Schikanekolben durchgeführt, um ein moderates Sauerstoffangebot für den Wirtsorganismus zu gewährleisten. Des Weiteren beträgt die Temperatur, die zur Kultivierung von *Bacillus megaterium* eingesetzt wird 30°C. Die Verwendung einer hohen Lösemittelkonzentration ist aufgrund der Toxizität gegenüber dem Ganzzellsystem [Weber und de Bont, 1996] ebenfalls nicht möglich. Eine zusätzliche Aufgabe der Cyclodextrine bei der Vitamin D-Umsetzung ist demnach neben der Steigerung der Bioverfügbarkeit auch die Stabilisierung des Substrates unter den gegebenen Kulturbedingungen. Der Umgang mit Vitamin D in einer wässrigen Phase erforderte folglich einige Abwandlungen in der experimentellen Vorgehensweise im Vergleich zu den Sulfonylharnstoffen. So wurde Vitamin D₃ der Kultur als Wirt-Gast-Komplex zugegeben und bereits vor der Zugabe durch HP-beta-CD bei 4°C in einem UV-undurchlässigen Gefäß solubilisiert. Des Weiteren musste die Quantifizierung der Produktbildung aufgrund der Schwierigkeit der Vitamin D-Wiederfindung über eine Eichgerade (siehe Abbildung 7.3) durchgeführt werden, welche mithilfe eines Produktstandards erstellt wurde. Diese Eichgerade erlaubte die Quantifizierung des gebildeten 25-OH-Vitamin D₃ über das HPLC-Produktintegral.

4.2.4.2. 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃

Im Einklang mit der Aufgabenstellung, konnte die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ mithilfe eines Ganzzellsystems gezeigt werden. Allerdings wurde eine Bildung der Derivate 1 α -OH-Vitamin D₃ sowie 1 α , 25-(OH)₂-Vitamin D₃ nicht beobachtet. Neben der geringen Bioverfügbarkeit des Substrates liefern vor allem die kinetischen Parameter des Vitamin D-Stoffwechsels von CYP105A1 Wildtyp bzw. CYP105A1 (R84A/R73V) eine hinreichende Erklärung. Diese kinetischen Parameter sind in Tabelle 1.3 zusammengefasst. Der Tabelle ist zu entnehmen, dass die Hydroxylierung des Vitamin D

an der 25-Position sehr begünstigt ist, während die 1α -Hydroxylierung vergleichsweise kaum eine Rolle spielt. Durch die eingesetzten hohen Substratkonzentrationen und der relativ geringen 25-OH-Vitamin D_3 -Bildung befand sich das Substrat Vitamin D_3 in den Kulturen immer im Überschuss, sodass zu jedem Zeitpunkt die bevorzugte 25-Hydroxylierung katalysiert wurde. Abbildung 4.5 liefert eine Übersicht über die CYP105A1 (R84A/R73V)-abhängige 1α - bzw. 25-Hydroxylaseaktivität gegenüber Vitamin D_3 .

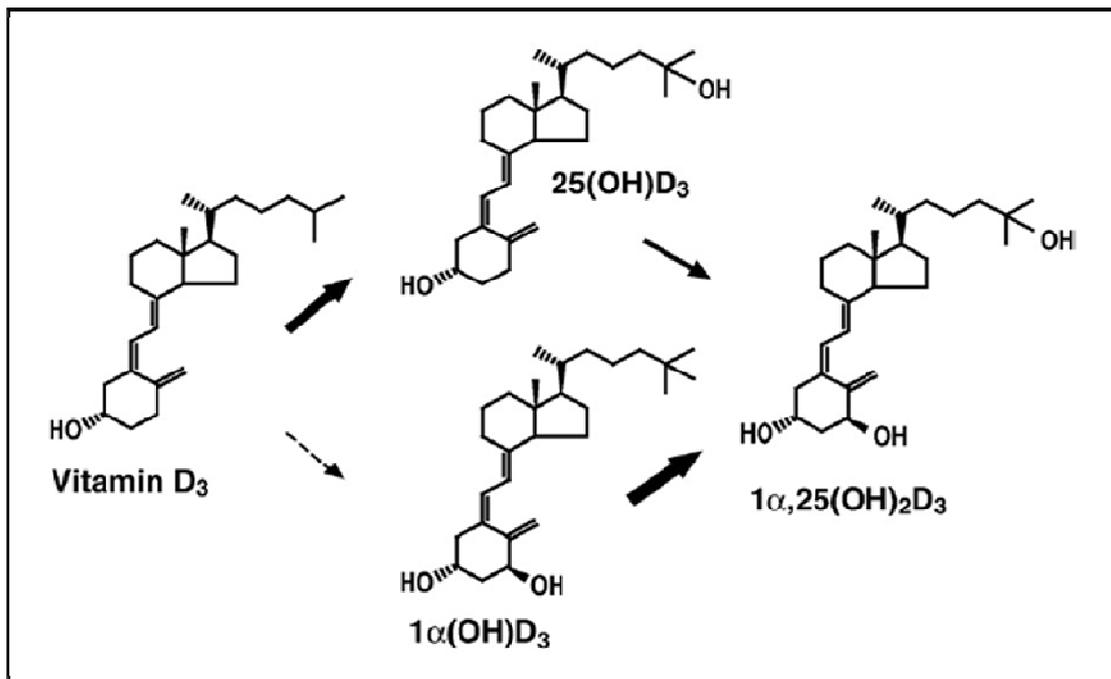


Abbildung 4.5: Vitamin D_3 -Stoffwechsel der CYP105A1-Mutante CYP105A1 (R84A/R73V). Die Dicke der Reaktionspfeile kennzeichnet die Stärke der Hydroxylaseaktivität gegenüber den jeweiligen Vitamin D_3 -Derivaten [Sakaki *et al.*, 2011].

5. Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse liefern die Grundlagen für einen kommerziellen Ganzzellumsatz für die untersuchten Substrate Glimepirid und Glibenclamid. Mithilfe des *Bacillus megaterium*-Systems konnte eine effiziente Hydroxylierung der Wirkstoffe gängiger Medikamente auf Sulfonylharnstoff-Basis an den chemisch inerten Cyclohexylringen gezeigt werden. Es ist am Beispiel von Glimepirid beschrieben, dass der Cyclohexylrest nicht an der Interaktion mit dem Zielrezeptor SUR1 beteiligt ist [Müller *et al.*, 2010]. Allerdings stellen die Cyclohexylreste die Zielposition des Phase-I-Metabolismus durch das hepatische CYP2C9 dar [Badian *et al.*, 1996; Rydberg *et al.*, 1991]. Die regio- und stereoselektive Funktionalisierung an den Cyclohexylringen der Verbindungen durch CYP105A1 liefern demzufolge die Grundlage zum Design einer neuen Medikamentengeneration dieser Substanzklasse. Diese Option basiert auf der Tatsache, dass gerade peroral verabreichte Medikamente über den Pfortaderkreislauf der Leber zugeführt und dort zu großen Anteilen metabolisiert werden (*first pass effect*), bevor sie den eigentlichen Wirkort erreichen können [Wellhöner, 1992]. Zur Kompensation dieses Effekts ist daher die Verabreichung einer initial höheren Dosis erforderlich, um eine therapeutische Wirkung des Arzneimittels zu erzielen. Diese Tatsache verdeutlicht, dass die Wirkungsweise eines Medikaments nicht allein von der Rezeptorinteraktion, sondern auch von der systemischen Bioverfügbarkeit abhängig ist. Im Rahmen einer pharmakokinetischen Studie mit gesunden kaukasischen Probanden konnten *loss of function* Allele im CYP2C9 Gen identifiziert und charakterisiert werden. Da überwiegend CYP2C9 für den Phase-I-Metabolismus von Sulfonylharnstoffen verantwortlich ist, zeigte der Phänotyp der betroffenen Individuen einen gesteigerten hypoglykämischen Effekt durch eine reduzierte Elimination dieser Verbindungen [Zhou *et al.*, 2010]. Die Sulfonylharnstoffe waren im Organismus der Probanden damit weitaus länger systemisch verfügbar. Der in dieser Studie beobachtete Effekt könnte mithilfe der durch die CYP105A1-Reaktion eingeführten OH-Gruppen imitiert werden. Unterstützt durch bioinformatische *drug design*-Techniken könnte ein geeigneter Rest im Zuge einer chemischen Synthese an die OH-Gruppen angefügt werden. Die Besonderheit dieser neuen Sulfonylharnstoff-Generation läge demnach in der Herabsetzung der Affinität zu CYP2C9 bei gleichzeitigem Erhalt der effizienten SUR1-Interaktion. Die daraus resultierende Konsequenz wäre, dass mit einer geringeren Medikamentendosis ein vergleichbarer therapeutischer Effekt erzielt werden könnte. Die Einnahme einer geringeren Dosis bewirkt wiederum die Reduktion von Nebenwirkungen was zu einer Erhöhung der Verträglichkeit des Medikaments führt.

Des Weiteren könnte das hier biotechnologisch erhaltene Hauptprodukt des Glibenclamid Umsatzes - cis-3-Hydroxycyclohexyl-Glibenclamid - welches dem Phase-I-Metabolit

entspricht [Rydberg *et al.*, 1991], als klinischer MS-Standard in Diagnostik oder forensischen Fragestellungen Anwendung finden.

Mit dem entsprechenden rekombinanten *Bacillus megaterium* MS941-System konnte neben der 3-Hydroxylierung der aktuell bedeutsamsten Sulfonylharnstoffe auch die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ gezeigt werden. Trotz der Schwierigkeiten im Umgang mit Vitamin D konnte durch die Etablierung geeigneter Bedingungen etwa 0,5 mg 25-OH-Vitamin D₃ in einem Liter *Bacillus megaterium* MK-3-Kultur in 24 Stunden produziert werden. Durch eine kontrollierte Kultivierung in einem Bioreaktor sollte es möglich sein, die Vitamin D-Umsetzung auf ein kommerziell relevantes Niveau zu steigern. Derzeit wird bereits an einem geeigneten Fermentationsverfahren mit dem MK-3-System gearbeitet. Obwohl für die Umsetzungen von Vitamin D in physiologisch aktive Metabolite bereits einige Systeme existieren [Imoto *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 2010; Hiroyuki *et al.*, 1994; Sasaki, 1991], bietet *Bacillus megaterium* gerade aufgrund der schnellen Generationszeit sowie der stabilen Expression heterologer Proteine eine sehr gute Alternative. Seitens der Proteinexpression kann die Effizienz des Systems noch weiter gesteigert werden. Denn neben den verfügbaren Plasmiden mit Xylose induzierbaren Promotoren existiert mittlerweile auch ein hoch effizientes virales T7-Expressionssystem [Gamer *et al.*, 2009]. Allerdings könnte in Anbetracht der komplizierten Handhabung von Vitamin D₃ als Substrat auch eine alternative biotechnologische Bereitstellung von 25-OH-Vitamin D₃, etwa durch die Hydroxylierung des Vorläufers 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) in Betracht gezogen werden. Die Ergebnisse haben eindeutig gezeigt, dass die geringe Vitamin D-Umsetzung vor allem auf die schlechte Bioverfügbarkeit des Substrates zurückgeführt werden kann. Die auch als Provitamin D bezeichnete Verbindung 7-DHC unterscheidet sich von Vitamin D durch den geschlossenen B-Ring des Steran Grundgerüsts, wodurch diese Verbindung im Vergleich zu Vitamin D eine leichtere Handhabung gewährleistet. Die Ringspaltung zu Vitamin D wird physiologisch in der Haut via UV-Strahlung initiiert. Nach der enzymatischen 25-Hydroxylierung des 7-DHC könnte die Umwandlung in die Zielsubstanz 25-OH-Vitamin D₃ ebenfalls mittels UV-Strahlung durchgeführt werden. Die Grundlagen für dieses abgewandelte Verfahren sind bereits durch das im Rahmen dieser Arbeit etablierte *Bacillus megaterium*-System vorhanden. Die Substratspezifität des CYP105A1 könnte via ortsgerichteter Mutagenese an 7-DHC angepasst werden. Informationen über die auszutauschenden Aminosäuren könnten dazu wiederum mithilfe von Docking-Experimenten, basierend auf der Kristallstruktur des Cytochrom P450 erhalten werden. Allerdings wäre dazu eine Optimierung des in dieser Arbeit verwendeten Docking-Tools notwendig, da das im Rahmen der Identifizierung geeigneter Sulfonylharnstoffe verwendete Modell zur Bearbeitung dieser Fragestellung nicht flexibel genug wäre. Dennoch sollte diese Vorgehensweise bedacht werden, da die

Hydrophobizität in Kombination mit der sperrigen Molekülstruktur von Vitamin D offensichtlich eine deutliche Umsatzlimitierung bewirkt.

Neben der Hydroxylierung von Vitamin D in die aktive Form $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-Vitamin D}$, liefert die Umsetzung von Glibenclamid in den Phase-I-Metaboliten durch CYP105A1 ein weiteres Beispiel für eine physiologisch bedeutsame Anwendung dieses bakteriellen Cytochroms P450. Demzufolge könnte ein Screening mit anderen Arzneimittelwirkstoffen durch das im Rahmen dieser Arbeit etablierte rekombinante *Bacillus megaterium*-System aufgrund der geringen Substratspezifität von CYP105A1 viel versprechende Funktionalisierungen diverser anderer interessanter Verbindungen ermöglichen. Da CYP105A1 mit den Sulfonylharnstoffen Glimepirid und Glibenclamid ähnliche Hydroxylierungen durchführt wie CYP2C9 im Zuge des Phase-I-Metabolismus, wäre der Fokus zunächst auf Verbindungen wie Warfarin, Torasemid, Losartan, Sildenafil sowie viele Verbindungen aus der Stoffklasse der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) zu richten. Diese Wirkstoffe gehören ebenfalls zum Substratspektrum von CYP2C9 [Holstein und Beil, 2009].

6. Literaturverzeichnis

- Adam, G., Läuger, P., Stark, G., 2003 Physikalische Chemie und Biophysik. 4. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Springer Verlag
- Ansel, H. C., Norred W.P., Roth, I.L., 1969. Antimicrobial activity of dimethyl sulfoxide against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus megaterium*." J. Pharm. Sci. 58(7): 836-839.
- Armah, C.N., Mackie, A.R., Roy, C., Price, K., Osbourn, A.E., Bowyer, P., Ladha, S., 1999. The membrane-permeabilizing effect of avenacin A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol. Biophys. J. 76(1 Pt 1): 281-290.
- Balakrishna, R., Wood, S.J., Nguyen, T.B., Miller, K.A., Suresh Kumar, E.V.K., Datta A., David ,S.A., 2006. Structural correlates of Antibacterial and Membrane-Permeabilizing Activities in Acylpolyamines. Antimicrobial. Agents. Chemotherapy. 50(3): 852-861
- Badian, M., Korn, A., Lehr, K.H., Malerczyk, V., Waldhäusl, W., 1996. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the hydroxymetabolite of glimepiride (Amaryl) after intravenous administration. Drug. Metabol. Drug. Interact. 13(1): 69-85.
- Barg, H., Malten, M., Jahn, M., Jahn, D. (2005). Protein and vitamin production in *Bacillus megaterium*, in: Barredo, J.L. (Ed), Methods in Biotechnology - Microbial products and biotransformations., New Jersey, pp. 205-224.
- Protein and vitamin production *Bacillus megaterium*. Microbiol Processes and Products, 1st ed 18 Humana Press, Totowa, NJ. (2): 165-184.
- Barry, S.M., Kers, J.A., Johnson, G.E., Summers, M., Heyes, D.J., Patel, B., Krassnoff, S.B., Gibson, D.M., Crane, B.R., Scrutton, N.S., Loria, R., Challis, G.L., 2011. Cytochrome P450-catalysed regiospecific Nitration of L-tryptophan in thaxtomin phytotoxin biosynthesis. Conference and Abstract Book 17 th International Conference on Cytochrome P450: Biochemistry, Biophysics and Structure, Manchester UK.
- Bernhardt, R., 1996. Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 127: 137-221.
- Bernhardt, R., 2006. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. J. Biotechnol. 124(1): 128-145.
- Blanck, J., Ristau, O., Zhukov, A.A., Archakov, A.I., Rein, H., Ruckpaul, K., 1991. Cytochrome P-450 spin state and leakiness of the monooxygenase pathway. Xenobiotica. 21(1): 121-135.
- Bleif, S., Hannemann, F., Zapp, J., Hartmann, D., Jauch, J., Bernhardt, R., 2011 A new *Bacillus megaterium* whole-cell catalyst for the hydroxylation of the pentacyclic triterpene 11-keto-boswellic acid (KBA) based on a recombinant cytochrome P450 system. in press
- Bunk, B., Schulz, A., Stammen, S., Münch, R., Warren, M.J., Rohde, M., Jahn, D., Biedendieck, R., 2010. A short story about a big magic bug. Bioeng. 1(2): 85-91.

Celic, A., Flitsch, S.L., Turner, N.J., 2005. Efficient terpene hydroxylation catalysts based upon P450 enzymes derived from Actinomycetes. *Org. Biomol. Chem.* 3: 2930-2934

- Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., Khar, R.K., 2005. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech.* 6(2): 329-357
- Chen, S. P., Marsh, A. 1965. Studies of the stability and extractability of vitamin D. *Anal.Biochem.* 10(1): 421-434.
- Cooke, N.E., Haddad J.G., 1989. Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr. Rev.* 10(3):294-307.
- De Bary, A. 1884. Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozen und Bacterien. Wilhelm Engelmann Verlag Leipzig.
- De Caprio, J., Yun, J., Javitt, N.B., 1992. Bile acid and sterol solubilization in 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *J. Lipid. Res.* 33(3): 441-443. Deep, K.K., Trump, D.L., Johnson, C.S., 2007. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature. Reviews. Cancer.* (7) 684-700.
- Duke, O. S., 1990. Overview of Herbicide Mechanisms of Action. *Environ. Health Perspect.* 87: 263-271.
- Eastburn, S.D., Tao, B.Y., 1994. Applications of modified cyclodextrins. *Biotechnol. Adv.* 12(2):325-339.
- Ewen, K.M., Schiffler, B., Uhlmann-Schiffler, H., Bernhardt, R., Hannemann, F., 2008. The endogenous adrenodoxin reductase-like flavoprotein arh1 supports heterologous cytochrome P450-dependent substrate conversions in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res.* 8(3): 432-441.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P., Becker, K., 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* 88(6): 587-605.
- Gamer, M., Fröde, D., Biedendieck, R., Stammen, S., Jahn, D., 2009. A T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Bacillus megaterium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82(6): 1195-1203.
- Greenberg-Ofrath, N., Terespolosky, Y., Kahane, .I, Bar, R., 1992. Cyclodextrins as carriers of cholesterol and fatty acids in cultivation of *Mycoplasmas*. *Appl. and Environmental Microbiol.* 59(2): 547-551.
- Hagemann, R., 1990. Gentechnologische Arbeitsmethoden. Ein Handbuch experimenteller Techniken und Verfahren. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., Bernhardt, R., 2007. Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1770(3): 330-344.
- Harper, J.B.; Easton, C.J.; Lincoln, S.F., 2000. Cyclodextrins to increase the utility of enzymes in organic synthesis. *Curr. org. Chem.* 4: 429-454.
- Hayashi, K., Sugimoto, H., Shinkyō, R., Yamada, M., Ikeda, S., Ikushiro, S., Kamakura, M., Shiro, Y., Sakaki, T., 2008. Structure-based design of a highly active vitamin D hydroxylase from *Streptomyces griseolus* CYP105A1. *Biochemistry.* 47(46): 11964-11972.

- Hayashi, K., Yasuda, K., Sugimoto, H., Ikushiro, S., Kamakura, M., Kittaka, A., Horst, R.L., Chen, T.C., Ohta, M., Shiro, Y., Sakaki, T., 2010. Three-step hydroxylation of vitamin D3 by a genetically engineered CYP105A1: enzymes and catalysis. *Febs. J.* 277(19): 3999-4009.
- Hiwatashi, A., Nishii, Y., Ichikawa, Y., 1982. Purification of cytochrome P-450D1 alpha (25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase) of bovine kidney mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 105(1):320-327
- Holick, M.F., 2004. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancer, and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:1678-1688.
- Holstein, A., Beil, W., 2009. Oral antidiabetic drug metabolism: pharmacogenomics and drug metabolism. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 5(3);225-241.
- Hussain, H. A., Ward J. M., 2003. Enhanced heterologous expression of two *Streptomyces griseolus* cytochrome P450s and *Streptomyces coelicolor* ferredoxin reductase as potentially efficient hydroxylation catalysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1): 373-382.
- Imoto, N., Nishioka, T., Tamura, T., 2011. Permeabilization induced by lipid II-targeting lantibiotic nisin and its effect on the bioconversion of vitamin D₃ to 25-hydroxyvitamin D₃ by *Rhodococcus erythropolis*. *Biochem. Biophys. Res. commun.* in press.
- Jones, B.C., Hawksworth, G., Horne, V.A., Newlands, A., Morsman, J., Tute, M.S., Smith, D.A. 1996. Putative active site template model for cytochrome P450C9 (tolbutamide hydroxylase). *Drug Metab Dispos.* 24(2): 260-266.
- Kaczorek, E., Olszanowski, A., 2010. Uptake of hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* (P1) and *Pseudomonas putida* (K1) strains in the presence of surfactants: A cell surface modification. *Water Air Soil Pollut.* 214:451–459
- Kawauchi, H., Sasaki, J., Adachi, T., Hanada, K., Beppu, T., Horinouchi, S., 1994. Cloning and nucleotide sequence of a bacterial cytochrome P-450VD25 gene encoding vitamin D-3 25-hydroxylase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1219: 179-183
- Kharasch, E. D., 1995. Biotransformation of sevoflurane. *Anesth. Analg.* 81(6): 27-38.
- Kleser, M., Hannemann, F., Hutter, M., Zapp, J., Bernhardt, R. CYP105A1 mediated 3-hydroxylation of glimepiride and glibenclamide using a recombinant *Bacillus megaterium* whole-cell catalyst. *Journal of Biotechnology*, submitted
- Klingenberg, M., 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 75(2):376-378
- Klinke, R., Silbernagl, S., 2003 *Lehrbuch der Physiologie*, 4. korrigierte Auflage, Georg Thieme Verlag
- Kramer, W., Oekonomopoulos, R., Pünter, J., Summ, H.D., 1988. Direct photoaffinity labeling of the putative sulphonylurea receptor in rat beta-cell tumor membranes by [³H]Glibenclamide. *FEBS Lett* 229: 355-359.

- Krämer, W., Schirmer, U., 2007. Modern Crop Protection Compounds, Band 1, Wiley-VCH Verlag Weinheim
- Kruse, W., Schettler, G., 1994. Lehrbuch mit Repetitorium Allgemeinmedizin. Walter de Gruyter Verlag Berlin.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.
- Leive, L., 1965. Release of Lipopolysaccharide by EDTA Treatment of *E.coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21(4): 290-296
- Lill, R., 2009. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460(7257):831-838.
- Lisurek, M., Kang, M.J., Hartmann, R.W., Bernhardt, R., 2004. Identification of monohydroxy progesterones produced by CYP106A2 using comparative HPLC and electrospray ionisation collision-induced dissociation mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319(2): 677-682.
- Löffler, G., Petrides P.E., 2003. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. völlig neu bearbeitete Auflage. Springer Verlag
- Lötsch, J. 2005. Opioid metabolites. *J. Pain. Symptom. Manage.* 29(5 Suppl): 10-24.
- Loubatières, A. Mariani, M.M., Alric, R., Capal, J., Ribes, G., de Malbosc, H., 1968. A new particularly active hypoglycemic sulfonamide, HB 419 (glibenclamide). *Diabete*. 28: 79-86.
- Loftsson, T., Brewster, M. E., 2010. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J. Pharm. Pharmacol.* 62(11): 1607-1621.
- Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M., Järvinen, T., (2005). "Cyclodextrins in drug delivery." *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 2(2): 335-351.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2002 *Brock Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin
- Malten, M., Hollmann, R., Deckwer, W.D., Jahn, D., 2005. "Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase DsrS in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol. Bioeng.* 89(2): 206-218.
- Meinhardt, F., 1989. Highly efficient expression of homologous and heterologous genes in *Bacillus megaterium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 343-350.
- Miro, A., Quaglia, F., Sorrentino, U., La Rotonda, M.I., D'Emmanuele Di Villa Bianca, R., Sorrentino R., 2004. Improvement of gliquidone hypoglycaemic effect in rats by cyclodextrin formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* 23(1): 57-64.
- Mitra, S., Dungan, S. R., 2001. Cholesterol solubilization in aqueous micellar solutions of quillaja saponin, bile salts, or nonionic surfactants. *J. Agric. Food. Chem.* 49(1): 384-394.
- Müller, G., Schulz, A., Hartz, D., Dearey, E.A., Wetekam, E.M., Okonomopulos, R., Crecelius, A., Wied, S., Frick, W., 2010. Novel glimepiride derivatives with potential as double-edged swords against type II diabetes. *Arch. Biochem. Biophys.* 116(1): 3-20.

- Müller, J.J., Hannemann, F., Schiffler, B., Ewen, K.M., Kappl, R., Heinemann, U., Bernhardt, R., 2011. Structural and thermodynamic characterization of the adrenodoxin-like domain of the electron-transfer protein Etp1 from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Inorg. Biochem.* 105(7): 957-965.
- Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 51(1): 263-273.
- Narhi, L. O., Fulco, A. J. 1987. Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 262(14): 6683-6690.
- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., *et al.*, 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA. Cell. Biol.* 10(1): 1-14.
- Nguyen, T. K., 2010. Site directed mutagenesis of the steroid-15 β - hydroxylase (CYP106A2) from *Bacillus megaterium* ATCC13368 to alter the regio-selectivity of progesterone hydroxylation. Dissertation.
- Ni, Y., Reye, J., Chen, R.R., 2007. Ipp deletion as a permeabilization method. *Biotechnol. Bioeng.* 97(6):1347-1356.
- Nichols, C.G., 2006. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature.* 440: 470-476.
- O'Keefe, D. P., Romesser, J. A., Leto, K.J., 1988. Identification of constitutive and herbicide inducible cytochromes P450 in *Streptomyces griseolus*. *Arch. Microbiol.* 149: 406-412. O'Keefe, D.P., Gibson, K.J., Emptage, M.H., Lenstra, R., Romesser, J.A., Litle, P.J., Omer, C.A., 1991. Ferredoxins from two sulfonylurea herbicide monooxygenase systems in *Streptomyces griseolus*. *Biochemistry.* 30(2): 447-455.
- O'Keefe, D.P., Harder, P.A., 1991. Occurrence and biological function of cytochrome P450 monooxygenases in the actinomycetes. *Mol. Microbiol.* 9:2099-2105.
- O'Keefe, D.P., Lau, S.M., Harder, P.A., 1993. Efficiency and substrate specificity of *Streptomyces griseolus* cytochromes P-450SUI and P-450SU2 mono-oxygenase reactions. *Biochem. Soc. Trans.* 4:1073-1077.
- Omer, C.A., Lenstra, R, Litle, P.J., Dean, C., Tepperman, J.M., Leto, K.J., Romesser, J.A., O'Keefe, D.P., 1990. Genes for two herbicide-inducible cytochromes P-450 from *Streptomyces griseolus*. *J. Bacteriol.* 172(6): 3335-3345.
- Omura, T., Sato R., 1964. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2378.
- Osawa, Y., Higashiyama, T., Fronckowiak, M., Yoshida, N., Yarborough, C., 1987. Aromatase. *J. Steroid. Biochem.* 27(4-6): 781-789.
- Ouzounis, C. A., Melvin, W. T., 1991. Primary and secondary structural patterns in eukaryotic cytochrome P-450 families correspond to structures of the helix-rich domain of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450cam. Indications for a similar overall topology. *Eur. J. Biochem.* 198(2): 307-315.

- Patel, N.V., Omer, C.A., 1992. Phenobarbital and sulfonylurea-inducible operons encoding herbicide metabolizing cytochromes-P450 in *Streptomyces griseolus*. *Gene*. 112: 67-76.
- Petit, P., Sauvaire, Y., Ponsin, G., Manteghetti, M., Fave, A., Ribes, G., 1993. Effects of a fenugreek seed extract on feeding behaviour in the rat: metabolic-endocrine correlates. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45(2): 369-374.
- Porter, T. D., Larson, J. R., 1991. Expression of mammalian P450s in *Escherichia coli*. *Methods. Enzymol.* 206: 108-116.
- Richter, G., 2003. *Praktische Biochemie*. Georg Thieme Verlag
- Ruckpaul, K., Rein, H., 1990. *Frontiers in Biotransformation, vol 3: Molecular Mechanisms of Adrenal Steroidogenesis and Aspects of Regulation and Application*. Taylor and Francis, London
- Russel, M. H., Saladini, J. L., Lichtner, F., 2002: Sulfonylurea herbicides. *Pesticide Outlook* 13: 166–173.
- Romesser, J.A., O'Keefe, D.P., 1986. Induction of cytochrome P-450-dependent sulfonylurea metabolism in *Streptomyces griseolus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140(2): 650-659.
- Rote Liste 2011. Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschliesslich bestimmter EU-Zulassungen und bestimmter Medizinprodukte), Rote Liste® Service GmbH Frankfurt/Main
- Rydberg, T., Wählin-Boll, E., Melander, A., 1991. Determination of glibenclamide and its two major metabolites in human serum and urine by column liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 564(1): 223-233.
- Rygus, T., Hillen, W., 1991 .Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35(5): 594-599.
- Sagara, Y., Wada, A., Takata, Y., Waterman, M.R., Sekimizu, K., Horiuchi, T., 1993. Direct expression of adrenodoxin reductase in *Escherichia coli* and the functional characterization. *Biol. Pharm. Bull.* 16(7): 627-630. Sambrook, J., Russel D. W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1-3.
- Sakaki, T., Kagawa, N., Yamamoto, K., Inouye, K., 2005. Metabolism of vitamin D₃ by cytochromes P450. *Front. Biosci.* 10: 119–34.
- Sakaki, T., Sugimoto, H., Hayashi, K., Yasuda, K., Munetsuna, E., Kamakura, M., Ikushiro, S., Shiro, Y., 2011. Bioconversion of Vitamin D to its active form by bacterial or mammalian cytochrome P450. *Biochim. Biophys. Acta.* 1814: 249-256.
- Sasaki, J., Mikami, A., Mizoue, K., Omura, S., 1991. Transformation of 25- and 1 alpha-hydroxyvitamin D₃ to 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ by using *Streptomyces sp.* strains. *Appl Environ Microbiol.* 57(10): 2841–2846
- Sauer, J.M., Ring, B.J., Witcher, J.W., 2005. Clinical pharmacokinetics of atomoxetine. *Clin. Pharmacokinet.* 44(6): 571-590.

- Sawada, N., Sakaki, T., Yoneda, S., Kusudo, T., Shinkyō, R., Ohta, M., Inouye, K., 2004. Conversion of vitamin D₃ to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ by *Streptomyces griseolus* cytochrome P450SU-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 320(1): 156-164.
- Schiffler, B., Bureik, M., Reinle, W., Müller, E.C., Hannemann, F., Bernhardt, R., 2004. The adrenodoxin-like ferredoxin of *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria. *J. Inorg. Biochem.* 98(7): 1229-1237.
- Schiffler, B., Kiefer, M., Wilken, A., Hannemann, F., Adolph, H.W., Bernhardt, R., 2001. The interaction of bovine adrenodoxin with CYP11A1 (cytochrome P450_{scc}) and CYP11B1 (cytochrome P450_{11 β}). Acceleration of reduction and substrate conversion by site-directed mutagenesis of adrenodoxin. *J. Biol. Chem.* 276(39): 36225-36232.
- Schlegel, H.G., 1992. Allgemeine Mikrobiologie. 7. überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York
- Schuster, I., 2011. Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochim. Biophys. Acta* 2011(1): 186-199.
- Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U.C., 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol. Adv.* 20(5-6): 341-359.
- Sotirova, A.V., Spasova, D.I., Galabova, D.N., Karpenko, E., Shulga, A., 2008. Rhamnolipid-Biosurfactant Permeabilizing effects on Gram-positive and Gram-negative Bacterial strains. *Curr Microbiol.* 56(6):639-644.
- Stahl, U., Esser K., 1983. Plasmid heterogeneity in various strains of *Bacillus megaterium*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 248-251.
- Steinbüchel, A., Oppermann-Sanio, F.B. 2003. Mikrobiologisches Praktikum, Versuche und Theorie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Sugimoto, H., Shinkyō, R., Hayashi, K., Yoneda, S., Yamada, M., Kamakura, M., Ikushiro, S., Shiro, Y., Sakaki, T., 2008. Crystal structure of CYP105.A1 (P450SU-1) in complex with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochemistry.* 47(13): 4017-4027.
- Takechi, M., Shimada, S., Tanaka, Y., 1992. Time course and inhibition of saponin-induced hemolysis. *Planta. Med.* 58(2):128-130.
- Tanaka, Y., Schnoes, H.K., Smith, C.M., DeLuca, H.F., 1981. 1, 25, 26-trihydroxyvitamin D₃: isolation, identification, and biological activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 210: 104-109
- Tuckey, R.C., Nguyen, M.N., Slominski, A., 2008. Kinetics of vitamin D₃ metabolism by cytochrome P450_{scc} (CYP11A1) in phospholipid vesicles and cyclodextrin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40(11): 2619-2626.
- Tsubery, H., Ofek, I., Cohen, S., Eisenstein, M., Fridkin, M., 2002. Modulation of the hydrophobic domain of Polymyxin B Nonapeptide: Effect on outer-membrane Permeabilization and Lipopolysacchride Neutralization. *Mol. Pharmacol.* 62: 1036-1042.

- Uekama, K., Hirayama, F., Irie T., 1998. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. Chem. Rev. 98(5):2045-2076. Uhlmann, H., Beckert, V., Schwarz, D., Bernhardt, R., 1992. Expression of bovine adrenodoxin in *E. coli* and site-directed mutagenesis of /2 Fe-2S/ cluster ligands. Biochem. Biophys. Res. Commun. 188(3): 1131-1138.
- Uhlmann, H., Kraft, R., Bernhardt, R., 1994. C-terminal region of adrenodoxin affects its structural integrity and determines differences in its electron transfer function to cytochrome P-450. J. Biol. Chem. 269(36): 22557-22564.
- Van Lier, J.E., Rousseau, J., Langlois, R., Fisher, G.J., 1977. Mechanism of cholesterol side-chain cleavage. II. The enzymic hydroperoxide-glycol rearrangement of the epimeric 20-hydroperoxycholesterols in 18O-enriched water. Biochim. Biophys. Acta. 487(2): 395-399.
- Vary, P. S., 1994. Prime time for *Bacillus megaterium*. Microbiology. 140(Pt 5): 1001-1013.
- Vary, P.S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W.D., Jahn, D., 2007. *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76(5): 957-967.
- Vazquez, G.J., Pettinari, M.J., Mendes, P.S., 2003. Evidence of an association between poly (3-hydroxybutyrate) accumulation and phosphotransbutyrylase expression in *Bacillus megaterium*. Int. Microbiol. 6: 127-129.
- Voll, M.J., Leive, L., 1970. Release of Polysaccharide in *Escherichia coli* resistant to the permeability increase induced by Ethylendiaminetetraacetate. Biol. Chem. 245(5): 1108-1114
- Weber, F.J., de Bont, J.A.M., 1996. Adaption mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. Biochim, Biophys. Acta. 1286: 225-245
- Wellhöner, H. H., 1992. Allgemeine und Systematische Pharmakologie und Toxikologie. Springer-Verlag GmbH 6. Auflage.
- Wittchen, K. D., Meinhardt F., 1995. Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42(6): 871-877.
- Yeager, J.F., 1928. Hemolysis by Saponin and Sodium Taurocholat, with special Reference to the series of Ryvosh. J. Gen. Physiol.11(6):779-787. Yanagida, Y., Watanabe, M., Takeba, Y., Kumai, T., Matsumoto, N., Hayashi, M., Suzuki, S., Kinoshita, Y., Kobayashi, S., 2009. Potential of lansoprazole as a novel probe for cytochrome P450 3A activity by measuring lansoprazole sulfone in human liver microsomes. Biol. Pharm. Bull. 32(8): 1422-1426.
- Yu, G.G., Zeng, X.J., Wang, H.X., Lu, L.Q., Zheng, S.P., Ma, L.Q., Chang, J., Wang, J., Zhang, D.M., Du, F.H., Zhang, L.K., 2011. Cytochrome P450 2J3/epoxyeicosatrienoic acids mediate the cardioprotection induced by ischaemic post-conditioning, but not preconditioning, in the rat. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 38(1):63-70.
- Zhang, H.M., Li, Z., Uematsu, K., Kobayashi, T., Horikoshi, K., 2008. Antibacterial activity of cyclodextrins against *Bacillus* strains. Arch. Microbiol. 190(5): 605-609.

Zhou, K., Donnelly, L., Burch, L., Tavendale, R., Doney, A.S., Leese, G., Hattersley, A.T., McCarthy, M.I., Morris, A.D., Lang, C.C., Palmer, C.N., Pearson, E.R. 2009. Loss-of-function CYP2C9 variants improve therapeutic response to sulfonylureas in type 2 diabetes: a Go-DARTS study. *Clin. Pharmacol. Ther.* 87(1): 52-56.

7. Anhang

7.1. Größenstandards und Eichgeraden

7.1.1. DNA-Marker

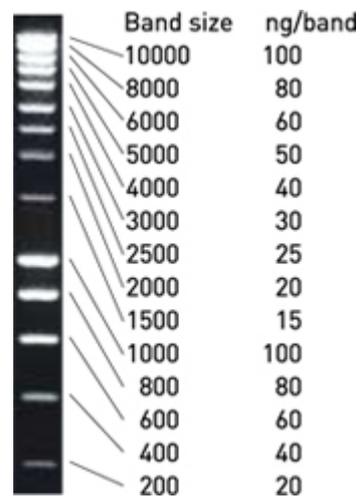


Abbildung 7.1: „Smart Ladder“ DNA-Marker (<http://www.eurogentec.com/>)

7.1.2. Proteinmarker

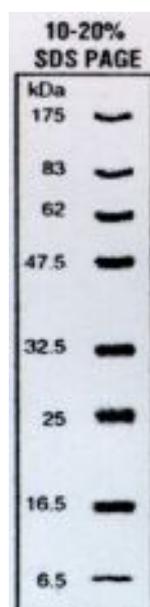


Abbildung 7.2: Proteinmarker "Prestained, Broad Range" (<http://www.neb.com/>)

7.1.3. Eichgerade zur Ermittlung der Produktbildung 25-OH-Vitamin D₃

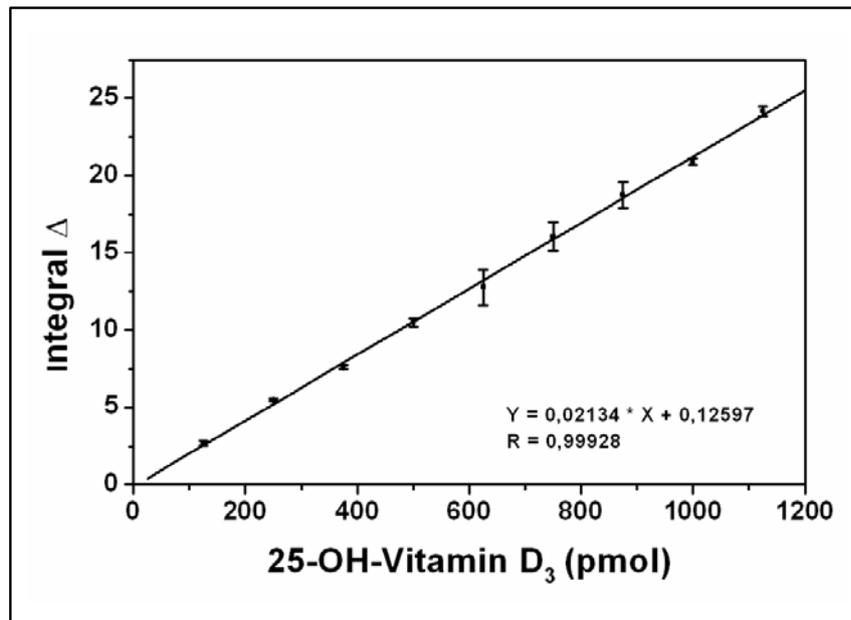


Abbildung 7.3: Eichkurve von 25-OH-Vitamin D₃. Die Standardsubstanz wurde in Ethanol gelöst und eine Verdünnungsreihe in Acetonitril (90 %) hergestellt. Der lineare Fit der HPLC-Integrale wurde mithilfe der Origin 8.1G Software durchgeführt. Die Standardabweichung der einzelnen Messpunkte resultiert aus drei unabhängigen Messungen.

7.2. DNA-Konstrukte

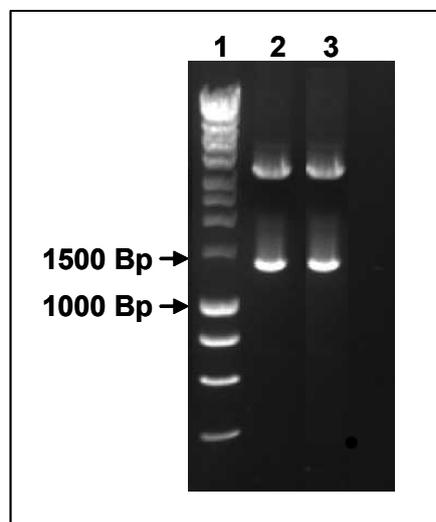


Abbildung 7.4: Kontrollrestriktionen der CYP105A1-Expressionsplasmide. Spur 1: DNA-Marker „Smart Ladder“; Spur 2: pKKHC-CYP105A1-His Verdau über die Schnittstellen *Nco*I und *Bam*HI; Spur 3: pKKHC-CYP105A1(R84A/R73V)-His Verdau über die Schnittstellen *Nco*I und *Pst*I;

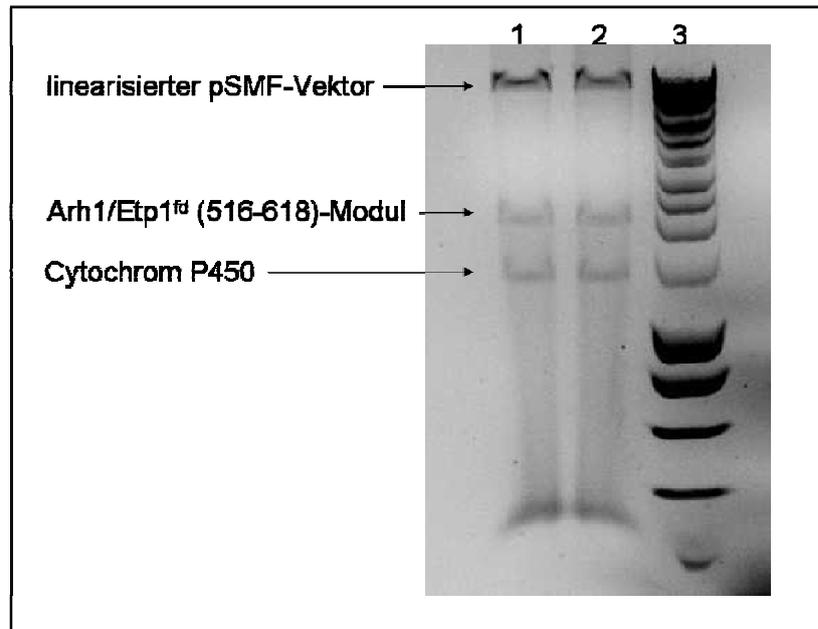


Abbildung 7.5: Kontrollrestriktionen der CYP105A1-Expressionsplasmide. Spur 1: Verdau des pSMF-CYP105A1 (R84A/R73V)- Arh1-Etp1^{fd} (516-618)-Vektors über die Schnittstellen *SpeI* und *MluI* zur Restriktion des CYP105A1 (R84A/R73V) sowie *KpnI* und *SphI* zur Restriktion des Arh1/Etp1^{fd} (516-618)-Moduls; Spur 2: Verdau des pSMF-CYP105A1-Arh1-Etp1^{fd} (516-618)-Vektors über die Schnittstellen *SpeI* und *MluI* zur Restriktion des CYP105A1 sowie *KpnI* und *SphI* zur Restriktion des Arh1/Etp1^{fd}(516-618)-Moduls; Spur 3: DNA-Marker „Smart Ladder“

7.2.1. Multiple cloning site für den *Bacillus megaterium*-Expressionsvektor

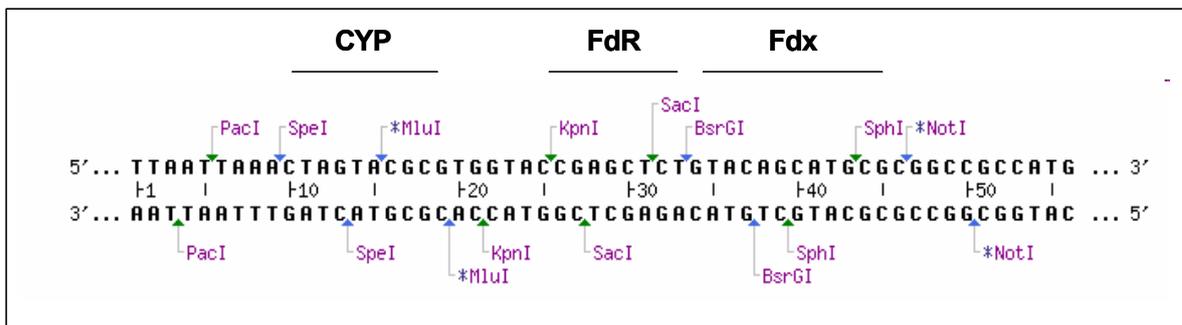


Abbildung 7.6: Multiple cloning site zur Erzeugung des *Bacillus megaterium*-Expressionsvektors pSMF2.1. Die Darstellung der Schnittstellen der Multiple cloning site erfolgte mithilfe des Programms NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)

7.3. HPLC-Chromatogramme der gereinigten Hauptprodukte aus der Glimepirid- und Glibenclamid-Umsetzung

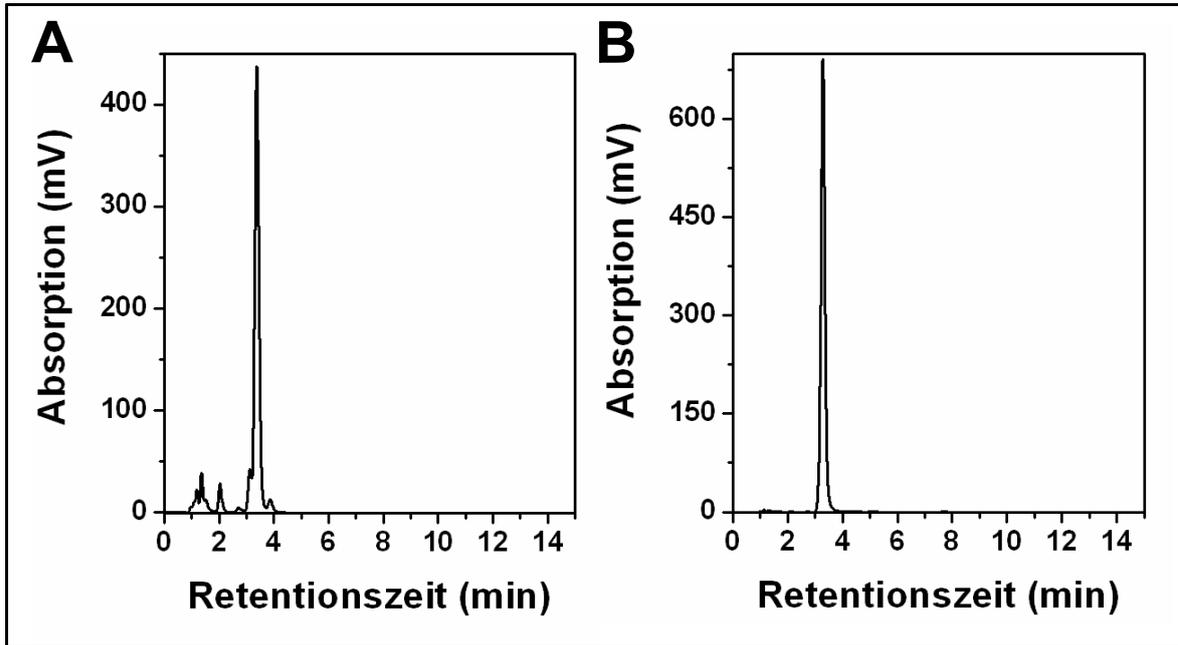


Abbildung 7.7: HPLC-Chromatogramm des isolierten Hauptproduktes aus der Ganzellumsetzung von (A) Glimepirid und (B) Glibenclamid.

7.4. Sequenzen der Synthesegene

Zur besseren Übersicht sind Start-codon, Stopp-codon sowie die flankierenden Schnittstellen durch Fettdruck hervorgehoben.

7.4.1. Gene zur Expression in *E.coli*

7.4.1.1. CYP105A1 His

NcoI - **CC ATG GCC** GAC ACT GCG ACC ACT CCA CAG ACC ACT GAT GCA CCG
GCA TTT CCG TCC AAC CGT TCC TGT CCG TAC CAG CTG CCG GAC GGT TAT GCC
CAG CTC CGT GAC ACC CCG GGT CCA CTG CAC CGT GTT ACC CTG TAC GAT GGT
CGT CAG GCT TGG GTT GTC ACC AAA CAC GAA GCC GCA CGC AAA CTC CTG GGT
GAC CCG CGT CTG TCC AGC AAC CGT ACG GAT GAC AAC TTC CCG GCA ACT TCT
CCG CGT TTC GAA GCA GTC CGT GAA TCT CCG CAG GCA TTC ATC GGT CTG GAC
CCG CCG GAA CAC GGT ACT CGT CGT CGC ATG ACC ATC TCC GAG TTC ACC GTA
AAA CGC ATC AAA GGC ATG CGT CCG GAA GTG GAA GAA GTG GTT CAC GGC TTC
CTG GAC GAG ATG CTG GCT GCA GGT CCG ACT GCG GAT CTG GTC TCT CAG TTC
GCT CTG CCA GTA CCG TCA ATG GTC ATC TGC CGT CTG CTG GGC GTT CCG TAC
GCA GAC CAC GAA TTT TTC CAG GAC GCA AGC AAA CGT CTG GTG CAG TCT ACC
GAT GCA CAG TCC GCT CTC ACC GCT CGT AAC GAC CTC GCT GGT TAC CTG GAC
GGT CTG ATC ACC CAG TTC CAG ACG GAA CCA GGT GCT GGT CTG GTA GGT GCC
CTG GTT GCG GAT CAG CTG GCG AAC GGT GAA ATC GAC CGT GAA GAA CTG ATC
TCT ACC GCA ATG CTG CTG CTG ATC GCA GGC CAT GAA ACT ACC GCT TCT ATG
ACC AGC CTG TCT GTA ATC ACC CTG CTG GAT CAC CCA GAA CAG TAT GCA GCG
CTG CGT GCT GAC CGT TCT CTC GTT CCG GGT GCC GTT GAA GAG CTG CTG CGT
TAC CTG GCG ATT GCG GAT ATC GCT GGT GGT CGT GTT GCA ACC GCT GAC ATC
GAG GTA GAG GGT CAT CTG ATC CGT GCG GGT GAA GGC GTC ATC GTT GTT AAC
AGC ATC GCG AAC CGT GAC GGT ACG GTT TAC GAG GAC CCG GAT GCG CTG
GAT ATC CAC CGT TCT GCG CGT CAC CAT CTG GCC TTC GGT TTC GGC GTT CAC
CAG TGC CTG GGT CAG AAC CTG GCT CGT CTG GAG CTG GAA GTG ATC CTG AAC
GCG CTG ATG GAT CGC GTA CCG ACT CTG CGT CTG GCT GTA CCG GTT GAA CAG
CTG GTA CTG CGT CCA GGT ACG ACC ATC CAG GGT GTG AAC GAA CTG CCG
GTG ACG TGG CAT CAC CAT CAC CAT CAC **TAA GGATCC** - **BamHI**

7.4.1.2. CYP105A1 (R84A/R73V) His

NcoI - **CC ATG GCA** GAT ACA GCT ACA ACA CCT CAA ACA ACG GAT GCT CCT GCT
TTT CCT TCT AAT CGT AGC TGT CCT TAT CAA TTA CCT GAT GGA TAT GCT CAA TTA
CGT GAT ACA CCT GGA CCT TTA CAT CGT GTA ACA TTA TAC GAT GGA CGT CAA
GCT TGG GTA GTA ACA AAA CAT GAA GCT GCT AGA AAA TTA TTA GGT GAT CCT
CGT TTA TCT TCT AAT **GTG** ACG GAT GAT AAT TTT CCT GCT ACA TCT CCT **GCT** TTT
GAA GCT GTA CGT GAA TCT CCT CAA GCT TTT ATT GGA TTA GAT CCT CCT GAA
CAT GGA ACA CGT CGT CGT ATG ACA ATT AGC GAA TTT ACG GTA AAA CGT ATT
AAA GGT ATG CGT CCT GAA GTA GAA GAA GTA GTA CAC GGA TTT TTA GAT GAA
ATG TTA GCT GCT GGA CCT ACA GCT GAT TTA GTA TCT CAA TTT GCT TTA CCT
GTA CCT TCT ATG GTT ATT TGT CGT TTA TTA GGT GTT CCT TAT GCT GAT CAC
GAA TTT TTT CAA GAT GCA AGC AAA CGT TTA GTA CAA TCT ACA GAT GCT CAA
TCT GCT TTA ACA GCT CGT AAT GAT TTA GCT GGA TAT TTA GAT GGA CTT ATT
ACG CAA TTT CAA ACA GAA CCT GGT GCT GGA TTA GTT GGA GCT TTA GTA GCT
GAT CAA TTA GCT AAT GGT GAA ATT GAT CGT GAA GAA TTA ATT AGC ACG GCT
ATG TTA TTA TTA ATT GCT GGA CAT GAA ACA ACA GCT TCT ATG ACA TCT TTA
AGC GTA ATT ACA CTT TTA GAT CAT CCA GAA CAA TAT GCT GCT TTA CGT GCT
GAT CGT TCT TTA GTA CCT GGT GCT GTA GAA GAA TTA CTT CGT TAT CTT GCT
ATT GCT GAT ATT GCA GGT GGA CGT GTA GCT ACA GCT GAT ATT GAA GTA GAA
GGA CAT TTA ATT CGT GCT GGT GAA GGT GTA ATT GTA GTA AAT AGC ATT GCT
AAT CGT GAT GGA ACA GTA TAT GAA GAT CCT GAT GCT TTA GAT ATT CAT CGT
TCT GCT CGT CAT CAT TTA GCT TTT GGA TTT GGA GTA CAT CAA TGT TTA GGA
CAA AAC CTT GCT CGT CTT GAA TTA GAA GTA ATT CTT AAC GCT TTA ATG GAT
CGT GTA CCT ACA TTA CGT TTA GCT GTA CCT GTA GAA CAA TTA GTA TTA CGT
CCT GGA ACA ACA ATT CAA GGT GTA AAC GAA TTA CCT GTA ACA TGG CAT CAC
CAT CAC CAT CAC **TAA CTG CAG** - **PstI**

7.4.2. Gene zur Expression in *Bacillus megaterium*

Neben Start codon, Stopp codon und den flankierenden Klonierungsschnittstellen, ist die RBS zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben.

7.4.2.1. CYP105A1 (R84A/R73V)

SpeI - **ACTAGTAAATCAAGGAGGTGAATATACA ATG** ACA GAT ACA GCT ACA ACA
 CCT CAA ACA ACG GAT GCT CCT GCT TTT CCT TCT AAT CGT AGC TGT CCT TAT
 CAA TTA CCT GAT GGA TAT GCT CAA TTA CGT GAT ACA CCT GGA CCT TTA CAT
 CGT GTA ACA TTA TAC GAT GGA CGT CAA GCT TGG GTA GTA ACA AAA CAT GAA
 GCT GCT AGA AAA TTA TTA GGT GAT CCT CGT TTA TCT TCT AAT **GTG** ACG GAT
 GAT AAT TTT CCT GCT ACA TCT CCT **GCT** TTT GAA GCT GTA CGT GAA TCT CCT
 CAA GCT TTT ATT GGA TTA GAT CCT CCT GAA CAT GGA ACA CGT CGT CGT ATG
 ACA ATT AGC GAA TTT ACG GTA AAA CGT ATT AAA GGT ATG CGT CCT GAA GTA
 GAA GAA GTA GTA CAC GGA TTT TTA GAT GAA ATG TTA GCT GCT GGA CCT ACA
 GCT GAT TTA GTA TCT CAA TTT GCT TTA CCT GTA CCT TCT ATG GTT ATT TGT CGT
 TTA TTA GGT GTT CCT TAT GCT GAT CAC GAA TTT TTT CAA GAT GCA AGC AAA
 CGT TTA GTA CAA TCT ACA GAT GCT CAA TCT GCT TTA ACA GCT CGT AAT GAT
 TTA GCT GGA TAT TTA GAT GGA CTT ATT ACG CAA TTT CAA ACA GAA CCT GGT
 GCT GGA TTA GTT GGA GCT TTA GTA GCT GAT CAA TTA GCT AAT GGT GAA ATT
 GAT CGT GAA GAA TTA ATT AGC ACG GCT ATG TTA TTA TTA ATT GCT GGA CAT
 GAA ACA ACA GCT TCT ATG ACA TCT TTA AGC GTA ATT ACA CTT TTA GAT CAT
 CCA GAA CAA TAT GCT GCT TTA CGT GCT GAT CGT TCT TTA GTA CCT GGT GCT
 GTA GAA GAA TTA CTT CGT TAT CTT GCT ATT GCT GAT ATT GCA GGT GGA CGT
 GTA GCT ACA GCT GAT ATT GAA GTA GAA GGA CAT TTA ATT CGT GCT GGT GAA
 GGT GTA ATT GTA GTA AAT AGC ATT GCT AAT CGT GAT GGA ACA GTA TAT GAA
 GAT CCT GAT GCT TTA GAT ATT CAT CGT TCT GCT CGT CAT CAT TTA GCT TTT
 GGA TTT GGA GTA CAT CAA TGT TTA GGA CAA AAC CTT GCT CGT CTT GAA TTA
 GAA GTA ATT CTT AAC GCT TTA ATG GAT CGT GTA CCT ACA TTA CGT TTA GCT
 GTA CCT GTA GAA CAA TTA GTA TTA CGT CCT GGA ACA ACA ATT CAA GGT GTA
 AAC GAA TTA CCT GTA ACA TGG **TAA TAA ACGCGT – MluI**

7.4.2.2. Arh1 (A18G)

Da es sich bei Arh1 eigentlich um die Arh1 Mutante Arh1 (A18G) handelt, ist das FAD-Bindemotiv (**GXGXXG**) durch Fettdruck hervorgehoben.

KpnI - **GGTACCAAATCAAGGAGGTGAATATACA ATG** TCT ACA CAA ACA AGC AGC
 CCT GTA GTA GGA ATT ATT **GGA** TCT **GGA** CCT GCT **GGA** TTT TAT ACA GCA CAT
 CGT TTA TTA CGC AAT GAT CCT AAT GTA AAA ATT GAT ATG TTT GAA TCT CGT
 CCT GTA CCT TTT GGA CTT GTA CGT TAT GGT GTA GCA CCT GAT CAT CCT GAA
 GTA AAA CAT GTA GAA CAT AAA TTT TCT GAA ATT GCA GAA TCT ACA CAA TTT
 CGT TTT TTA GGA AAT GTA AAC GTA GGT ACA GAT GTA AGC CTT CGT GAT TTA
 ACA AAA AAT TAT GAT TGT TTA GTA TTA GCA TAT GGT GCA GCT GGT GAT AAA
 CGT TTA GGA ATT CCT GGT GAA GAT TTA AGC GGA GTA TAT TCT GCA CGT GAA
 GTA GTA GGA TGG TAT AAT TCT GAT CCT CGC AAC CAA AAT TTA GAA TTA GAT
 TTA TCT CAA GTA GAA GAT GCA GTA GTA ATT GGA CAT GGA AAC GTT AGC TTA
 GAT GTA GCT CGT ATT CTT TTA AGC AAT CCT GCA CAA TTA TCA CCT ACA GAT
 ATT AAT CCT TTA TTT CTT AAA TCT TTA GAA CGC TCT AAT TTA AAA CGT TTA CAT
 ATT GTA GGA CGT CGT AAC ATT TTT TCT GTA TCT TTT ACA ATT AAA GAA TTA
 CGT GAA TTA TTT GCT TTA TCT TCT GCA GTA TTT TTT GCA CCT TCT TTT AAT TAT
 TCT ACA AAA TGG ATG AAT GAA ACG GAT GCA AGC GGA TTA GAT CGT CCT CGT
 AAA CGT TTA TTA AAA TTA TTA GTA TCT GAA ATT CAA AAA GCA GTA TCT GAA
 AAA CGT GTA GCA CCT TAT TCT AAA GAT AAA AAA TGT TGG AAT TTA GAA TTT
 GGA TTA ACA CCT GTA GAA ATT TTA GGA CAT AAA GGT AAT GTA GAA AAT GTA
 CGT TTT CAA ATT ACA GAT TCT ATT CGT ACA GAT GCA GAA TCT AAA TTT ACA
 ACA ATT CCT GCT CAA TTA TTT ATT CGT TCT ATT GGA TAT AAA TCT ATG CCT TTA
 CCT GGA ATG AAA GAT GTT GGA GTA CCT TTT GAT GAT GCA AAA GGT ATT GTT
 AAA AAT GTA AAT GGA TTT GTA CGT CCT GGA ATT TAT ACA AGC GGA TGG GTA
 AAA CAT GGA CCT ATT GGA GTA ATT GCA ACG ACA ATG ATG GAT GCA TTT GCA
 ACA GCA GAT ACA ATT ACA AAA GAT TGG AAA TCT AAA AAA GAA TTT TTA AAA
 AAT TCT AAA TTA GGA TGG GAT GGA TTA AAA AAA AAT ATT AAA ACA CCT GTA
 AAT CAC TGG AAA GAT TGG AAA GTA ATT CGT AAT GCA GAA ATT GAA CGC GGA
 TTA CGT CAT GAA AGT TTA AGC GAA AAA TTT CGC TCT AAT GAA GAT ATG ATT
 AAA TTA ATT TAT CCT GGA AAA AAA **TAA GAGCTC** - **SacI**

7.4.2.3. Etp1^{fd} (516-618)

BsrGI - **TGTACAAAATCAAGGAGGTGAATATACA ATG** GGA ACA GGT ATT AAA GTA
TTT TTT GTA ACG CCT GAA GGA CGT GAA ATC ATG ATT GAA GGT AAC GAA GGC
GAT TCT ATT TTA GAT TTA GCA CAT GCA AAT AAT ATT GAT TTA GAA GGT GCT
TGC GAA GGA TCT GTA GCA TGT TCT ACA TGC CAT GTA ATT GTA GAT CCT GAA
CAT TAT GAA TTA TTA GAT CCT CCG GAA GAA GAT GAA GAA GAT ATG TTA GAT
TTA GCT TTT GGA TTA GAA GAA ACA AGC CGT CTT GGA TGT CAA GTA CTT CTT
CGT AAA GAT CTT GAT GGA ATT CGT GTA CGT ATT CCT **TAA** GCATGC - SphI

7.5.2. pKKHC-CYP105A1 (R84A/R73V) His

Sequenzierprimer: Nco B.meg for

```

Query 60      CGGATGCTCCTGCTTTTCCTTCTAATCGTAGCTGTCCCTTATCAATTACCTGATGGATATG 119
              |||
Sbjct 1      CGGATGCTCCTGCTTTTCCTTCTAATCGTAGCTGTCCCTTATCAATTACCTGATGGATATG 60

Query 120     CTCAATTACGTGATACACCTGGACCTTTACATCGTGTAACATTATACGATGGACGTCAAG 179
              |||
Sbjct 61     CTCAATTACGTGATACACCTGGACCTTTACATCGTGTAACATTATACGATGGACGTCAAG 120

Query 180     CTTGGGTAGTAACAAAACATGAAGCTGCTAGAAAATTATTAGGTGATCCTCGTTTATCTT 239
              |||
Sbjct 121    CTTGGGTAGTAACAAAACATGAAGCTGCTAGAAAATTATTAGGTGATCCTCGTTTATCTT 180

Query 240     CTAATGTGACGGATGATAATTTTCCTGCTACATCTCCTGCTTTTGAAGCTGTACGTGAAT 299
              |||
Sbjct 181    CTAATGTGACGGATGATAATTTTCCTGCTACATCTCCTGCTTTTGAAGCTGTACGTGAAT 240

Query 300     CTCCTCAAGCTTTTATTGGATTAGATCCTCCTGAACATGGAACACGTCGTCGTATGACAA 359
              |||
Sbjct 241    CTCCTCAAGCTTTTATTGGATTAGATCCTCCTGAACATGGAACACGTCGTCGTATGACAA 300

Query 360     TTAGCGAATTTACGGTAAAACGTATTTAAAGGTATGCGTCTGAAGTAGAAGAAGTAGTAC 419
              |||
Sbjct 301    TTAGCGAATTTACGGTAAAACGTATTTAAAGGTATGCGTCTGAAGTAGAAGAAGTAGTAC 360

Query 420     ACGGATTTTATAGATGAAATGTTAGCTGCTGGACCTACAGCTGATTTAGTATCTCAATTTG 479
              |||
Sbjct 361    ACGGATTTTATAGATGAAATGTTAGCTGCTGGACCTACAGCTGATTTAGTATCTCAATTTG 420

Query 480     CTTTACCTGTACCTTCTATGGTTATTTGTCGTTTATTAGGTGTTCCCTTATGCTGATCACG 539
              |||
Sbjct 421    CTTTACCTGTACCTTCTATGGTTATTTGTCGTTTATTAGGTGTTCCCTTATGCTGATCACG 480

Query 540     AATTTTTTCAAGATGCAAGCAAACGTTTAGTACAATCTACAGATGCTCAATCTGCTTTAA 599
              |||
Sbjct 481    AATTTTTTCAAGATGCAAGCAAACGTTTAGTACAATCTACAGATGCTCAATCTGCTTTAA 540

Query 600     CAGCTCGTAATGATTTAGCTGGATATTTAGATGGACTTATTACGCAATTTCAAACAGAAC 659
              |||
Sbjct 541    CAGCTCGTAATGATTTAGCTGGATATTTAGATGGACTTATTACGCAATTTCAAACAGAAC 600

Query 660     CTGGTGTGCTGGATTAGTTGGAGCTTTAGTAGCTGATCAATTAGCTAATGGTGAAATTGATC 719
              |||
Sbjct 601    CTGGTGTGCTGGATTAGTTGGAGCTTTAGTAGCTGATCAATTAGCTAATGGTGAAATTGATC 660

Query 720     GTGAAGAATTAATTAGCACGGCTATGTTATTATTAATTGCTGGACATGAAACAACAGCTT 779
              |||
Sbjct 661    GTGAAGAATTAATTAGCACGGCTATGTTATTATTAATTGCTGGACATGAAACAACAGCTT 720

Query 780     CTATGACATCTTTAAGCGTAATTACACTTTTAGATCATCCAGAACAATATGCTGCTTTAC 839
              |||
Sbjct 721    CTATGACATCTTTAAGCGTAATTACACTTTTAGATCATCCAGAACAATATGCTGCTTTAC 780

Query 840     GTGCTGATCGTTCTTTAGTACCTGGTGTGTAGAAGAATTACTTCGTTATCTTGCTATTG 899
              |||
Sbjct 781    GTGCTGATCGTTCTTTAGTACCTGGTGTGTAGAAGAATTACTTCGTTATCTTGCTATTG 840

```


Query	1084	ACATCAATGTTTAGGACAAAACCTTGCTCGTCTTGAATTAGAAGTAATCTTAACGCTTT	1143
Sbjct	130	ACATCAATGTTTAGGACAAAACCTTGCTCGTCTTGAATTAGAAGTAATCTTAACGCTTT	71
Query	1144	AATGGATCGTGACCTACATTACGTTTAGCTGTACCTGTAGAACAATTAGTATTACGTCC	1203
Sbjct	70	AATGGATCGTGACCTACATTACGTTTAGCTGTACCTGTAGAACAATTAGTATTACGTCC	11
Query	1204	TGGAACAACA 1213	
Sbjct	10	TGGAACAACA 1	

7.5.3. pSMF CYP105A1 wt vs. pSMF- CYP105A1 (R84A/R73V) (MK-1vs.MK-3)

Sequenzierprimer: MCS Bmeg for

Anmerkung: Das pSMF CYP105A1 wt Sequenzierergebnis wurde gegen das pSMF- CYP105A1 (R84A/R73V) Sequenzierergebnis von geblastet.

Query	70	CAAACAACGGATGCTCCTGCTTTTCCCTTCTAATCGTAGCTGTCCTTATCAATTACCTGAT	129
Sbjct	7	CAAACAACGGATGCTCCTGCTTTTCCCTTCTAATCGTAGCTGTCCTTATCAATTACCTGAT	66
Query	130	GGATATGCTCAATTACGTGATACACCTGGACCTTTACATCGTGTAACATTATACGATGGA	189
Sbjct	67	GGATATGCTCAATTACGTGATACACCTGGACCTTTACATCGTGTAACATTATACGATGGA	126
Query	190	CGTCAAGCTTGGGTAGTAACAAAACATGAAGCTGCTAGAAAATTATTAGGTGATCCTCGT	249
Sbjct	127	CGTCAAGCTTGGGTAGTAACAAAACATGAAGCTGCTAGAAAATTATTAGGTGATCCTCGT	186
Query	250	TTATCTTCTAAT- GTG ACGGATGATAATTTTCCCTGCTACATCTCCT GC -TTTTGAAGCTG	307
Sbjct	187	TTATCTTCTAAT CGT -ACGGATGATAATTTTCCCTGCTACATCTCCT- CGTTTC GAAGCTG	244
Query	308	TACGTGAATCTCCTCAAGCTTTTATTGGATTAGATCCTCCTGAACATGGAACACGTCGTC	367
Sbjct	245	TACGTGAATCTCCTCAAGCTTTTATTGGATTAGATCCTCCTGAACATGGAACACGTCGTC	304
Query	368	GTATGACAATTAGCGAATTTACGGTAAAACGTATTAAGGTATGCGTCTGAAGTAGAAG	427
Sbjct	305	GTATGACAATTAGCGAATTTACGGTAAAACGTATTAAGGTATGCGTCTGAAGTAGAAG	364
Query	428	AAGTAGTACACGGATTTTATAGATGAAATGTTAGCTGCTGGACCTACAGCTGATTTAGTAT	487
Sbjct	365	AAGTAGTACACGGATTTTATAGATGAAATGTTAGCTGCTGGACCTACAGCTGATTTAGTAT	424
Query	488	CTCAATTTGCTTTACCTGTACCTTCTATGGTTATTTGTCGTTTATTAGGTGTTCTTATG	547
Sbjct	425	CTCAATTTGCTTTACCTGTACCTTCTATGGTTATTTGTCGTTTATTAGGTGTTCTTATG	484
Query	548	CTGATCACGAATTTTTTCAAGATGCAAGCAAACGTTTAGTACAATCTACAGATGCTCAAT	607
Sbjct	485	CTGATCACGAATTTTTTCAAGATGCAAGCAAACGTTTAGTACAATCTACAGATGCTCAAT	544
Query	608	CTGCTTTAACAGCTCGTAATGATTTAGCTGGATATTTAGATGGACTTATTACGCAATTTT	667
Sbjct	545	CTGCTTTAACAGCTCGTAATGATTTAGCTGGATATTTAGATGGACTTATTACGCAATTTT	604
Query	668	AAACAGAACCTGGTGTGGATTAGTTGGAGCTTTAGTAGCTGATCAATTAGCTAATGGTG	727
Sbjct	605	AAACAGAACCTGGTGTGGATTAGTTGGAGCTTTAGTAGCTGATCAATTAGCTAATGGTG	664

Query	681	TGCTGGATTAGTTGGAGCTTTAGTAGCTGATCAATTAGCTAATGGTGAAATTGATCGTGA	740
Sbjct	664		723
Query	741	AGAATTAATTAGCACGGCTATGTTATTATTAATTGCTGGACATGAAACAACAGCTTCTAT	800
Sbjct	724		783
Query	801	GACATCTTTAAGCGTAATTACACTTTTAGATCATCCAGAACAATATGCTGCTTTACGTGC	860
Sbjct	784		843
Query	861	TGATCGTTCCTTTAGTACCTGGTGTGTAGAAGAATTACTTCGTTATCTTGCTATTGCTGA	920
Sbjct	844		903
Query	921	TATTGCAGGTGGACGTGTAGCTACAGCTGATATTGAAGTAGAAGGACATTTAATTCGTGC	980
Sbjct	904		962
Query	981	TGGTGAAGGTGTAATTGTAGTAAATAGCATTGCTAATCGTGATGGAACAGTATATGAAGA	1040
Sbjct	963		1021
Query	1041	TCCTGATGCTTTAGATATTCATCGTTCGCTCGTCATCATTTAGCTTTTGGATTTGGAGT	1100
Sbjct	1022		1080
Query	1101	ACATCAATGTTTGGACAAAACCTTGCTCGTCTTGAATTAGAAGTAATCTTAACGCTTT	1160
Sbjct	1081		1128
Query	1161	AATGGATCGGTACCTACATTACGTTTAGC-TGTACCTGTAGAACAATTAGTATTACGTC	1219
Sbjct	1129		1181
Query	1220	CTGGAACAACAATTCAAGGTGT-AAACG	1246
Sbjct	1182		1204

7.5.5. pSMF CYP105A1 (R84A/R73V) Arh1 Etp1^{fd} (516-618) (MK-4)

Sequenzierprimer: MCS Bmeg for

Query	236	TCTTCTAATGTGACGGATGATAATTTTCTGCTACATCTCCTGCTTTTCGAAGCTGTACGT	295
Sbjct	61		120
Query	296	GAATCTCCTCAAGCTTTTATTGGATTAGATCCTCCTGAACATGGAACACGTCGTCGTATG	355
Sbjct	121		180
Query	356	ACAATTAGCGAATTTACGGTAAAACGTATTAAGGTATGCGTCCTGAAGTAGAAGAAGTA	415
Sbjct	181		240
Query	416	GTACACGGATTTTATGATGAAATGTTAGCTGCTGGACCTACAGCTGATTTAGTATCTCAA	475
Sbjct	241		300
Query	476	TTTGCTTTACCTGTACCTTCTATGGTTATTTGTCGTTTATTAGGTGTTCCCTTATGCTGAT	535
Sbjct	301		360

Query	536	CACGAATTTTTTCAAGATGCAAGCAAACGTTTAGTACAATCTACAGATGCTCAATCTGCT	595
Sbjct	361		420
Query	596	TTAACAGCTCGTAATGATTTAGCTGGATATTTAGATGGACTTATTACGCAATTTCAAACA	655
Sbjct	421		480
Query	656	GAACCTGGTGCTGGATTAGTTGGAGCTTTAGTAGCTGATCAATTAGCTAATGGTGAAATT	715
Sbjct	481		540
Query	716	GATCGTGAAGAATTAATTAGCACGGCTATGTTATTATTAATTGCTGGACATGAAACAACA	775
Sbjct	541		600
Query	776	GCTTCTATGACATCTTTAAGCGTAATTACACTTTTAGATCATCCAGAACAATATGCTGCT	835
Sbjct	601		660
Query	836	TTACGTGCTGATCGTTCTTTAGTACCTGGTGCTGTAGAAGAATTACTTCGTTATCTTGCT	895
Sbjct	661		720
Query	896	ATTGCTGATATTGCAGGTGGACGTGTAGCTACAGCTGATATTGAAGTAGAAGGACATTTA	955
Sbjct	721		780
Query	956	ATTCGTGCTGGTGAAGGTGTAATTGTAGTAAATAGCATTGCTAATCGTGATGGAACAGTA	1015
Sbjct	781		840
Query	1016	TATGAAGATCCTGATGCTTTAGATATTCATCGTTCTGCTCGTCATCATTTAGCTTTTGGTA	1075
Sbjct	841		900
Query	1076	TTTGGAGTACATCAATGTTTAGGACAAAACCTTGCTCGTCTTGAATTAGAAGTAATTCCTT	1135
Sbjct	901		960
Query	1136	AACGCTTTAATGGATCGGTACCTACATTACGTTTAGCTGTACCTGTAGAACAATTAGTA	1195
Sbjct	961		1020
Query	1196	TTACGTCCTGGAACAACAATTCAAGGTGTAACGAATTACCTGTAACATGGTAATAAACG	1255
Sbjct	1021		1080
Query	1256	CGTGGTACCAAATCAAGGAGGTGAATATACAATGTCTACACAAACAAGCAGCCCTGTAGT	1315
Sbjct	1081		1140
Query	1316	AGGAATTATTGGATCTGGACCTGCTGGATTTTATACAGCACATCGTTTATTACGCAATGA	1375
Sbjct	1141		1200
Query	1376	TCCTAATGTAAAAATTGATATGTTT	1400
Sbjct	1201		1225

7.6. Strukturdaten der 3-hydroxylierten Glimepirid- und Glibenclamid-Derivate

Tabelle 7.1: Strukturdaten von *R*-3-Hydroxycyclohexyl-Glimepirid

	300 K		343 K
	δ_C	δ_H	δ_H
1ax	47.41	3.28 <i>m</i>	3.33 <i>dddd</i> (11.5/11.5/4/4)
2ax	41.48	1.04 <i>m</i>	1.07 <i>m</i>
2eq		1.87 <i>m</i>	1.94 <i>dddd</i> (12/4/4/2)
3ax	72.49	2.88 <i>m</i>	2.93 <i>m</i>
4	38.64	1.10 <i>m</i>	1.14 <i>m</i>
5ax	30.35	0.88 <i>m</i>	0.91 <i>m</i>
5eq		1.56 <i>m</i>	1.59 <i>m</i>
6ax	31.72	1.04 <i>m</i>	1.05 <i>m</i>
6eq		1.61 <i>m</i>	1.67 <i>m</i>
7	-----	6.39 <i>d</i> (8)	6.21 <i>d</i> (8)
8	165.05	-----	-----
11	138.33	-----	-----
12, 16	129.11	7.45 <i>m</i> (2H)	7.42 <i>m</i> (2H)
13, 15	127.27	7.81 <i>m</i> (2H)	7.80 <i>m</i> (2H)
14	144.88	-----	-----
17	35.15	2.90 <i>m</i> (2H)	2.92 <i>m</i> (2H)
18	39.83	3.50 <i>m</i> (2H)	3.53 <i>m</i> (2H)
19	-----	8.37 <i>t</i> (6)	8.23 <i>t</i> (6)
20	151.64	-----	-----
22	171.82	-----	-----
23	51.85	4.17 <i>s</i>	4.16 <i>s</i>
24	131.92	-----	-----
25	152.01	-----	-----
26	12.80	2.01 <i>s</i> (3H)	2.02 <i>s</i> (3H)
27	15.96	2.19 <i>q</i> (2H)	2.21 <i>q</i> (7; 2H)
28	12.67	0.98 <i>t</i> (7.5; 3H)	1.01 <i>t</i> (7; 3H)
4-Me	18.13	0.88 <i>d</i> (7; 3H)	0.90 <i>d</i> (7; 3H)

Tabelle 7.2: Strukturdaten von cis-3 Hydroxycyclohexyl-Glibenclamid

	300K		343K
	δ_C	δ_H	δ_H
1ax	46.81	3.33 <i>m</i>	3.38 <i>dddd</i> (10.3/10.3/8/4/4)
2ax	40.41	1.07 <i>m</i>	1.09 <i>m</i>
2eq		1.83 <i>m</i>	1.88 <i>ddd</i> (12/4/4)
3ax	67.03	3.42 <i>m</i>	3.46 <i>dddd</i> (9.5/9.5/4/4)
4ax	34.12	1.07 <i>m</i>	1.08 <i>m</i>
4eq		1.67 <i>m</i>	1.70 <i>m</i>
5ax	20.47	1.13 <i>m</i>	1.17 <i>m</i>
5eq		1.60 <i>m</i>	1.63 <i>m</i>
6ax	31.41	1.01 <i>m</i>	1.03 <i>m</i>
6eq		1.55 <i>m</i>	1.61 <i>m</i>
7	-----	6.53 <i>d</i> (8)	6.40 <i>d</i> (8)
8	150.55	-----	-----
11	138.31	-----	-----
12, 16	129.24	7.48 <i>m</i> (2H)	7.48 <i>m</i> (2H)
13, 15	127.26	7.84 <i>m</i> (2H)	7.85 <i>m</i> (2H)
14	145.13	-----	-----
17	34.65	2.94 <i>m</i> (2H)	
18	39.83	3.55 <i>m</i> (2H)	
19	-----	8.25 <i>t</i> (5.5)	8.25 <i>t</i> (5.5)
20	163.65	-----	-----
21	124.80	-----	-----
22	129.50	7.67 <i>d</i> (2.5)	7.67 <i>d</i> (2.5)
23	124.34	-----	-----
24	131.51	7.49 <i>dd</i> 8.5/2.5)	7.47 <i>dd</i> 8.5/2.5)
25	114.14	7.14 <i>d</i> (8.5)	7.13 <i>d</i> (8.5)
26	155.69	-----	-----
OCH ₃	56.21	3.79 <i>s</i> (3H)	3.80 <i>s</i> (3H)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Völklingen, den 8. September 2011

(Michael Kleser)