

Etablierung und Optimierung umweltfreundlicher
Prozesse zur Modifikation steroidaler Verbindungen
mittels Ganzzellkatalysen

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat) der Naturwissenschaftlich-
Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von

Lisa König

(M. Sc.)

Saarbrücken 2020

Tag des Kolloquiums: 04.12.2020
Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jörn Walter
Berichterstatter: Prof. Dr. Rita Bernhardt
Prof. Dr. Bruce Morgan
Vorsitz: Prof. Dr. Uli Müller
Akad. Mitarbeiter: Dr. Konstantin Lepikhov

Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Rita Bernhardt, für die Chance, diese Promotion in Ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Insbesondere bedanke ich mich für die lehrreichen und motivierenden Gespräche, die Geduld und die Unterstützung.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Bruce Morgan für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie der Hilfe bei der Überarbeitung meines Manuskriptes.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Frank Hannemann für die vielen Male des Korrekturlesens. Insbesondere aber auch für die Geduld und die hilfreichen Tipps bei einigen Besprechungen, die jedes Mal wieder für neue Ideen und Motivation gesorgt haben.

Ein riesiges Dankeschön an alle ehemaligen und aktuellen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe. Ich habe mich von Anfang an sehr wohl gefühlt und bin trotz der ganzen Pendelei auch immer gern ins Labor gekommen. Es gab immer was zu lachen und zu erzählen. Danke an Natalia, für die Gespräche, vorallem, wenn es abends mal wieder länger im Labor gedauert hat. Danke an Martin, der immer eine lustige Story auf Lager hatte. Danke auch an Ammar, Philip und Mohammed, die mir immer eine Hilfe bei fachlichen Fragen waren. Danke an Daniela, mit der es immer Spaß gemacht hat, im Labor zu arbeiten, die Pausen zu verbringen und privat Dinge zu unternehmen. Desweiteren gilt mein spezieller Dank meiner superfleißigen Masterandin Sabine, die durch ihre sorgfältige Arbeit viele Daten für ein zusätzliches Paper generiert hat. Die Zusammenarbeit war immer super, vorallem durch das gegenseitige Motivieren und natürlich auch die lustigen Mittagspausen.

Danke an Birgit Heider-Lips und Antje Eiden-Plach für die Hilfsbereitschaft und die tollen Plaudereien in der Mittagspause. Ich bedanke mich auch bei Gabi Schon, für die große Hilfe bei bürokratischen Angelegenheiten und den netten Gesprächen.

Ein besonderer Dank geht auch an das ehemalige Büro 336: Danke Benni und Tanja für die unglaublich witzigen Momente und die super Organisation von Betriebsausflügen und den Mittagessen, vorallem wenn ich wieder mal vergessen habe, dafür Pausen im Labor einzuplanen. Danke auch an Simone, die immer Zeit gefunden hat mir neue Dinge beizubringen, oder trotz der mittlerweile großen Distanz gemeinsame Paper zu besprechen, die immer ein offenes Ohr für fachliche und private Angelegenheiten hatte und ich dank ihr gesünder bin, weil sie mir die Hälfte meiner Zigaretten weggeraucht hat. „sharing is caring“. Quasi.

Desweiteren danke ich meinen Freunden und meiner Familie, die mich immer wieder in den Alltag zurückgeholt haben und auf die ich mich immer verlassen konnte.

Und natürlich danke ich insbesondere meinem Freund „Dr.“ Bartho, der Grund warum ich mich jeden Tag gefreut habe nach Hause zu kommen. Danke für dein Multitasking-Talent als 5-Sterne-Koch, Motivationscoach, Lieblingslehrer und bester Freund.

Beitrag zu wissenschaftlichen Publikationen

Diese Arbeit basiert auf vier originalen Forschungsartikeln, welche in Kapitel 2 vollständig abgebildet sind. Die originalen Manuskripte wurden in dieser Arbeit reproduziert mit freundlicher Genehmigung von Elsevier, *Metabolic Engineering* (2.1 König et al. (2019)); *Journal of Biotechnology* (2.3 König et al. (2020b)); *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2.4 Putkaradze et al 2020) und Wiley, *Biotechnology and Bioengineering* (2.2 König et al. 2020a).

Kapitel 2.1 Lisa König, Philip Hartz, Rita Bernhardt, Frank Hannemann. „High-yield C11-oxidation of hydrocortisone by establishment of an efficient whole-cell system in *Bacillus megaterium*”. *Metabolic Engineering*. 2019;55:59 - 67. doi:10.1016/j.ymben.2019.06.005

Die Autorin führte alle dargestellten Klonierungen, *in vivo*-Experimente in Schüttelkolben und Reagenzgläsern und alle RP-HPLC-Analysen durch. Sie wirkte mit bei der Interpretation MS-spektrometrischer Daten, der photometrischen Quantifizierung des NADP/H-Gehaltes und leistete den Hauptteil beim Verfassen des Manuskriptes. Dr. Philip Hartz assistierte bei der Durchführung der NADP/H-Quantifizierung und der Interpretation der MS-spektrometrischen Daten. Dr. Frank Hannemann und Prof. Dr. Rita Bernhardt konzipierten das Projekt und wirkten mit an der Interpretation der Ergebnisse und der Ausarbeitung des Manuskriptes.

Kapitel 2.2 Lisa König, Simone Brixius-Anderko, Mohammed Milhim, Daniela Tavouli-Abbas, Michael C. Hutter, Frank Hannemann, Rita Bernhardt. „Identification and circumvention of bottlenecks in CYP21A2-mediated premedrol production using recombinant *Escherichia coli*”. *Biotechnology and Bioengineering* 2020;117(4):901-911. doi:10.1002/bit.27246

Die Autorin führte *in vivo*-Experimente in Schüttelkolben durch, zum Vergleich der Batch- und Fed-Batch Verfahren. Sie führte die assoziierten RP-HPLC-Analysen durch und wirkte wesentlich bei der Interpretation der erfassten Daten mit und leistete den Hauptteil beim Verfassen des Manuskriptes. Dr. Simone Brixius-Anderko beteiligte sich am Studiendesign und an der Ausarbeitung des Manuskriptes. Außerdem generierte sie die M210 Mutantenbibliothek, führte *in vivo*-Experimente und die Reinigung von CYP21A2 durch. Dr. Mohammed Milhim entwarf und etablierte das CPR-abhängige Ganzzellsystem, führte *in vivo*-Experimente und die Proteinreinigung von Cytochrom *b₅* durch. Zusätzlich wirkte er mit in der Interpretation der Ergebnisse. Daniela Tavouli-Abbas generierte den Vektor pREP4-groESL_*b₅*, führte *in vitro*-Experimente und die Proteinreinigung von bCPR₋₂₇ durch. Dr. Michael C. Hutter führte Docking-Simulationen durch und interpretierte die erhaltenen Ergebnisse. Dr. Frank Hannemann und Prof. Dr. Rita Bernhardt konzipierten das Projekt und wirkten mit an der Interpretation der Ergebnisse und der Ausarbeitung des Manuskriptes.

Kapitel 2.3 Lisa König, Sabine Szczesny, Simone Brixius-Anderko, Rita Bernhardt, Frank Hannemann. „Mixed-culture fermentation for enhanced C21-hydroxylation of glucocorticoids”. *Journal of Biotechnology* 2020;314-315:14 - 24. doi:10.1016/j.jbiotec.2020.03.008

Die Autorin führte *in vivo*-Experimente in Schüttelkolben und die assoziierte Analyse mittels RP-HPLC durch. Sie produzierte proteinanalytische Daten und entwickelte das optimierte Protokoll der Premedrolacetat-Synthese in der Mischkultur. Außerdem leistete sie den Hauptteil beim Verfassen des Manuskriptes. Sabine Szczesny führte Klonierungen der Vektoren, SDS-Analysen und *in vivo*-Experimente durch. Dr. Simone Brixius-Anderko führte *in vitro*-Experimente durch, assistierte bei dem Verfassen des Manuskripts und beteiligte sich am Studiendesign. Prof. Dr. Rita Bernhardt und Dr. Frank Hannemann initiierten das Projekt, beteiligten sich an der Interpretation der Ergebnisse und an der Ausarbeitung des Manuskriptes.

Kapitel 2.4 Natalia Putkaradze, Lisa König, Lars Kattner, Michael C. Hutter, Rita Bernhardt. „Highly regio- and stereoselective hydroxylation of vitamin D₂ by CYP109E1”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020;524(2):295-300. doi:10.1016/j.bbrc.2020.01.091

Die Autorin führte *in vivo* und *in vitro*-Experimente der zeitabhängigen Vitamin D₂-Biotransformationen und die assoziierten RP-HPLC-Analysen durch. Außerdem wirkte sie mit bei der Erstellung von Abbildungen. Dr. Natalia Putkaradze leistete den Hauptteil beim Schreiben des Manuskriptes und der Interpretation der Ergebnisse. Sie führte die Proteinreinigung von CYP109E1, Vorexperimente und die Identifikation der Vitamin D₂-Metaboliten mittels RP-HPLC-Standards und präparativen Ganzzell-Umsatz von Vitamin D₂ mit anschließender Extraktion des Hauptproduktes durch. Dr. Lars Kattner generierte die als RP-HPLC-Standards verwendeten VD₂-Metaboliten, stellte diese zur Verfügung, führte die Strukturaufklärung des Endproduktes mittels NMR-Spektroskopie durch und wirkte mit am Studiendesign. Dr. Michael C. Hutter führte Docking-Simulationen durch und interpretierte die erhaltenen Ergebnisse. Prof. Dr. Rita Bernhardt konzipierte das Projekt und wirkte mit an der Interpretation der Ergebnisse und der Ausarbeitung des Manuskriptes.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	2
1. Einleitung	3
1.1 Ganzzellkatalyse als zukunftsorientierte Alternative zu chemischen Synthesen	3
1.2 Pharmazeutische Relevanz und Synthese steroidaler Verbindungen	4
1.2.1 Natürliche und synthetische Glucocorticoide	5
1.2.2 Vitamin D-Metaboliten	8
1.3 Modifikation individueller Positionen im Steroidgerüst mit Hilfe von Ganzzellsystemen	9
1.3.1 Funktionalisierung von gesättigten C-H-Bindungen	9
1.3.1.1 Cytochrome P450 (P450)	10
1.3.1.2 Biotechnologische Anwendung von P450	12
1.3.2 Oxidoreduktion von C-O Bindungen	13
1.3.2.1 Short-chain Dehydrogenase/Reduktase (SDR)-Superfamilie	14
1.3.2.2 11 β - Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 (11 β HSD1)	15
1.3.3 Veresterung von C-OH Bindungen	16
1.3.3.1 Chloramphenicol Acetyl Transferase 1 (CAT1)	17
1.4 Limitierungen von Ganzzellsystemen zur Steroidsynthese	18
1.5 Ziel der Arbeit	20
2. Wissenschaftliche Publikationen	21
2.1 Lisa König et al. (2019)	21
2.2 Lisa König et al. (2020a)	37
2.3 Lisa König et al. (2020b)	51
2.4 Putkaradze et al. (2020)	71
3. Zusammenfassung und Diskussion	78
3.1 Potenzial von Ganzzellkatalysen in der Herstellung steroidaler Pharmazeutika	78
3.1.1 Biotechnologische Modifikation von Glucocorticoiden	78
3.1.2 Biotechnologische Modifikation von Secosteroiden	81
3.2 Strategien zur Optimierung von Ganzzellsystemen	83
3.3 Ökologische Bewertung der biotechnologischen Cortisonsynthese	95
4. Perspektiven	99
4.1 Industrielle Modifikation von Glucocorticoiden	99
4.2 Optimierung des <i>B. megaterium</i> Ganzzellsystems zur Vitamin D ₂ - Hydroxylierung	101
5. Literaturverzeichnis	103
6. Abkürzungsverzeichnis	123

Zusammenfassung

Steroidale Verbindungen regulieren u.a. die Mineralstoff-Homöostase, sowie Immun- und Entzündungsreaktionen und sind daher von hoher pharmazeutischer Relevanz. Die Herausforderung ihrer industriellen Synthese besteht neben hohen Ausbeuten in der Minimierung der einhergehenden Umweltbelastung. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit effiziente Ganzzellsysteme etabliert und optimiert, welche fähig sind ökologisch nachhaltige Teilsynthesen unterschiedlicher (Seco-) Steroide zu katalysieren. Zum einen konnte die effiziente Oxidation von Hydrocortison etabliert werden, welche, verglichen mit einem Referenzsystem, eine 1000-fach gesteigerte Cortisonausbeute von $14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ aufwies. Eine SHE-Bewertung demonstrierte zudem eine erhöhte Ökoeffizienz im direkten Vergleich zu einem äquivalenten chemischen Verfahren. Ein weiteres Ganzzellsystem ermöglicht eine Hydroxylierung von Medran, welche als limitierender Teilschritt der Methylprednisolon-Synthese gilt. Hier konnte die Produktausbeute durch Optimierung verdoppelt werden. Die Etablierung einer Mischkultur zur Produktderivatisierung führte zu einer weiteren Erhöhung der Premedrolproduktion um 117% auf $>1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Außerdem wurde die erste biotechnologische und daher hochselektive Hydroxylierung von Vitamin D₂ zur Produktion von physiologisch aktiven Metaboliten entwickelt. All diese Ergebnisse unterstreichen das große Potenzial von Ganzzellsystemen, die ökologische Nachhaltigkeit industrieller Synthesen von Feinchemikalien zu erhöhen.

Abstract

Steroidal compounds regulate the mineral homeostasis as well as immune and inflammatory reactions and are, thus, highly relevant for pharma industry. Besides achieving high product yields, the industrial synthesis of these compounds is challenging in terms of minimizing accruing environmental pollution. For these reasons, this work focused on the establishment and optimization of diverse whole-cell systems to catalyze different sub-processes of the (seco-) steroid synthesis in an efficient and sustainable matter. In the first part, the efficient oxidation of hydrocortisone was enabled, which resulted in a 1000-fold increase of the product yield compared with a reference system. Furthermore, an SHE-assessment demonstrated improved ecological efficiency in comparison with an equivalent chemical process. A second whole-cell system catalyzes the hydroxylation of medrane, a limiting step of methylprednisolone synthesis. Here, the product yield was doubled by optimization. Moreover, the establishment of a mixed-culture fermentation for subsequent product derivatization led to a further enhancement of the premedrol production by 117%, up to 1.5 g L⁻¹. Finally, the first biotechnological and thus, highly selective hydroxylation process of vitamin D₂ was established for the production of physiologically active metabolites. All obtained results highlight the great potential of whole-cell systems to increase ecological sustainability for the industrial synthesis of fine chemicals.

1. Einleitung

1.1 Ganzzellkatalyse als zukunftsorientierte Alternative zu chemischen Synthesen

Die pharmazeutische Industrie repräsentiert einen großen Anteil des gesamten Gesundheitsmarkts und trägt somit maßgeblich zur globalen Wirtschaft bei. Als Folge der erhöhten Lebenserwartung und des zunehmend gesundheitsbewussten Lebenswandels der Bevölkerung steigt die Nachfrage nach gesundheitsbezogenen Produkten, was zu einem stetigem Wachstum des Gesundheitssektors führt [1]. Infolge der Globalisierung steigt der wirtschaftliche Konkurrenz- und Preisdruck. Diese Wettbewerbsbedingungen fördern eine weitere Steigerung der globalen Produktionsmengen, welche zunehmend negativen Einfluss auf die Erhaltung der Umwelt ausübt [2]. Eine erhöhte Sensibilisierung der Bevölkerung für Klimawandel und Umweltschutz führte daher in den letzten Jahren zu strengeren Auflagen in der Abfallentsorgung und Energienutzung (www.bmu.de). Um dem globalen Wettbewerb dennoch standzuhalten, besteht zunehmender Bedarf zur Entwicklung alternativer, umweltschonender und ökonomischer Verfahren zur nachhaltigen Herstellung pharmazeutischer Produkte [3].

Zur industriellen Herstellung pharmazeutisch wirksamer Substanzen kommt bisher größtenteils die **chemische Synthese** zum Einsatz. Trotz jahrelanger Prozessoptimierung resultieren solche Verfahren immer noch in einer hohen Umweltbelastung, welche auf verschiedenste Faktoren zurückzuführen ist. Von großer Bedeutung sind hierbei der Einsatz von umwelttoxischen Substanzen wie etwa halogenierten Verbindungen, sowie die Verwendung von entflammaren, organischen Lösemitteln [4]. Diese Reagenzien werden unter hohen Temperaturen und Druckverhältnissen eingesetzt, was große Energiemengen erfordert und außerdem ein hohes Belastungspotenzial der Gewässer und der Atmosphäre darstellt. Demnach resultieren chemische Synthesen in einem unverhältnismäßig negativen ökologischen Einfluss. Um diesen zu minimieren, werden umweltbezogene Maßnahmen immer weiter verschärft und infolgedessen effiziente Alternativen zur nachhaltigen Herstellung von Pharmazeutika entwickelt (www.bmu.de).

Die Grundidee zur „**grünen Chemie**“ schufen 1998 Anastas und Warner, welche die Leitlinien unter Berücksichtigung der ökologischen, ökonomischen und sozialen Dimensionen der Nachhaltigkeit aufstellten [5]. Als übergeordnete Ziele wurden die Reduktion des Abfallvolumens und des Ressourcenverbrauchs bei erhöhter Produktqualität, Energieeffizienz und Sicherheit angestrebt. Um diese Ziele zu erreichen, sollte primär die Anzahl der Syntheseschritte reduziert werden, was grundsätzlich durch den Einsatz von Enzymen, Organo- oder Metallkatalysatoren zu realisieren war [6]. Weiterführend zeigte der Einsatz lebender, mikrobieller oder eukaryotischer Zellen vielseitige Anwendbarkeit zur umweltschonenden und selektiven Katalyse einer Vielzahl an komplexen Reaktionen. Diese Verfahren beschreiben das Prinzip der **Ganzzellkatalyse** und weisen aufgrund des Einsatzes lebender Organismen einen verringerten Kosten- und Zeitfaktor im Vergleich zu isolierten und immobilisierten Enzymen auf [7]. Ganzzellkatalysen finden in nicht-toxischen, zumeist wässrigen Lösemitteln unter physiologischen pH-Werten und Temperaturen statt [8]. Somit verringert sich das Belastungsrisiko erheblich im Vergleich zu chemischen Synthesen. Darüber hinaus sind

Ganzzellkatalysatoren häufig für mehrere Zyklen einsetzbar oder biologisch abbaubar, was in ressourcenschonenden Verfahren resultiert [9]. Eine hohe Regio- bzw. Stereospezifität ermöglicht zudem die Katalyse hoch effizienter Reaktionen ohne aufwändige Produktreinigung [10]. Aufgrund geringer Generationszeit der Mikroorganismen erfolgt während der Kultivierung eine schnelle Generierung von aktiven Zellen, welche die Synthese der katalytisch aktiven Enzyme und benötigter Cofaktoren durch zellinterne Mechanismen gewährleisten können. Ganzzellsysteme nehmen insbesondere eine zunehmend große Rolle in der industriellen Herstellung steroidalender Pharmazeutika ein, da hierfür höchst selektive Modifikationen der komplexen Verbindungen erforderlich sind und diese mittels chemischen Synthesen zumeist nur unter extremen Bedingungen durchzuführen sind [11]. Diesbezüglich existieren bereits zahlreiche biotechnologische Lösungsansätze, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

1.2 Pharmazeutische Relevanz und Synthese steroidalender Verbindungen

Steroidale Verbindungen bilden eine zentrale Wirkstoffgruppe zur Regulation physiologisch wichtiger Prozesse in pro- und eukaryontischen Zellen. Darunter stellen Mitglieder der Sterolklasse wie Cholesterol und -derivate wichtige stabilisierende und strukturgebende Komponenten von Zellmembranen dar [12]. Diese zeichnen sich durch ein charakteristisches Sterangerüst aus (Abb. 1), welches sich aus drei sechsgliedrigen und einem fünfgliedrigen Ring zusammensetzt.

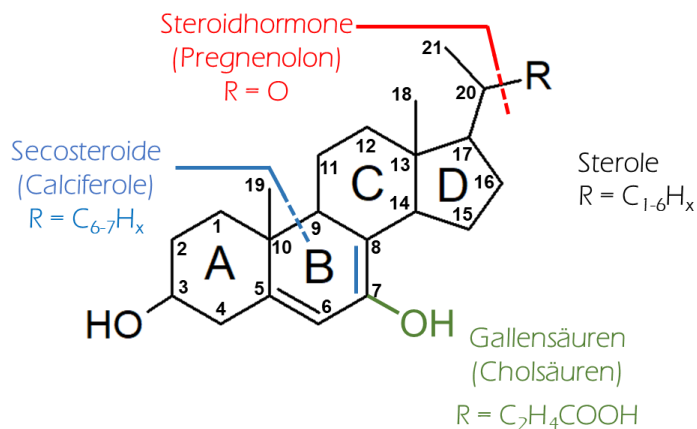


Abbildung 1: Strukturelle Unterschiede von steroidalenden Verbindungen. Sterole (schwarz) und Secosteroide (blau) enthalten eine hydrophobe Seitenkette (R) variierender Länge (Anzahl der Atome durch tiefstehende Zahlen gekennzeichnet). Ausgehend von Sterolen wie Cholesterol erfolgt die Synthese des Steroidhormon-Vorläufers Pregnenolon, welche die Abspaltung der Seitenkette erfordert (rot). Den Gallensäuren ist eine Carbonsäure als Seitenkette und zumeist eine Hydroxylgruppe in C7 gemein (grün). Calciferole als Vertreter der Secosteroide enthalten eine hydrophobe Seitenkette (R). Zusätzlich besteht eine Doppelbindung zwischen C7 und C8 und die Aufspaltung des B-Rings (blau).

Deren Bezeichnung erfolgt von A bis D, während die einzelnen Kohlenstoffatome entsprechend mit C1–C17 (ggf. bis C19) gekennzeichnet werden. Cholesterol und einige Cholesterolerivate wie Ergosterol, Desmosterol enthalten eine zusätzliche hydrophobe Seitenkette C22–C27, welche im Menschen im Rahmen der Steroidsynthese abgespalten wird und so das zentrale Vorläufermolekül Pregnenolon entsteht. Neben der Synthese von Steroiden dienen Verbindungen der Sterole als

Ausgangsverbindungen zur Biosynthese von Gallensäuren und Secosteroiden wie Cholsäuren und von Calciferolen [13].

1.2.1 Natürliche und synthetische Glucocorticoide

Ausgehend von Pregnenolon erfolgt in der Nebennierenrinde die Biosynthese der Corticosteroide, welche in Glucocorticoide (GC) und strukturell ähnliche Mineralocorticoide (MC) klassifiziert werden (Abb. 2A). Natürliche GC (nGC) zeichnen sich vorwiegend durch die Anwesenheit der Hydroxylgruppen in den Positionen C11, C17 und/oder C18 am Progesterongerüst aus, welche verantwortlich für die spezifische Bindung an den intrazellulären GC-Rezeptor (GR) sind [10,14]. Dessen Aktivierung initiiert unter anderem die Repression von proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 und folglich eine verminderte Entzündungsreaktion und/oder Immunantwort [15]. Daher werden diese Wirkstoffe häufig zur Behandlung von einigen autoimmun-assoziierten Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis [16], Addison-Krankheit [17] oder Asthma [18] eingesetzt.

Aufgrund ihres breiten Einsatzgebietes ist die industrielle Synthese und Modifikation steroidaler Verbindungen wirtschaftlich von großer Bedeutung. Sie bilden einen der größten Bereiche in der pharmazeutischen Industrie, gemessen an deren globalem Marktwert, welcher mehr als 10 Mrd. Euro beträgt [19]. Dieser Wert ergibt sich aus dem enormen Bedarf dieser Wirkstoffe (z.B. Hydrocortison: 50 t/Jahr), welcher größtenteils mittels chemischer oder semi-synthetischer Herstellungsprozesse gedeckt wird [20]. Aufgrund ökologischer Aspekte, die chemische Verfahren mit sich bringen, besteht jedoch verstärkt die Notwendigkeit zur Umrüstung hin zu umweltfreundlichen und nachhaltigen Verfahren. Daher wurden in den letzten Jahrzehnten erhebliche Fortschritte bei der Entwicklung von effizienten biotechnologischen Verfahren erzielt, mit hinreichendem Potenzial, chemische Synthesen langfristig ersetzen zu können [6].

Ein prominentes Beispiel, welches die Eignung biokatalytischer Ansätze unterstreicht, stellt die sogenannte „Upjohn Synthese“ dar. Im Jahr 1952 gelang Peterson and Murray erstmals die (semi-) biotechnologische Produktion des zentralen Glucocorticoids Hydrocortison [21]. Hierbei wurde Progesteron als Ausgangssubstanz genutzt, welches im initialen Schritt an Position C11 selektiv durch *Rhizopus arrhizus* α -hydroxyliert wurde. Dieser Schritt ist bis heute auf chemischem Wege nicht gewinnbringend durchführbar und wird ausschließlich mittels Biokatalysen realisiert [22]. Die Anwendung der mikrobiellen Teilsynthese ermöglichte die synthetische Herstellung größerer Mengen Cortison und Hydrocortison, welche daraufhin großflächig zur Therapie eingesetzt werden konnten. Insbesondere in den letzten zwei Jahrzehnten rückte die Etablierung einer vollständigen biotechnologischen Hydrocortisonsynthese verstärkt in den Mittelpunkt der industriellen Forschung. Bereits 2003 wurde durch Szczebara *et al.* die komplette Biosynthese von Hydrocortison aus einfachen und günstigen Kohlenstoffquellen wie Ethanol oder Glucose etabliert [23]. Hierzu wurden rekombinante Enzyme der Steroidbiosynthese verschiedenen Ursprungs vereint in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* produziert. Dieses Ganzzellsystem katalysierte die Synthese des Glucocorticoids mit beträchtlicher Produktselektivität von nahezu 80%, wies jedoch lediglich Produktkonzentrationen im unteren mg L⁻¹-Bereich auf. Mit dem Ziel die Produktivität zu steigern, wurde der Fokus der biotechnologischen Forschung zunehmend auf die Etablierung und Optimierung einzelner

Syntheseschritte gerichtet. So erfolgte etwa die Seitenkettenspaltung bei Cholesterol oder Phytosterolen industriell durch ein *Bacillus megaterium* (*B. megaterium*)-Ganzzellsystem mit katalytischer Aktivität des bovinen Cytochroms P450 (P450) CYP11A1 [24,25]. Ebenso erwiesen sich rekombinante, *E. coli*-basierte Ganzzellsysteme als geeignet für derartige biotechnologische Verfahren, wie etwa zur C11-Hydroxylierung des 11-Deoxycortisols zur Hydrocortisonsynthese [26] oder zur C21-Hydroxylierung von 17 α -Hydroxyprogesteron [27].

Aufgrund der strukturellen Analogie zu Verbindungen der MC, weisen GC wie etwa Hydrocortison, vergleichbare Affinität zum MR auf. Die medikamentöse Therapie mit nGC initiiert daher Transaktivierungen des MR, resultiert jedoch in einer abgeschwächten mineralocorticoiden Wirkung. Diese ist auf eine schnellere Dissoziation durch die zusätzliche C17-Hydroxylgruppe zurück zu führen [14,28,29] (Abb. 2A). Dennoch kann sich diese Eigenschaft in unerwünschten MC-assoziierten Nebenwirkungen wie etwa Bluthochdruck, Hypokaliämie und Wassereinlagerungen manifestieren, welche zu häufigen Komplikationen während der GC-Therapie zählen [30]. Daher erfolgt heutzutage zunehmend die Anwendung von synthetischen GC (sGC), welche durch modifizierte funktionelle Gruppen im Steroidgerüst angepasste Eigenschaften aufweisen. So bewirkt eine Δ^1 -Dehydrierung im Hydrocortisongerüst die Synthese des zentralen sGC Prednisolon, welches eine verringerte mineralocorticoide Wirkung im Vergleich zu seinem natürlichen Analogon Hydrocortison aufweist [31]. Ausgehend von dieser Verbindung können durch chemische Modifikationen weitere sGC synthetisiert werden, welche unterschiedliche Affinitäts- und Dissoziationskinetiken zum GR und MR aufweisen [32–34] (Abb. 2B, rechts). Dies ermöglicht die Entwicklung einer Auswahl an Wirkstoffen mit variierender Potenz, biologischer Halbwertszeit und MC-assoziierten Nebenwirkungen, welche für unterschiedliche Anwendungsgebiete eingesetzt werden können (Abb. 2C).

Die Eignung biotechnologischer Verfahren zur Herstellung dieser modifizierten Wirkstoffe konnte kürzlich durch Etablierung eines rekombinanten *E. coli* Ganzzellsystems demonstriert werden [35,36]. Dieses katalysiert die C21-Funktionalisierung wichtiger Intermediate Medran und Deltamedran, in der Synthese des sGC Methylprednisolon (Abb. 2B, links).

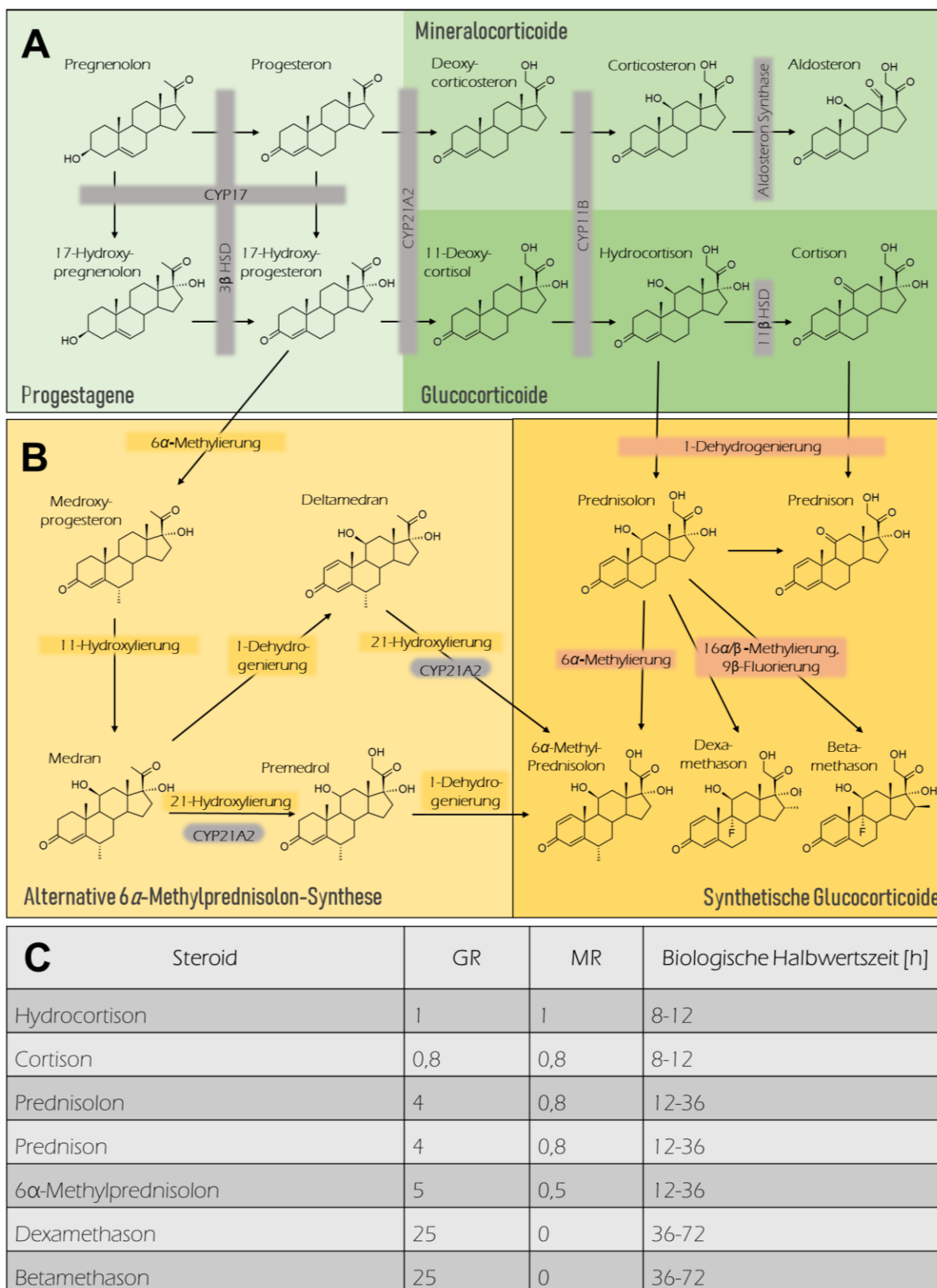


Abbildung 2: Übersicht über die natürliche Synthese von Glucocorticoiden und die anschließende Modifikation mit entsprechender Rezeptorselektivität und pharmakologische Wirksamkeit im Menschen. **(A)** Dargestellt ist die Biosynthese natürlicher Steroidhormone (grün), welche in Progestagene (mintgrün), Mineralocorticoide (hellgrün) und Glucocorticoide (dunkelgrün) eingeteilt werden. **(B)** Anschließende Modifikationen ausgehend von den Verbindungen 17-Hydroxyprogesteron, Hydrocortison und Cortison stellen die Produktionswege zur Synthese synthetischer Glucocorticoide dar (gelb). **(C)** Die pharmazeutisch relevanten Glucocorticoide sind aufgelistet in Bezug auf Rezeptorselektivität, Wirksamkeit und biologischer Halbwertszeit [30,37]. Die Angabe der Rezeptorselektivität erfolgte als Faktor normiert auf Hydrocortison (Faktor 1).

1.2.2 Vitamin D-Metaboliten

Neben Cholesterol, der vorherrschenden Steroidvorstufe, dienen weitere, strukturähnliche Sterole wie 7-Dehydrocholesterol oder Ergosterol als Vorläufer zur Bildung von Calciferol-Verbindungen. Hierbei handelt es sich um den Oberbegriff einer Reihe biologisch aktiver Vitamin D-Verbindungen, aus deren Stammstruktur sich die Isoformen D₃ und D₂ ableiten. Vitamin D₃ ist zum Großteil tierischer Herkunft, wohingegen Vitamin D₂ vorwiegend aus Pilzen und Mykoplasmen gewonnen wird [38]. Sie zählen zur Gruppe der Secosteroide, welche aus dem mit Steroidverbindungen gemeinsamen Vorläufermolekül Lanosterol zu 7-Dehydrocholesterol oder Ergosterol (Provitamin D₃ und D₂) und durch die nachfolgende Öffnung des B-Rings zu Prävitamin D gebildet werden [39] (siehe Abb. 3).

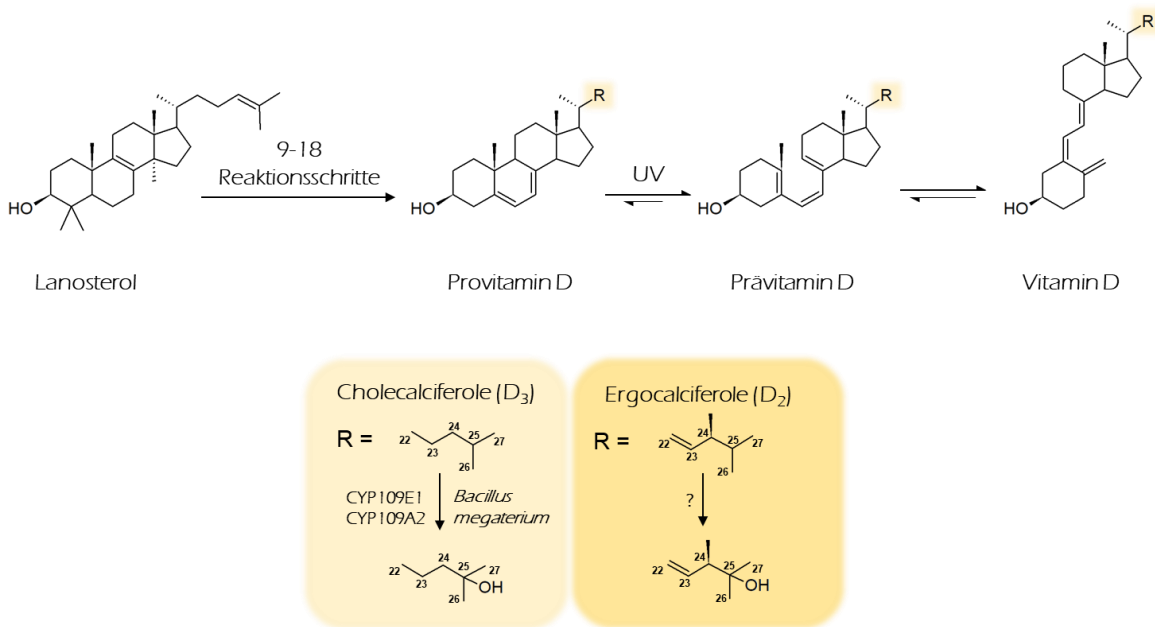


Abbildung 3: Vitamin D-Synthese und strukturelle Unterschiede zwischen Vitamin D₂ und D₃. Der gemeinsame Vorläufer Lanosterol, ein Intermediat der Cholesterolbiosynthese, wird im Menschen in 9-18 Reaktionsschritten zu Provitamin D synthetisiert. Durch Bestrahlung von Wellenlängen im UV-Bereich erfolgt eine Aufspaltung des B-Rings und Bildung von Prävitamin D. Eine nachfolgende, intermolekulare Umstrukturierung mündet in der Bildung des Vitamin D. Die hydrophobe Seitenkette C22-C27 ist mit R gekennzeichnet (gelb) und variiert je nach Vitamin D-Form (gezeigt auf hell- und dunkelgelbem Untergrund). Die Hydroxylierung zur Produktion des metabolisch aktiven Metaboliten 25-OH-Vitamin D₃ ist auch möglich durch die enzymatische Aktivität von CYP109E1 und CYP109A2 aus *B. megaterium*, wohingegen für Vitamin D₂ bisher kein biotechnologischer Hydroxylierungsprozess beschrieben wurde.

Dies erfolgt durch einen photolytischen Prozess, ausgelöst durch UV-Exposition der äußeren Haut- bzw. Zellschicht, in denen die höchsten Konzentrationen des 7-Dehydrocholesterols bzw. Ergosterols enthalten sind. Anschließend erfolgt die hitzeinduzierte Isomerisierung zu Vitamin D₃ (Cholecalciferol) oder D₂ (Ergocalciferol) [40]. Im menschlichen Organismus werden diese Substanzen durch eine Reihe von Hydroxylierungsreaktionen modifiziert, wodurch sie erst volle biologische Wirkung durch die erhöhte Affinität zum Vitamin D Rezeptor erlangen [41]. Die Modifizierungen erfolgen zum einen in der Leber durch die Aktivität diverser P450 (CYP27A1, CYP2J3, CYP2R1, CYP3A4), welche die Hydroxylierung an der Position C25 katalysieren. Der resultierende Metabolit 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)VD) dient als Hauptspeicherform des Vitamin D, welcher im Blutplasma zirkuliert [42]. Schließlich erfolgt in der Niere eine erneute Hydroxylierung durch CYP27B1 an C1 zur Bildung der biologisch aktivsten Verbindung 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D (1 α ,25(OH)₂VD) [43]. Alternativ dazu kann

eine zweite Hydroxylierung von 25(OH)VD an Position C24 durch CYP24 zur Generation des Metaboliten 24,25-Dihydroxyvitamin D (24,25(OH)₂VD) erfolgen [44]. Eine verringerte UV-Exposition oder unzureichende Vitamin D-Aufnahme kann zu einem Mangel der biologisch aktiven Vitamin D-Derivate im Blutserum führen. Um diesem Mangel vorzubeugen oder ihn zu beseitigen, erfordert dies eine exogene Supplementierung dieser Verbindungen. Hierbei zeigte sich, dass die orale Aufnahme aktiver 1 α ,25(OH)₂VD Verbindungen zu einer verbesserten Calciumregulation und Phosphat-metabolisierung führt und zudem anti-inflammatorisch wirkt [45]. Die Aufnahme der Vorstufe 25(OH)VD erzeugte einen präventiven, therapeutischen Effekt gegen chronische Nierenkrankheiten und cholestatische Lebererkrankungen [46,47]. 24,25(OH)₂VD konnte eine biologische Rolle in der Knochenreparatur und Knorpelentwicklung zugesprochen werden [48]. Obwohl die biologische Wirksamkeit von Vitamin D₂ - im Vergleich zu Vitamin D₃ Derivaten nicht vollständig bekannt ist, gelten jedoch erstere in der Schweiz und den USA als prädominant verschriebene Vitamin D-Isoform [49–52]. Zudem wird durch das wachsende Interesse an Präparaten aus nicht-tierischen Rohstoffen auch in der EU mit einem steigenden Bedarf von Vitamin D₂ Präparaten gerechnet [53].

Die Herstellung dieser Wirkstoffe erfolgt zumeist auf chemischem Wege, welche eine Vielzahl aufwendiger Syntheseschritte und die Verwendung von toxischen Halogenverbindungen bei hohen Reaktionstemperaturen erfordert und lediglich geringe Produktausbeuten erzielt [54]. Diesbezüglich erlangt die Entwicklung effizienter, biokatalytischer Methoden wachsende Relevanz für die industrielle Produktion solcher Substanzen und ist zudem von hoher ökologischer und ökonomischer Bedeutung. Bisher wurde die biotechnologische Produktion ausschließlich durch P450 in mikrobiellen Ganzzellsystemen demonstriert [55], darunter CYP105A1 aus *Streptomyces griseolus* [56,57] und CYP107 (Vdh) aus *Pseudonocardia autotrophica* [58]. Neueste Ansätze unseres Arbeitskreises lieferten effiziente Hydroxylierungsreaktionen von Vitamin D₃ durch CYP109E1 [59] und CYP109A2 [60] aus *B. megaterium*. Diese zeigten erhöhte 25-Hydroxylierungsaktivität gegenüber Vitamin D₃ um den Faktor 5 bzw 7 im Vergleich zur produktivsten CYP105A1 Mutante aus *S. griseolus* [55,61].

1.3 Modifikation individueller Positionen im Steroidgerüst mit Hilfe von Ganzzellsystemen

1.3.1 Funktionalisierung von gesättigten C-H-Bindungen

Die Biosynthese sowie die biotechnologische Herstellung von Verbindungen auf Steroidbasis erfordert unter anderem die Aktivierung chemisch inerte C-H-Bindungen und die Integration reaktiver Hydroxylgruppen ins Substratmolekül. Die Katalyse solcher Reaktionen ist chemisch unter gemäßigten Reaktionsbedingungen nahezu unmöglich durchführbar [62]. Dies geht auf Unterschiede der quantenmechanischen Zustände des Sauerstoffs und der Substratverbindungen zurück: Stabile Substratmoleküle liegen generell im Singulett-(low-Spin) Zustand vor, wohingegen molekularer Sauerstoff einen Triplett-(high-Spin) Zustand aufgrund ungepaarter Elektronen aufweist [63]. Direkte Reaktionen zwischen Triplett- und Singulett-Molekülen sind chemisch nur durch eine Spin-Umkehrung unter hoher Energieeinwirkung durchführbar. Daher ist molekularer Sauerstoff bei Raumtemperatur generell unreaktiv. Die Verwendung von Enzymen mit Übergangsmetallionen wie Fe³⁺ im aktiven

Zentrum (Häm) ermöglicht eine direkte Interaktion mit dem Sauerstoffmolekül im Triplett-Zustand was zur Bildung der Disauerstoff-Addukte führt, die zur Integration des Sauerstoffs in das Substrat fähig sind [62]. Solche Reaktionen werden vorwiegend durch Enzyme der Cytochrom P450 Klasse katalysiert, weshalb sie auch als Monooxygenasen bezeichnet werden. Aufgrund ihres Potentials, eine Vielzahl an organischen Verbindungen synthetisieren zu können, finden sie zunehmend Anwendung in der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie [64,65].

1.3.1.1 Cytochrome P450 (P450)

Bei P450 Enzyme handelt es sich um Häm-Thiolat Proteine, welche in der Lage sind, unterschiedliche Arten von Reaktionen zu katalysieren, darunter Alkoholoxidation, N-Oxidation; N-, O-, S-Desalkylierung; und C-C-Spaltung [62], wobei die prädominante Reaktionsart die Hydroxylierung und Aktivierung von inerten C-H-Bindungen darstellt. Die Klasse der P450 Enzyme umfasst insgesamt mehr als 41000 (Stand 2018) klassifizierte Mitglieder, welche bisher in Pro- und Eukaryonten, sowie Archaea und Viren nachgewiesen werden konnten [66]. Die Klassifizierung und Nomenklatur von P450 Enzymen in Familien und Unterfamilien erfolgt nach Nebert et al. mittels Übereinstimmungen der individuellen Proteinsequenzen. Proteine derselben Familie weisen mehr als 40% und Isoformen einer Unterfamilie mehr als 55% Sequenzidentität auf [67]. Die einheitliche Nomenklatur individueller P450 Enzyme beginnt mit der Abkürzung CYP, gefolgt von einer arabischen Zahl als Bezeichnung der P450 Familie. Ein Buchstabe kennzeichnet die jeweilige Unterfamilie, gefolgt von einer weiteren arabischen Zahl zur Identifikation der individuellen Isoform. Die gebräuchliche Bezeichnung P450 steht für „Pigment 450“ und beschreibt den spektralen Zustand im reduzierten CO-gebundenen Komplex, welcher in einem charakteristisches Absorptionsmaximum bei 450 nm resultiert [68]. Maßgeblich hierfür ist das konservierte Cystein, welches als eines der zwei axial-koordinierten Liganden des Hämeisens innerhalb des Protoporphyrin IX über eine Thiolatbindung mit dem Proteinrückgrat verknüpft ist [62,69]. Die zweite axiale Position wird durch einen Wasserliganden besetzt, welcher als sechster Ligand im Ruhezustand schwach gebunden vorliegt. Die vier äquatorialen Koordinationsstellen des zentralen Fe^{3+} Ions hingegen sind durch die Stickstoffatome des Protoporphyrin IX gebunden [70] (Abb. 4, Verbindung 1).

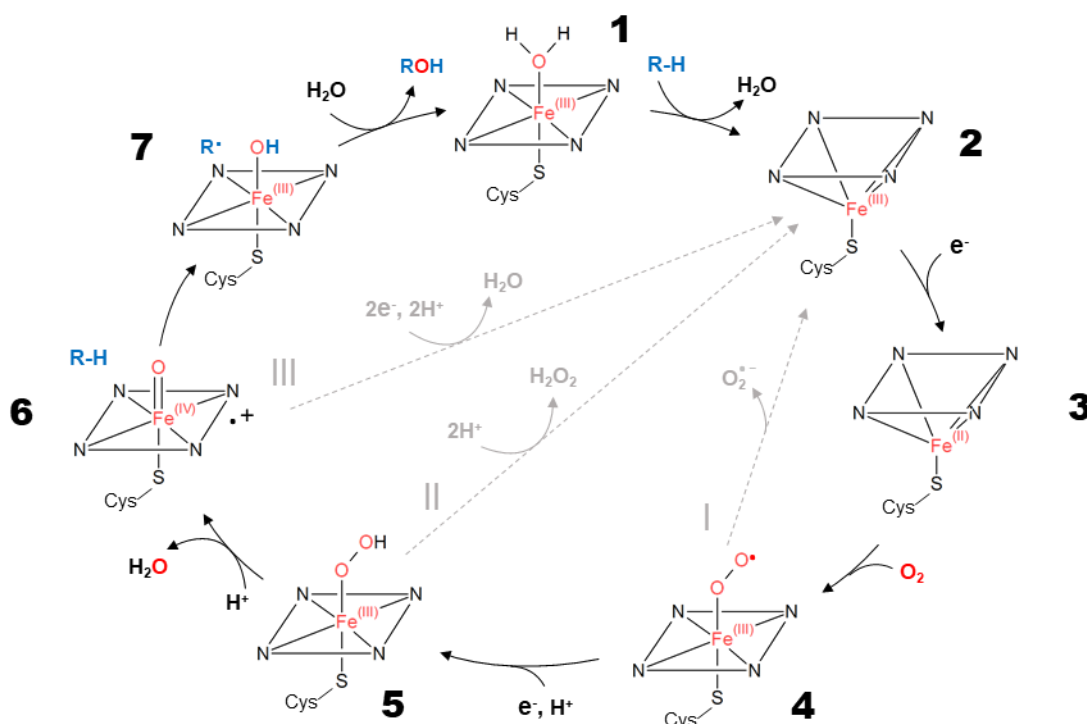


Abbildung 4: Katalytischer Zyklus von Cytochromen P450 zur Aktivierung von inerten C-H Verbindungen. Das Eisenion (rot) des Häms ist durch die vier Stickstoffatome zentral im Protoporphyrin IX angeordnet und über eine Thiolatgruppe mit dem Cysteinrückgrat des Cytochroms P450 verbunden. Als sechster Ligand liegt Wasser schwach gebunden am Eisenion vor. Die Verbindung durchläuft mehrere Reaktionsschritte und wird zu unterschiedlichen Sauerstoff- (rot) gebundenen Komplexen (4-7) umgesetzt, was zur Integration des molekularen Sauerstoffs in das Substrat R-H (blau) dient. I-III stellen mögliche Entkopplungsreaktionen dar, die den vollständigen Ablauf des katalytischen Zyklus unter Verlust des gebundenen Sauerstoffs unterbrechen (grau). Abbildung modifiziert nach Ener *et al.* and Hammerer *et al.* [71,72].

Die Bindung eines Substrates bewirkt eine Verdrängung des Wassermoleküls vom Hämeisen (Fe^{3+}) (1). Der nun fünffach-koodinierte Enzym-Substrat-Komplex (2) wechselt vom low-spin- in den high-spin-Zustand, was das Redoxpotential vermindert und die Reduktion des Fe^{3+} zu Fe^{2+} unter Bereitstellung eines Elektrons erleichtert wird (3). Dies führt zur anschließenden Bindung von Sauerstoff und resultiert somit in der Bildung des Sauerstoff-P450-Komplexes (4). Anschließend wird dieser durch das zweite Elektron und nachfolgender Protonierung zum Hydroperoxo- Fe^{3+} -Intermediat (5) oxidiert. Es folgt die zweite Protonierung des distalen Sauerstoffs, was in der Heterolyse der O-O-Bindung mündet und zur Bildung von Wasser und eines Ferryl-oxo- π -Kation Radikals (6) führt. Die anschließende Dissoziation des hydroxylierten Substrates vom aktiven Zentrum stellt den ursprünglichen Ruhezustand (1) wieder her, so dass der katalytische Zyklus von Neuem beginnen kann.

Unter physiologischen Bedingungen kommt es häufig zu sog. „Shunt-Pathways“, ausgelöst durch vorzeitige Dissoziationen der reaktiven Sauerstoffspezies vom Häm-Eisen. Solche Reaktionen führen zur Oxidation der Reduktionsäquivalente NAD(P)H, resultieren aber nicht im gewünschten Produkt aufgrund einer frühzeitigen Dissoziation des Substrates. Beispielsweise kommt es beim „Autoxidase Shunt“ (I) zur Freisetzung eines Superoxidanions $\text{O}_2^{\cdot-}$, wodurch der Komplex 4 zu Intermediat 2 zerfällt. Die am besten untersuchte Nebenreaktion ist der „Peroxid Shunt“ (II). Hierbei setzt das Hydroperoxo- Fe^{3+} -Intermediat (5) Sauerstoff frei, welches unter Aufnahme eines Protons zu Wasserstoffperoxid wird.

Dies führt ebenfalls zum Zerfall des Komplexes und zur Bildung von Verbindung 2. Beim „Oxidase Shunt“ (III) wird dagegen das Ferryl-oxo- π -Kation Radikal (6) unter Verbrauch von 2 NAD(P)H-Molekülen zu Verbindung 2 und Wasser reduziert [70].

Da die meisten P450 nicht befähigt sind, die zwei essentiellen Elektronen (siehe Verbindungen 2/3 und 4/5) direkt von den Reduktionsäquivalenten NAD(P)H zu abstrahieren, erfolgt dieser Schritt zumeist über spezielle Redoxproteine. Es sind bisher eine Vielzahl an Redoxsystemen bekannt, die in insgesamt zehn Klassen unterteilt sind. Bei Säugetieren sind lediglich Klasse 1 und 2 enthalten [73], wobei Klasse 1 zu den mitochondrialen Systemen zählt und aus drei separaten Redoxproteinen besteht. Diese beinhalten das lösliche Ferredoxin (Fdx), die membranassoziierte Ferredoxin Reduktase (FdR) und das membrangebundene P450. Hier erfolgt die Aufnahme der Elektronen von NADPH durch die FAD-Domäne der FdR, welche nachfolgend über das Eisen-Schwefelcluster [2Fe–2S] des Fdx zum Häm-Eisen des P450 transferiert werden [74]. Klasse 2 Redoxsysteme, welche überwiegend im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert sind, bestehen in ihrer einfachsten Form aus zwei membrangebundenen Proteinen, das P450 und die NADPH-P450-Reduktase (CPR). Letzteres enthält zwei prosthetische Gruppen, FAD und FMN welche die CPR befähigen, beide benötigte Elektronen von NADPH auf das P450 zu übertragen. Der N-Terminus der CPR weist eine hohe Sequenzhomologie zu Fdx auf, wohingegen der FAD-enhaltende C-Terminus den Fdx-NADP⁺-Reduktasen und NADH-Cytochrom *b*₅ Reduktasen homolog ist [75,76]. Ein alternativer Weg zur geschwindigkeitsbestimmenden Übertragung des zweiten Elektrons durch die CPR ist unter Beteiligung eines weiteren Proteins beschrieben. Diese kann durch Aktivität des Cytochroms *b*₅ (Cyt *b*₅) effizienter und schneller erfolgen, wodurch vermutlich der Zerfall des Sauerstoff-P450-Komplexes unter Bildung eines Superanion-Radikals verhindert werden kann [77]. Überdies wird Cyt *b*₅ eine Rolle als allosterischer Faktor des P450 [78] oder als Komponente zur Bildung eines stabilisierten Intermediats des Sauerstoff-P450-Komplexes zugeschrieben [79,80].

1.3.1.2 Biotechnologische Anwendung von P450

Insbesondere zur Durchführung von regio- und stereoselektiven Aktivierungen von C-H-Bindungen zeigt die Anwendung biokatalytischer Methoden mithilfe von P450 großes Potenzial. Hierzu kommen bakterielle, sowie rekombinant produzierte P450 zur Etablierung effizienter, biotechnologischer Prozesse zum Einsatz. Insbesondere eine rekombinante Expression von P450, welche im natürlichen Steroidstoffwechsel von Säugetieren beteiligt sind, zeigten in der Vergangenheit hocheffiziente Ansätze zur Entwicklung nachhaltiger Methoden in der Herstellung steroidaler Verbindungen. So konnte das Potenzial einiger *E. coli*-basierter Ganzzellsysteme, durch heterologe Expression der humanen CYP11B1 [26] und CYP21A2 [81] demonstriert werden. Insbesondere bei Letzterem zeigte der Wechsel zur bovinen Form industrielle Anwendbarkeit als Teilprozess zur effizienten Produktion des sGC Methylprednisolon [36]. Das mikrosomale **CYP21A2** ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und nimmt dort einen zentralen Stellenwert im Steroidmetabolismus ein. Es katalysiert die selektive Hydroxylierung der GC und MC-Vorläufer Progesteron und 17 α -Hydroxyprogesteron zu 11-Deoxycorticosteron und 11-Deoxycortisol (Abb. 2A). Darüber hinaus zeigt CYP21A2 C21-Hydroxylierungsaktivität gegenüber den sGC Medran und Deltamedran [35], und fungiert als potentieller Biokatalysator in der industriellen Methylprednisolonproduktion (Abb. 2B). Die

Hydroxylierung und somit Funktionalisierung dieser Verbindungen durch chemische Verfahren erfordert mehrere Reaktionsschritte, darunter die Integration von Schutzgruppen und die Bildung von toxischen Halogenverbindungen [82]. Die hierbei entstehenden Nebenprodukte erfordern aufwendige Trennverfahren, was die Effizienz der chemischen Synthese zusätzlich stark herabsetzt. Zur Vermeidung dieser Aspekte zeigte sich die Anwendung eines alternativen, biotechnologischen Verfahren als besonders geeignet. Zu diesem Zweck konnte ein *E. coli* Ganzzellsystem etabliert und optimiert werden, welches diese Reaktion durch Aktivität der rekombinanten bovinen CYP21A2 und des hefestämmigen Redoxsystems Arh/etp1^{fd} hochselektiv katalysiert [35,36].

Zur optimalen, heterologen Expression von P450 spielt die Wahl der Ganzzellsysteme eine bedeutende Rolle. Der Einsatz eukaryotischer Ganzzellsysteme ermöglicht die Expression von membranassoziierten P450 Systemen, jedoch zeigte die Anwendung von prokaryotischen Systemen oftmals vergleichbar höhere Produktausbeuten [26,27,83,84]. Als Alternative zum häufig genutzten *E. coli*-basierten Modellsystem erlangte auch das grampositive Bodenbakterium *B. megaterium* seit einigen Jahrzehnten zunehmende Einsatzfähigkeit bei unterschiedlichen biotechnologischen Prozessen. So erfolgte bereits der Einsatz zur Produktion von industriell relevanten Komponenten wie Vitamin B₁₂ [85], Penicillin G Acylase [86], α - und β -Amylase [87,88]. Neben einer hohen Proteinproduktionskapazität, Plasmidstabilität und einer 100-fachen Zellgröße im Vergleich zu *E. coli*, zeigte dieses Bakterium insbesondere zur Umsetzung hydrophober Substanzen großes Potenzial [89,90]. Eine weitere Besonderheit liegt darin, dass dieses Bakterium zusätzlich wirtseigene P450 produziert, welche ebenfalls katalytische Aktivität gegenüber Terpenen, Fettsäuren, Statinen, Steroiden und weiteren hydrophoben Substanzen aufweisen.

So zeigen Isoformen der CYP106-Familie aus *B. megaterium* 15 β - oder 7 β -Hydroxylierungsaktivität gegenüber einigen steroidal Verbindungen. Diese umfassen GC wie Prednisolon, Dexamethason, Cortison, Testosteron, Progesteron, Corticosteron und 11-Deoxycorticosteron [91,92] oder Pregnan-Verbindungen wie Pregnenolon, 17 α -Hydroxypregnenolon und DHEA [93]. Darüber hinaus zählen weitere komplexe Strukturen wie Di-, Tri- und Sesquiterpene wie etwa Abietin- [94] und 11-Keto-Boswelliasäure [95] [96] [97] zu ihrem Substratspektrum. Eine weitere besondere Rolle nimmt ein P450 der CYP109-Klasse aus *B. megaterium* in der Aktivierung von Vitamin D-Verbindungen durch selektive Hydroxylierungen am Secosteroidgerüst ein. Isoformen dieser P450-Klasse katalysieren neben der phylogenetisch eng verwandten CYP106-Familie den Hauptanteil der steroidal Umsatzreaktionen der *B. megaterium* P450 [98]. Insbesondere das dieser Klasse zugehörige, cytosolische **CYP109E1** ist befähigt, neben einigen Terpenen und Statinen [99], steroidale Verbindungen wie Testosteron [100] oder Cholesterol [101] selektiv zu hydroxylieren. Letzteres erfolgt in den Positionen C24 und C25, welche ebenfalls für VD₃ als Substrat beobachtet wurden [59]. Insbesondere zur C25-Hydroxylierung von VD und 1 α -(OH)VD stellt dieser Biokatalysator durch zukünftige Weiterentwicklung eine Möglichkeit zur biotechnologischen Herstellung biologisch aktiver Vitamin D-Präparate dar.

1.3.2 Oxidoreduktion von C-O Bindungen

Die Oxidation und Reduktion von Steroidverbindungen repräsentieren Teilschritte der natürlichen GC-Biosynthese und werden ebenfalls zur Biokatalyse und chemischen Synthese für die Modifikation

steroidaler Verbindungen angewandt. Unter physiologischen Bedingungen dient die Reduktion von Carbonylgruppen im Steroidgerüst vorwiegend zur Abnahme der Hydrophobizität der Substanzen. Dies erleichtert zum einen die renale Ausscheidung der Verbindungen, [102] zum anderen kann deren Affinität zu Plasmaproteinen erhöht werden, welche für den Steroidtransport über den Blutkreislauf verantwortlich sind [103]. Im Gegensatz dazu führt eine Oxidation hydrophiler Gruppen im GC-Molekül in einigen Fällen zu einer verringerten Rezeptoraktivierung. Dieser Mechanismus dient dem physiologischen Schutz vor einer Rezeptor-Überaktivierung in Geweben mit hoher GC-Produktion wie etwa in Ovarien, Hoden und Plazenta [104]. Die gesteigerte Hydrophobizität der Verbindungen bewirkt zudem eine erleichterte Diffusion über zelluläre Membranen und Zugänglichkeit zu intrazellulären Steroidrezeptoren, was zur Modulierung der Bioverfügbarkeit von steroidalen Wirkstoffen von großer Bedeutung ist [105].

1.3.2.1 Short-chain Dehydrogenase/Reduktase (SDR)-Superfamilie

Bei den katalysierenden Proteinen handelt sich fast ausschließlich um Mitglieder der SDR-Superfamilie, deren mehr als 3000 Mitglieder eine relativ geringe Primärsequenz Homologie von 10–30% zueinander aufweisen [106]. Lediglich wenige Aminosäurereste und Proteinstrukturen sind konserviert [107], welche für die Transformation von Alkoholen/Ketonen und Bindung der beteiligten Cofaktoren zuständig sind. So bildet die N-terminale Rossmann-Faltung den Bereich zur Dinukleotid-Cofaktorbindung. Hierbei sind spezielle basische/saure Aminosäurereste am Ende des C-terminus des zweiten β -Strangs entscheidend. Ausschließlich NAD(P)(H)-selektive Enzyme tragen zwei basische Aminosäurereste (Arginin oder Lysin), da diese spezifisch an das 2'-Phosphat des Cofaktors binden [108]. Die Struktur des substratbindenden Bereichs hingegen variiert, abhängig von der SDR-Unterart, enthält jedoch stets vier Aminosäuren Asparagin, Serin, Tyrosin, Lysin (Asn-Ser-Tyr-Lys), welche zusammen die „katalytische Tetrade“ bilden (Abb. 5). Diese dient als Proton-Übertragungssystem und ist entscheidend im Reaktionsmechanismus der SDR-Proteine beteiligt (Abb. 5) [109]. Das Reaktionsspektrum klassischer SDR umfasst Reduktionen von C=C und C=N Doppelbindungen, sowie Dehalogenierung, Isomerisierung, Dehydratisierung und Decarboxylierung [107,110]. Der Großteil entspricht jedoch NAD(P)(H)-abhängigen Oxidoreduktionen von Hydroxyl- oder Carbonylgruppen kleiner Moleküle wie Alkohole, Ketone, Polyole, Xenobiotika oder Steroide [107]. Dieser Reaktionsmechanismus erfolgt über eine Stabilisierung der Substrat-Carbonyl- bzw. -Hydroxylgruppe durch das Serin und Tyrosin im aktiven Zentrum [111]. Wie am Beispiel der Oxidation von Hydrocortison gezeigt, findet innerhalb des aktiven Zentrums die Übertragung eines Protons der Substrat-Hydroxylgruppe auf das reaktive Sauerstoff-Atom des Tyrosinrestes statt (Abb. 5). Tyrosin dient hierbei als Säure/Base Katalysator und ist Teil der katalytischen Tetrade. Das überschüssige Wasserstoffatom der Substrat-Carbonylgruppe wird auf das Pyridin des NADP⁺ übertragen, was zur intermolekularen Umlagerung der Elektronen im Pyridinring und Bildung des Cofaktors NADPH führt. Eine abschließende Regeneration von Tyrosin erfolgt hierbei durch die Beteiligung von Asparagin, Lysin, des Lösemittels und der 2'-OH Gruppe der Ribose des oxidierten Cofaktors NADP⁺ [109,112]. Dagegen verläuft die Reduktion der Carbonylgruppe im Cortisonmolekül analog in umgekehrter Reihenfolge und Richtung unter Anwesenheit von NADPH.

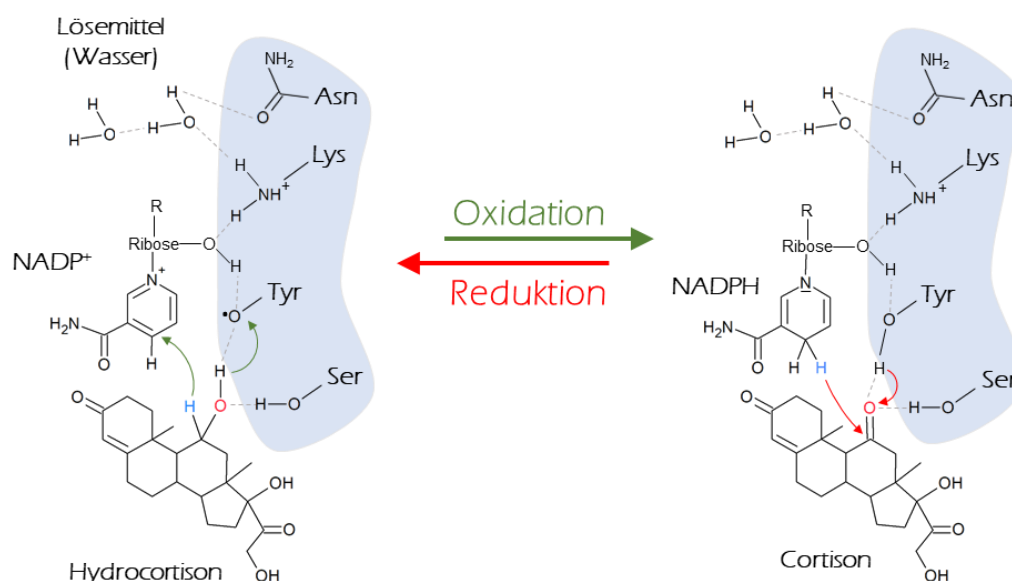


Abbildung 5: Reaktionsmechanismus der SDR-Familie zur Oxidoreduktion von Cortison und Hydrocortison. Zur Oxidation der Hydroxylgruppe des Hydrocortisons (grüne Pfeile) erfolgen mehrere Umlagerungen unter Beteiligung von NADP⁺ und der katalytischen Tetrade Asn-Lys-Tyr-Ser (blau) im aktiven Zentrum der SDR Proteine. Die Umkehrreaktion (Reduktion; rote Pfeile) erfolgt revers analog unter Beteiligung von NADPH.

Proteine der SDR-Familie finden in zahlreichen biotechnologischen Bereichen zur Steroidmodifikation Anwendung, unter anderem bei der 20β-Hydroxylierung diverser Steroide [113] oder bei der Δ¹-Dehydrogenierung von Hydrocortison zur Herstellung des zentralen sGC Prednisolon [114–121]. Ebenso nehmen sie eine wichtige Rolle als NAD(P)(H)-Regenerationssysteme in Cofaktor-abhängigen Reaktionen ein. Diese katalysieren zeitgleich zur Zielreaktion eine gegenläufige Oxidoreduktion und somit eine erneute Bereitstellung des benötigten Cofaktors. Mit dieser Methode können in vielen Fällen signifikante Mengen der teuren Nukleotid-Cofaktoren NAD(P)H und NAD(P)⁺ eingespart werden bei einer zeitgleich gesteigerten, katalytischen Effizienz. Dafür kommen hauptsächlich Alkohol Dehydrogenasen (ADHs, E.C. 1.1.1) zum Einsatz, eine Unterart der SDR-Superfamilie. Ein prominentes Beispiel repräsentiert die NADP(H)-abhängige *LbADH* aus *Lactobacillus brevis*, welche eine besonders hohe Lösemitteltoleranz und ein breites Substratspektrum an Ketonen und Alkoholen aufweist und daher als wichtiges Werkzeug in der Biotechnologie fungiert [122].

1.3.2.2 11β - Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 (11βHSD1)

Ein für diese Arbeit relevantes Mitglied der SDR-Familie ist die Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 (11βHSD1). Dieses Enzym ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) von Säugetieren lokalisiert und katalysiert die NAD(P)(H)-abhängige Oxidoreduktion von Hydrocortison und Cortison über die ER-Membran [123]. Es handelt sich demnach um ein bidirektionales Enzym, dessen Reaktionsrichtung vom Redoxzustand der beteiligten Cofaktoren abhängig ist [124]. Unter physiologischen Bedingungen ist in den meisten Zellarten die Reduktion von Cortison begünstigt, da dieses im Vergleich zu Hydrocortison eine höhere Affinität zum Enzym aufweist und außerdem im ER ein hohes NADPH/NADP⁺ Verhältnis vorliegt. Dieses wird durch die ebenfalls im ER befindliche Hexose-6-Phosphat Dehydrogenase (H6PDH) aufrecht erhalten, welche die Regeneration von NADPH unter Verbrauch von Glucose katalysiert [125–127]. Eine umgekehrte Reaktionsrichtung, also die Oxidation

von Hydrocortison, kann zumeist in Präadipozyten beobachtet werden, in denen keine H6PDH vorhanden ist [124]. 11 β HSD1 besitzt ein breites Substratspektrum und kann neben Cortison und Hydrocortison unterschiedliche weitere Verbindungen umsetzen. Zum einen weist es eine dem Cortison/Hydrocortison homologe Aktivität gegenüber weiteren GC wie Corticosteron, 11-Dehydrocorticosteron und Prednison auf [128]. Zum anderen zeigt es Interkonversionsaktivität gegenüber unterschiedlichen 7-Hydroxy/7-Ketosterolen wie 7-Hydroxy/7-Keto-dehydroepiandrosterone, 7-Hydroxy/7-Keto-Pregnenolon [129] und 7-Hydroxy/7-Keto-Cholesterol [130]. Darüber hinaus wurde eine Aktivität zur Epimerisierung zwischen 7 α - und 7 β -Steroiden über die Bildung eines 7-Oxo-Intermediats [131–133] beobachtet, sowie eine Aktivität gegenüber Gallensäuren [134] und einigen Xenobiotika [135–137]. Strukturell betrachtet besitzt 11 β HSD1 eine einzelne Transmembrandomäne am N-Terminus, welche die ER-Membran komplett durchspannt und mit einer kurzen N-terminalen Region in das Cytosol hineinragt. Die katalytische Domäne hingegen befindet sich im ER Lumen [123,138]. Der C-Terminus bildet eine hydrophobe Oberfläche [139,140] welche Interaktionen zwischen 11 β HSD1-Monomeren, sowie mit Phospholipiden der ER-Membran ermöglicht. Außerdem unterstützt er die kontrollierte Führung des Substrates über die Membran und erleichtert dessen Zutritt zum aktiven Zentrum [139]. Aufgrund fehlenden ER-assoziierten Membranstrukturen in prokaryotischen Zellen führt die rekombinante Expression des wildtypischen 11 β HSD1 zu inaktiven Aggregaten im bakteriellen Cytosol [141,142]. Durch die Entfernung des N-terminalen Sequenzabschnitts gelang es Walker *et al.* erstmals, die humane 11 β HSD1 in *E. coli* zu exprimieren. Zudem wurde beschrieben, dass das Fehlen von eukaryotischen Glykosylierungen, von intermolekularen Disulfidbrücken und des Membranankers nicht essentiell zur katalytischen Aktivität des Enzyms beitragen [141]. Im Vergleich zur humanen Variante wurde gezeigt, dass die N-terminal verkürzte 11 β HSD1-Variante aus *Cavia porcellus* (*C. porcellus*) eine erhöhte Löslichkeit im rekombinanten System aufweist [143]. Durch die Verkürzung und Modulierung der C-terminalen Sequenz konnte diese zusätzlich gesteigert werden [143,144]. Diese Modifikationen trugen wesentlich zur Entwicklung eines biotechnologisch nutzbaren Ganzzellsystems bei, welches die Reduktion von Cortison zu Hydrocortison im g^{*}L⁻¹-Bereich durch die Coexpression eines NADPH-Regenerationssystems ermöglichte [144].

1.3.3 Veresterung von C-OH Bindungen

Die Veresterung von Hydroxylgruppen mit kurzkettigen Carbonsäuren im Steroidgerüst repräsentiert eine weitere Möglichkeit zur Modifikation von GC, welche die Herstellung pharmazeutisch relevanter Verbindungen ermöglicht. Steroidester können aufgrund ihrer erhöhten Hydrophobizität und erforderlichen Metabolisierung nach externer Aufnahme in Form von Resorptionsestern, Depotsteroiden oder sogenannten „Prodrugs“ vielseitig im pharmazeutischen Bereich eingesetzt werden [145]. Darüber hinaus kann diese Art der Modifikation als Werkzeug in der industriellen Synthese von GC und anderen komplexen Verbindungen genutzt werden. Carbonsäureester dienen in einigen chemischen Verfahren als klassische Schutzgruppen, welche die Oxidation von reaktiven Hydroxylgruppen wie etwa im Steroidgerüst verhindern können [146]. Darüber hinaus kann das chemische Gleichgewicht von Hydroxylierungsreaktionen durch Derivatisierung des Produktes in Richtung der Produktseite verschoben werden, eine Strategie, welche die Produktausbeute in

biokatalytischen Verfahren maßgeblich erhöhen kann [20]. Zu deren chemischer Synthese kommen jedoch häufig umweltschädigende Reagenzien wie Säurechloride, Anhydride oder Pyridin und extreme pH-Bedingungen zum Einsatz. Darüber hinaus sind diese Reaktionen stark abhängig von molaren Verhältnissen der Reagenzien, da diese die Selektivität und Nebenproduktbildung erheblich beeinflussen [147,148].

Um diese Reaktion in empfindliche, biotechnologische Prozesse integrieren zu können und gleichzeitig deren Umwelteinfluss gering zu halten, bedarf es Methoden, die unter moderaten Reaktionsbedingungen durchgeführt werden können. Als umweltschonende Alternative zur chemischen Produktion von Steroidester wurden bereits einige biotechnologische Ansätze beschrieben, welche durch die Anwendung von mikrobiell produzierten Hydrolasen durchgeführt wurden. Bei den beschriebenen Reaktionen konnten bisher ausschließlich die Veresterungen der 20-, 22-, 25-, 26-, 3- und 17-Hydroxylgruppen nachgewiesen werden [149,150]. Dagegen fand bei bisherigen Berichten über mikrobielle C21-Veresterungen von Steroidverbindungen, bis auf folgend beschriebene Ausnahme, keine Zuordnung zu spezifischen Enzymen statt [151–153].

1.3.3.1 Chloramphenicol Acetyl Transferase 1 (CAT1)

Durch die katalytische Aktivität der Chloramphenicol Acetyl Transferase 1 (CAT1) konnte kürzlich eine selektive und effiziente C21-Veresterung von Steroiden demonstriert werden [154]. Bei diesem Enzym handelt es sich um ein Mitglied der Transferasen, das in vielen Bakterien eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol (CAM) vermittelt und zu diesem Zweck häufig zu molekularbiologischen Zwecken genutzt wird [155]. Die Inaktivierung von CAM erfolgt durch die CAT1-vermittelte Übertragung der Acetylgruppe des Cofaktors AcetylCoA und der Veresterung mit einer der Hydroxylgruppen des CAM-Moleküls (Abb. 6A). Diese Modifikation verhindert die Bindung von CAM an die 50S-Untereinheit des Ribosoms und macht es somit unwirksam. Es wird vermutet, dass der Reaktionsmechanismus des C21-hydroxylierten Steroids analog zu dem des CAM als Substrat abläuft. [154]. Im Detail erfolgt die Veresterung am Beispiel des Cortisons durch eine Deprotonierung der C21-Hydroxylgruppe und die Übertragung des zugehörigen Protons auf das Imidazol, welches als Teil des Histidin-195 im aktiven Zentrum von CAT1 als katalytische Base agiert. Anschließend erfolgt ein nukleophiler Angriff des verbleibenden Sauerstoffanions der Steroidverbindung auf die C2-Carbonylgruppe des AcetylCoAs. Es entsteht ein tetraedrisch angeordnetes Intermediat, wobei das Sauerstoffatom des AcetylCoAs und des Serin-148 in CAT1 an dasselbe Wasserstoffatom gebunden sind. Schließlich kommt es zum spontanen Zerfall dieses Intermediats, woraus die Produkte Cortisonacetat und HS-CoA hervorgehen (Abb. 6B) [156,157]. Es zeigte sich, dass durch CAT1 einige natürliche sowie synthetische Glucocorticoide (u.a. Hydrocortison, 11-Deoxycortisol und Prednisolon) *in vitro* sowie im *E. coli* Ganzzellsystem selektiv acetyliert werden konnten [154].

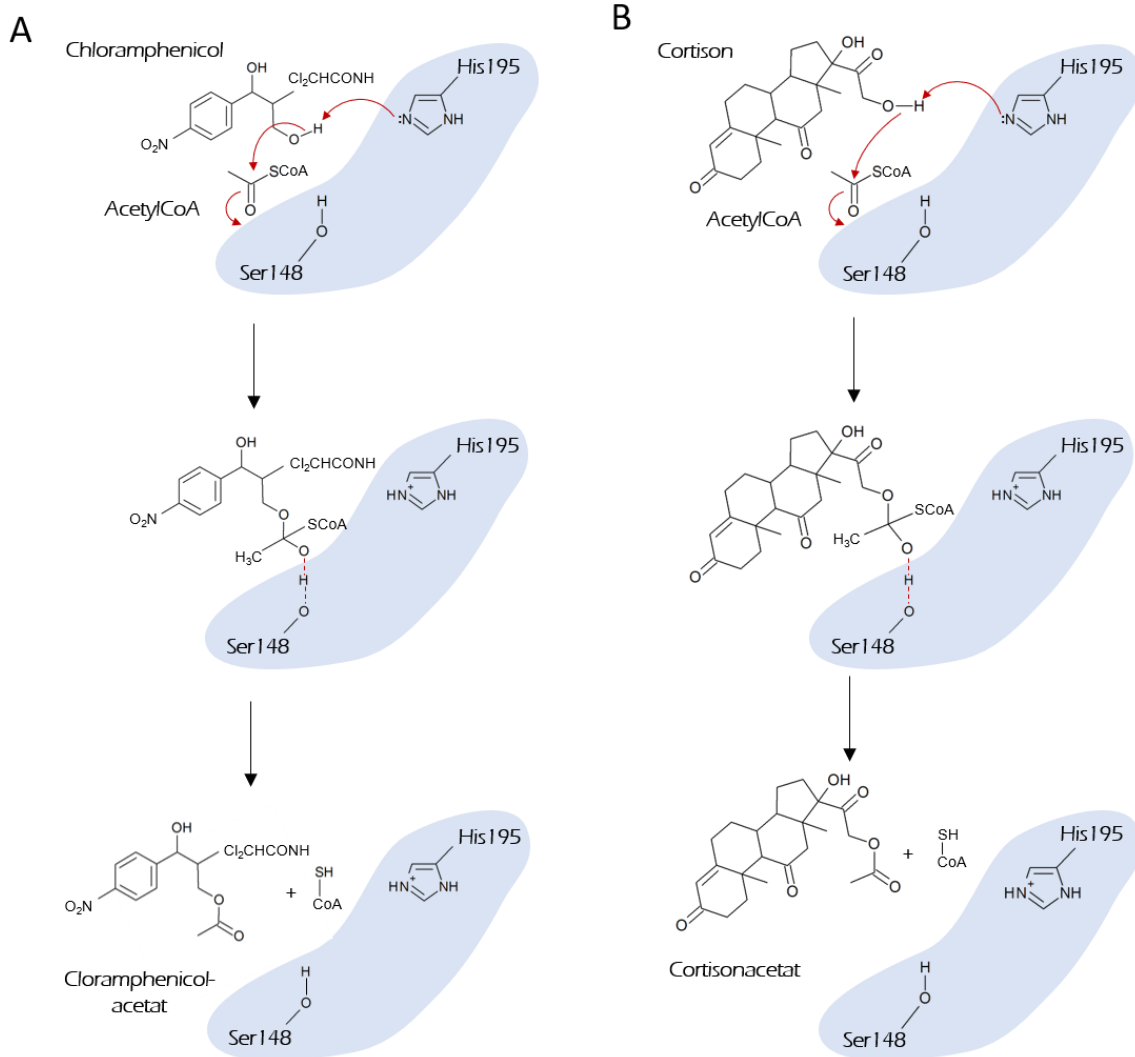


Abbildung 6: Reaktionsmechanismus der CAT1. A: Acetylierung von Chloramphenicol im katalytischen Zentrum von CAT1 unter Beteiligung von AcetylCoA. Es erfolgt eine Übertragung eines Protons von einer Hydroxylgruppe des Chloramphenicols auf das Imidazol im Histidin-195 (His195). Anschließend folgt ein nukleophiler Angriff auf die Carbonylgruppe des AcetylCoA (rote Pfeile). Der Zerfall des Intermediats resultiert im acetylierten Produkt und HS-CoA. B: Analog zu Reaktionsmechanismus in A erfolgt die Acetylierung der C21-Hydroxylgruppe des Cortisons.

1.4 Limitierungen von Ganzzellsystemen zur Steroidsynthese

Die in dieser Arbeit dargestellten Reaktionsmechanismen repräsentieren die vorherrschenden Modifikationswege der natürlichen Glucocorticoid- und Secosteroidbiosynthese. Darüber hinaus zeigten einige Beispiele, dass die genannten Biokatalysatoren auch zur Umsetzung von synthetischen und somit oftmals zu pharmazeutisch wirksameren Verbindungen fähig sind [35,128,154,158]. Der biotechnologische Einsatz dieser Enzyme bietet großes Potenzial, die ökologische Nachhaltigkeit der industriellen Produktion dieser Wirkstoffe, im Vergleich zu chemischen Methoden, deutlich zu steigern [159,160]. Insbesondere mikrobielle Ganzzellsysteme bewiesen in der Vergangenheit große Eignung zur nachhaltigen Synthese von Steroiden und anderen komplexen Verbindungen [161]. Gezielte Optimierungen ermöglichen hierbei effizientere Katalysen der gewünschten Reaktionen unter gleichzeitiger Reduktion benötigter Rohstoffe, des Energieaufwands und der Reaktionsschritte. In den

folgenden Kapiteln werden Prozesse zur Optimierung von Ganzzellkatalysen in den ersten Phasen der Entwicklung dargestellt.

Hierbei ist zunächst die Charakterisierung geeigneter Enzyme und die Identifizierung ihrer Substrat- und Produktspektren von großer Wichtigkeit (siehe Charakterisierung und Vitamin D Synthese durch CYP109E1 [59,100]). Aufgrund der hohen Komplexität lebender Systeme ergeben sich während der Optimierung von Ganzzellkatalysen allerdings besondere Herausforderungen für die Synthese von Produkten in großer Menge und Reinheit. Ein unselektives Substrat- und Produktspektrum ist zwar hilfreich bei der Ermittlung neuer Synthesewege, jedoch müssen bei Letzterem unerwünschte Nebenprodukte für industrielle Anwendungen aufwendig entfernt werden. Zudem erfolgt die Bildung von Nebenprodukten zumeist auf Kosten der Produktausbeute (siehe Hydrocortisonoxidation durch CYP106A2 [91]). Desweiteren beeinflussen das gewählte Expressionssystem und die Expressionsbedingungen die Produktionsdynamik der rekombinanten Proteine. Eine überhöhte Produktionsmenge und -geschwindigkeit kann daher zu einer Fehlfaltung der Proteine und Bildung inaktiver Aggregate im Cytosol des Expressionswirtes führen. Dagegen kann durch die Aktivität schwacher Promotoren eine herabgesetzte Genexpression erfolgen, die im Ganzzellsystem, aufgrund verlangsamer Katalyse in geringen Produktausbeuten resultiert (siehe Steroidacetylierung, [162]).

Für viele Reaktionen ist die Konzentration der erforderlichen Cofaktoren wie NAD(P)H maßgeblich für die Effizienz entscheidend. Aufgrund der hohen Kosten dieser Verbindungen (NADPH 1330 €/g; NADP⁺ 434 €/g [Merck]) ist die externe Zugabe in stöchiometrischen wie auch katalytischen Mengen unökonomisch für eine industrielle Anwendung (siehe Hydrocortisonsynthese mittels 11 β HSD1, [144]). Insbesondere bei P450-katalysierten Reaktionen übernimmt zusätzlich die Effizienz der Elektronenübertragung von Reduktionsäquivalenten auf das P450 eine wichtige Rolle, welche durch die Löslichkeit und die molaren Verhältnissen der jeweiligen Redoxproteine zueinander beeinflusst wird (siehe Medranhydroxylierung durch CYP21A2 [36]).

1.5 Ziel der Arbeit

Das übergreifende Ziel dieser Arbeit besteht in der Etablierung und Optimierung von Ganzzellsystemen zur nachhaltigen Produktion von steroidalen Pharmazeutika. In diesem Zusammenhang sollen geeignete biotechnologische Strategien zum Zwecke der verbesserten regio- und stereoselektiven Modifikation der Ausgangsverbindungen entwickelt oder optimiert werden. Dies verfolgt einerseits das Ziel, eine erhöhte Wirtschaftlichkeit durch gesteigerte Produktselektivität und -ausbeute zu erreichen. Zum anderen stellen die dargestellten biotechnologischen Synthesen eine umweltschonendere Alternative zu entsprechenden chemischen Prozessen dar.

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Optimierung rekombinanter Ganzzellsysteme zur Synthese metabolisch aktiver Glucocorticoidverbindungen. In diesem Zusammenhang sollen bestehende Verfahren zur verbesserten Anwendbarkeit in industriellen Prozessen optimiert werden. Dies umfasst zum einen die Oxidation von Hydrocortison zu Cortison, welches als Modellsynthese zur Oxidation von C11-Hydroxylierten Steroidverbindungen und zur Demonstration der Anwendbarkeit von Ganzzellsystemen dient. Abschließend soll diese Reaktion zusätzlich im Hinblick auf ökologische Nachhaltigkeit beurteilt und einem vergleichbaren chemischen Prozess gegenübergestellt werden. Zum anderen soll ein bereits industriell angewendeter biotechnologischer Teilschritt zur Synthese von Methylprednisolon optimiert werden. Diesbezüglich soll zusätzlich eine Derivatisierung des Produktes Predmedrol erfolgen, um das Reaktionsgleichgewicht in Produktrichtung zu verschieben und eine mögliche Produktinhibierung zu minimieren. Dies ist durch ein weiteres Ganzzellsystem zur Steroidacetylierung zu ermöglichen, welche die simultane Derivatisierung in einer Mischkultur katalysiert.

Der zweite Teil der Arbeit umfasst die Erschließung eines neuen biotechnologischen Verfahrens zur selektiven Hydroxylierung von Vitamin D₂. Diese Reaktion erfolgte bislang ausschließlich mithilfe von synthetischen, umweltbelastenden Prozessen mit geringer Produktausbeute. Ein biotechnologischer Ansatz könnte eine ökologisch nachhaltige Alternative hervorbringen, welche neben einer hohen Produktselektivität eine gesteigerte Ausbeute aufweist. Hierzu dient das CYP109E1 aus *B. megaterium*, welches bereits 25-Hydroxylierungsaktivität gegenüber den strukturverwandten Verbindungen Cholesterol und Vitamin D₃ Metaboliten aufwies.

2. Wissenschaftliche Publikationen

Die erhaltenen Ergebnisse dieser Arbeit wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

2.1 Lisa König et al. (2019)

High-yield C11-oxidation of hydrocortisone by establishment of an efficient whole-cell system in *Bacillus megaterium*

Lisa König, Philip Hartz, Rita Bernhardt, Frank Hannemann

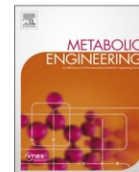
Metabolic Engineering, 2019;55:59-67. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.06.005>

Reprinted with the permission of Elsevier.



Contents lists available at ScienceDirect

Metabolic Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meteng

High-yield C11-oxidation of hydrocortisone by establishment of an efficient whole-cell system in *Bacillus megaterium*



Lisa König, Philip Hartz, Rita Bernhardt, Frank Hannemann*

Department of Biochemistry, Campus B2.2, 66123, Saarland University, Saarbrücken, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Bacillus megaterium
11 β -hydroxysteroid dehydrogenase
Biotransformation
Recombinant protein expression
Cell factories
Cortisone
Hydrocortisone
11 β -dehydrogenation

ABSTRACT

Steroidal compounds are one of the most widely marketed pharmaceutical products. Chemical synthesis of steroidal compounds faces many challenges, including the requirement for multiple chemical steps, low yield and selectivity in several synthesis steps, low profitability and the production of environmental pollutants. Consequently, in recent decades there has been growing interest in the use of microbial systems to produce pharmaceutical compounds. Several microbial systems have recently been developed for the microbial synthesis of the glucocorticoid hydrocortisone, which serves as a key intermediate in the production of several other pharmaceutically important steroidal compounds.

In this study, we sought to establish an efficient, microbial-based system, for the conversion of hydrocortisone into cortisone. To this end, we developed a strategy for high-yield cortisone production based on ectopic expression of the guinea-pig 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) in *Bacillus megaterium*. We screened different constructs, containing a variety of promoters tailored for *B. megaterium*, and created modified versions of the enzyme by protein engineering to optimize cortisone yield. Furthermore, we utilized co-expression of an alcohol dehydrogenase to promote NADP⁺ regeneration, which significantly improved 11 β -HSD1 activity.

The process thereby developed was found to show a remarkably high regioselectivity of > 95% and to generate cortisone yields of up to 13.65 g L⁻¹ d⁻¹, which represents a ~1000-fold improvement over the next-best reported system. In summary, we demonstrate the utility of *B. megaterium* MS941 as a suitable host for recombinant protein production and its high potential for industrial steroid production.

1. Introduction

The synthesis of steroidal drugs represents one of the most important fields in the pharmaceutical industry. Since the first report of a successful total synthesis of the sex hormone equilenin in 1939, remarkable progress has been made (Bachmann and Cole, 1939). However, obtaining a satisfactory reaction performance that results in high product titers and selectivity in all stages of the reaction remains an envisaged goal (Donova and Egorova, 2012). Due to numerous complex reaction steps, the application of synthetic chemistry for the catalysis of steroid producing reactions is challenging, for example in terms of cost-efficiency and performance under demanding and harsh conditions. Particular problematic are limitations in regio- and stereoselectivity, and the use of toxic reagents, which often results in decreased profitability and ecologically unsustainable productions (Hollmann et al.,

2011). In contrast, biotechnological processes, especially the implementation of whole-cells to perform multi-step reactions for steroid modification, offer numerous advantages, including (i) cheap production of active enzymes, with increased stability provided by the protective cellular environment, (ii) the possibility for simultaneous, and therefore economic, co-factor regeneration and (iii) the ability for sustainable and selective production resulting in steroidal compounds of high purity, using organic and non-toxic media (Nikolova and Ward, 1993; Schmid et al., 2001). The shift from conventional towards biotechnological bioprocesses for manufacturing fine chemicals has thus been a focus of growing interest in the pharmaceutical industry. This is particularly true for carbon–hydrogen bond functionalization reactions, which are frequently replaced by enzymatic or microbial processes to produce commercially valuable compounds (Lednicer, 2011; Ortiz de Montellano, 2010).

Abbreviations: 11 β -HSD1, 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase; FabG, 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase; KPi, potassium phosphate buffer; LB, lysogenic broth; LbADH, *Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase; RP-HPLC, reverse phase high performance liquid chromatography; TB, terrific broth; WCW, wet cell weight

* Corresponding author. Department of Biochemistry, Saarland University, Campus B 2.2, 66123, Saarbrücken, Germany.

E-mail address: f.hannemann@mx.uni-saarland.de (F. Hannemann).

<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.06.005>

Received 6 February 2019; Received in revised form 31 May 2019; Accepted 14 June 2019

Available online 15 June 2019

1096-7176/© 2019 International Metabolic Engineering Society. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

One prominent example is the integration of a functional group at position C11 of steroids. Such a modification significantly affects steroid polarity, toxicity and bioreactivity (Funder, 2010). To date, only a few microbial systems have been established that enable the formation of industrially and pharmaceutically-relevant 11 β -hydroxylated steroidal compounds: all of these are based on the activity of cytochromes P450 (Bernhardt and Urlacher, 2014; Bureik and Bernhardt, 2007). For example, Suzuki et al. utilized purified P450_{lum} of *C. lunata* to convert a range of 11-deoxy steroids into their 11 β -hydroxylated derivatives (Suzuki et al., 1993) and Schiffer et al. demonstrated the efficient 11 β -hydroxylation of 11-deoxycortisol, utilizing a modified human CYP11B1 heterologous expressed in *E. coli* (Schiffer et al., 2015). Remarkably, Szczebara and co-workers recently established the total production of hydrocortisone in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain, using glucose or ethanol as simple raw materials, by co-expression of the relevant natural steroid biosynthetic enzymes (Szczebara et al., 2003).

To complement the systems described above, we have established a high-yield, cell-based system, for the selective downstream-processing of C11-hydroxylated steroids to yield further compounds of high pharmaceutical interest. Specifically, oxidation of the steroidal 11 β -hydroxy group allows for the generation of related 11-keto derivatives, as exemplified in this study by the efficient production of the biotechnologically relevant metabolite cortisone from hydrocortisone. This type of reaction represents an important link to connect different biocatalytic approaches and to enhance their versatility and product range.

To date, the most common multi-step production of cortisone, known as “UpJohn synthesis” (Peterson and Murray, 1952), involves a 10-step synthesis based on progesterone as the initial compound. Due to the complex and non-profitable performance of asymmetric β -hydroxylation and thus, functionalization of progesterone at position C11 by chemical methods, this step has been conducted using biocatalysis in *Rhizopus nigricans*. This process represents one of the first applications of microbial systems in commercial high-yield steroid production. For almost 40 years, no alternative approach was available until recently, when Kiss and co-workers developed a microbial whole-cell based system for the C11-oxidation of hydrocortisone to yield cortisone. For this purpose, *Bacillus megaterium* MS941 was engineered to over-produce its endogenous cytochrome P450, CYP106A1 (Kiss et al., 2015). Nonetheless, this system suffers from low product yield, and poor selectivity in hydrocortisone oxidation, which makes it a non-competitive system compared to the previously available semi-biotechnological process. To date, no further progress has been made that would enable a commercially viable, industrial scale, biotechnological production of cortisone. For this purpose, we utilized *B. megaterium* MS941 for heterologous production of an alternative enzyme, capable to perform C11-oxidation of hydrocortisone.

The application of this gram positive expression host is reasonable due to the lack of endotoxin production. This is advantageous,

especially for applications in food and pharmaceutical industry, since these compounds harbor severe health risks for human, if they are not completely removed (Liebers et al., 2006). Importantly, *B. megaterium* shows high protein production capacity, plasmid stability and is used in industrial applications for a few decades (de Carvalho, 2017; Korneli et al., 2013). Furthermore, the complete genomes of the biotechnologically important *B. megaterium* strains MS941 and QM B1551 have already been sequenced in 2011 (Eppinger et al., 2011). Very recently, this data has been exploited for the conduction of metabolomic engineering (Biedendieck et al., 2017; Korneli et al., 2013, 2012) and for the identification of new functional promoters in this host, in order to enhance the *B. megaterium* expression system (Hartz et al., 2019).

In this study, we report on the development of an efficient whole-cell system in *B. megaterium* MS941, based on the expression of a modified guinea pig (*Cavia porcellus*) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11 β -HSD1). By optimization of enzyme expression and culture conditions we were able to increase cortisone yields more than 1000-fold compared to the next best biotechnological based conversion system (Kiss et al., 2015), whilst maintaining high product purity. Our study thus paves the way for a commercially viable, biotechnological production of C11-oxydized steroidal compounds and further downstream-processing of the generated substances.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and enzymes

Cortisone and hydrocortisone were obtained from Sigma-Aldrich in highest purity available. Restriction enzymes were obtained from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) and Fast-Link™ Ligase was purchased from Lucigen Corporation. The PCRs were performed with Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase and dNTPs, both obtained from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Further chemicals and reagents were purchased from standard resources.

2.2. Bacterial strains and cultivation

Plasmid construction was conducted using *E. coli* Top10F⁺ (F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG). For experiments including gene expression and whole-cell conversion recombinant *B. megaterium* MS941 was used. This mutant strain is a derivative of DSM319, lacking the major extracellular protease gene nprM (Wittchen and Meinhardt, 1995). Protoplasts of the strain were transformed with the described plasmids (Fig. 1) by polyethylene glycol-mediated method (Chang and Cohen, 1979). As control, *B. megaterium* MS941 was used containing an empty pSMF2.1 vector (Bleif et al., 2012) for verification that the bioconversion of hydrocortisone is catalyzed solely by the recombinant 11 β -HSD1 enzyme. The strain MS941 containing

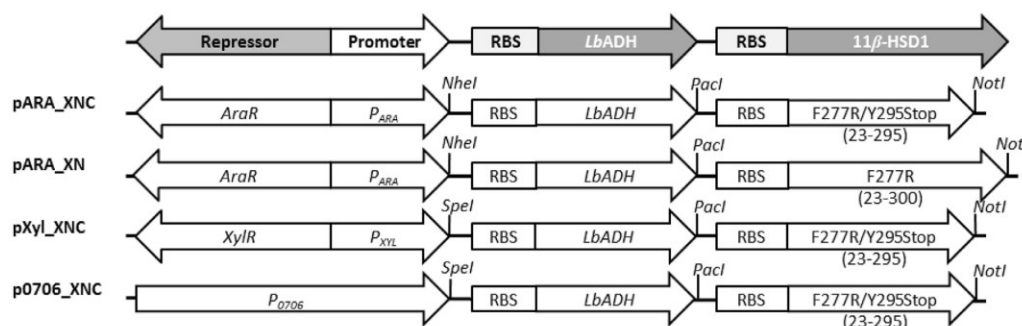


Fig. 1. Vector maps containing genes for the alcohol dehydrogenase of *Lactobacillus brevis* (LbADH) and the modified codon-optimized guinea pig 11 β -HSD1 gene sequences (11 β -HSD1) adapted to *B. megaterium*.

the empty vector did not catalyze the desired reaction (data not shown), demonstrating that the overexpressed enzymes are responsible for catalytic activity.

2.3. Plasmid construction

The sequence of the guinea pig 11 β -HSD1 gene (PDB code: 1XSE) was codon-optimized to the *B. megaterium* genome utilizing the online tool Jcat (<http://www.jcat.de>) and synthesized by GeneArt AG (Regensburg, Germany). The vector pBTacLbADH was used as template for cloning of the *Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase (LbADH) gene to enable NADP⁺ regeneration during conversion experiments. This vector was kindly provided by Dr. Lütz (Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich). The genes were amplified via PCR and all of the resulting products contain their own RBS and *NheI* or *SpeI*/*PacI* and *PacI*/*NotI* restriction sites. The codon-optimized guinea pig 11 β -HSD1 sequences contain the mutation F255R and are N-terminally truncated (24–300; XN; F255R). Furthermore, an N- and C-terminal truncated version of the insert (24–273; XNC; F255R/274Stop) was generated by PCR. The genes were cloned into the basic shuttle vector pSMF2.1 constructing different derivatives comprising the promoters P₀₇₀₆, P_{ARA} and P_{XYL}. Relevant sections of the constructed vectors are depicted schematically in Fig. 1. All utilized primers are assigned in the Supplementary Material Table S1.

2.4. Co-expression in shake flasks

Seed cultures were inoculated from a –80 °C glycerol stock using 50 mL LB medium supplemented with 10 μ g/mL tetracycline and incubated overnight at 37 °C and 150 rpm. The main cultures were supplemented with the overnight culture of recombinant *B. megaterium* MS941 cells (1:100) and were grown at 37 °C and 150 rpm. The synthesis of 11 β -HSD1 and LbADH in *B. megaterium* was carried out in 300 mL baffled Erlenmeyer flasks containing either 50 mL TB medium or 50 mL modified M9CA medium (Hartz et al., 2018) supplemented with 10 μ g/mL tetracycline. When an OD₅₇₈ of 0.4 was reached, expression was initiated by the addition of L-arabinose (0.4–2% w/v) or D-xylose (0.5% w/v) dissolved in distilled water. Cultures were further incubated at 30 °C or 37 °C and 150 rpm for 24 h.

2.5. In vivo steroid conversions in test tubes

Following the expression period, cultures were harvested by centrifugation (4500g, 15 min, RT), washed and then suspended in 200 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4). Alternatively the harvested cells were suspended in the already used expression medium. In both cases a defined cell density was adjusted for steroid conversion. The reaction was performed in 2 mL final volume, containing 10–25% DMSO (or 5% ethanol), 2.5% acetone and hydrocortisone dissolved in DMSO or ethanol. The reactions were carried out at 30 or 37 °C, 200 rpm in test tubes for a defined time.

2.6. Reversed phase HPLC analysis (RP-HPLC)

For product quantification via RP-HPLC, the samples were extracted twice with seven volumes of chloroform. The organic solvent was evaporated and the remaining steroids were suspended in 50% acetonitrile and separated on a Jasco reversed phase HPLC system of the LV2000 series using a reversed-phase ec MN NucleoDur C₁₈ (4.0 \times 125 mm) or reversed-phase ec MN NucleoDur C₁₈ Isis (4.6 \times 125mm) columns (Macherey-Nagel, Betlehem, PA, USA). The column was kept at an oven temperature of 40 °C. For measurements of the samples an acetonitrile/water gradient was applied (phase A: 10% acetonitrile; phase B: 100% acetonitrile; 0 min 20% B, 5 min 20% B, 13 min 40% B, 15 min 80% B, 18 min 80% B, 19 min 20% B, 22 min 20% B) with a flow rate of 0.8 mL/min and absorbance of the substances were detected at

240 nm wavelength. Differences in retention times are due to the use of different columns, validation of the substances was conducted by comparison with respective standards. The isolation of conversion products was performed using an ec MN NucleoDur C₁₈ VP (5 μ M, 8 \times 250mm) (Macherey-Nagel, Betlehem, PA, USA) column. The products were separated by preparative HPLC, according to their retention time. The maximum injectable amount of sample could reach 250 μ L and the flow rate 4 mL/min. The collected fractions were evaporated to dryness and analyzed by mass spectrometry (MS) using a QTRAP[®] 5500 LC-MS/MS System via Electrospray ionization (ESI).

2.7. Determination of the relative NADP⁺ content

The NADP⁺ concentrations were determined using an NADP/NADPH Assay Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). For fluorometric NADP⁺ detection, biological triplicates of the conversion cultures were harvested after 6 and 24 h, washed with PBS (137 mM NaCl, 10 mM KH₂PO₄/Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, pH 7.4) and adjusted to an OD₆₀₀ of 50 using deionized water. 10 μ L of this suspension was used for co-factor extraction. Following steps were performed according to the manufacturer's user manual and measured at $\lambda_{\text{ex}} = 530$ nm/ $\lambda_{\text{em}} = 585$ nm using the CLARIOstar[®] Plus Multi-mode Microplate Reader (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany). The fluorometric signals were averaged and standardized to the mean values of the control samples.

3. Results

3.1. Establishment of the expression system

A modified guinea pig (*Cavia porcellus*) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11 β -HSD1) has previously been shown to have high catalytic activity and selectivity in reduction of cortisone at position C11 in *E. coli* (Zhang et al., 2014). We thus sought to enable cortisone synthesis in *B. megaterium* by expressing an N-terminally truncated codon-optimized guinea pig 11 β -HSD1. Previously, it was shown that the removal of the N-terminal residues of 11 β -HSD1 is essential for soluble protein production, due to diminished formation of aggregates in a recombinant bacterial system (Elleby et al., 2004). Our 11 β -HSD1 sequence also contains the additional modification F277R. The substitution of phenylalanine by a charged amino acid (here arginine) serves to promote repulsion between protein surface domains and thus, to increase protein solubility, as previously described (Lawson et al., 2009).

To further support the biotransformation of hydrocortisone, we utilized an NADP⁺ regeneration system based upon the co-expression of an alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* (LbADH) in the bicistronic expression vector. This enzyme accepts ketones as substrates and reduces them to the corresponding alcohols with the simultaneous conversion of NADPH to NADP⁺ (Fig. 2). Generating a higher NADP⁺/NADPH ratio is intended to support NADP⁺-dependent oxidation of hydrocortisone. The genes for both 11 β -HSD1 and LbADH were cloned into the expression vector pARA, which enables arabinose-inducible protein expression (Hartz et al., 2019).

3.2. Effect of temperature and acetone supplementation on hydrocortisone conversion

After establishing our system, we first sought to study the impact of different conversion temperatures. We found enhanced conversion efficiency of hydrocortisone to cortisone at 37 °C compared to 30 °C (Fig. 3A) and thus chose to perform all subsequent reactions at 37 °C.

HPLC chromatograms shown in Fig. 3A and B also revealed the production of an additional unknown compound at a retention time of 4.5 min. By using cells containing an empty vector, we found the 11 β -HSD1-independent side-product to be 20 β -dihydrocortisone, a modified

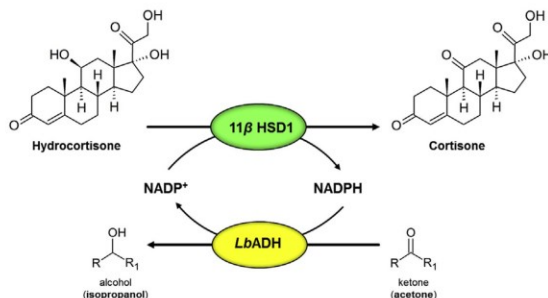


Fig. 2. Scheme of the 11 β -HSD1 and LbADH catalyzed reactions yielding cortisone and propanol. 11 β -HSD1 converts hydrocortisone into cortisone in the presence of NADP⁺. LbADH serves as a NADP⁺ regeneration system by converting acetone into propanol using NADPH as a co-factor.

product of cortisone (Fig. S1). In order to improve hydrocortisone bioconversion, we sought to activate LbADH activity by adding 2.5% (v/v) acetone to the reaction mixture before conversion, which mediates NADP⁺ regeneration both in resting and hydrocortisone-converting cells (Fig. S2). We found that acetone enhanced the hydrocortisone transformation and brought the additional advantage of limiting the formation of the undesired secondary product (Figs. 3B and S1).

3.3. C-terminal truncation of the 11 β -HSD1 improves cortisone production

Next, we sought to investigate the impact of deleting the C-terminal, hydrophobic fragment of 11 β -HSD1, which was previously shown to further increase the solubility of the enzyme without any obvious detrimental impact on enzyme activity (Zhang et al., 2014). Consequently, we truncated the four C-terminal amino acids of 11 β -HSD1 by insertion of the mutation Y295Stop to yield the construct pARA_XNC. We found that the N- and C-terminal truncated version of the protein (F277R/Y295Stop) led to a faster and more efficient hydrocortisone conversion (factor of 2.8) compared to the exclusively N-terminally truncated version (F277R) (Fig. 4). Thus, for all further experiments 11 β -HSD1 F277R/Y295Stop was used.

3.4. Optimization of the *B. megaterium* whole-cell system

3.4.1. Optimization of conversion conditions with respect to substrate solubility and cell density

Hydrocortisone displays a limited solubility in EtOH ($c_{\max} = 40$ mM). By contrast, DMSO as solvent shows a dissolving

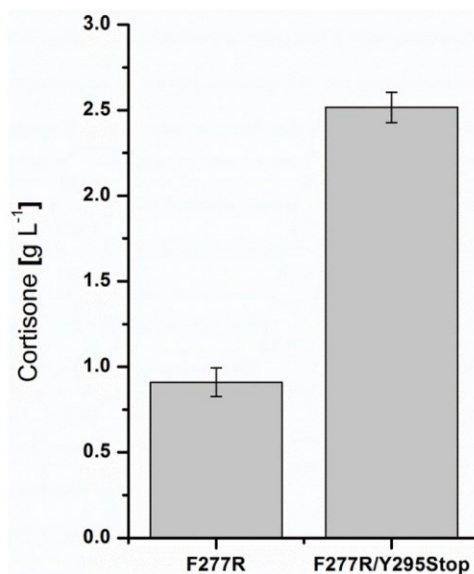


Fig. 4. Comparison of the whole-cell substrate conversion by the 11 β -HSD1 enzyme variants containing F277R substitution either with (pARA_XNC) or without C-terminal truncation (pARA_XN) at position Y295. The 24 h expression period took place in TB medium after induction with 0.4% arabinose. The reactions were carried out in 2 mL of 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) for 24 h, containing 25% DMSO, 2.5% acetone final concentration and 100 g L⁻¹ wet cell weight (WCW) in the presence of 10 mM hydrocortisone. Extracted steroids were quantified via RP-HPLC. Values represent the mean of three conversion experiments. Error bars indicate respective standard deviations.

capacity up to 400 mM. Thus, we quantified the correlation between substrate solubility and cortisone production efficiency by using varying final concentrations of DMSO in conversion cultures ranging from 0% to 35% (v/v) (Fig. 5).

We found the conversion efficiency to increase monotonically from 0.53 ± 0.005 g L⁻¹ d⁻¹ at 0% DMSO up to 2.61 ± 0.039 g L⁻¹ d⁻¹ at 25% DMSO. At higher DMSO concentrations, however, the conversion efficiency decreased. We checked for alternatives to DMSO and substituted the solvent partially with the non-ionic surfactant Tween-20 at varying concentrations, while keeping DMSO constant at 10%. Nonetheless, the addition of Tween-20 was found to inhibit cortisone production (Fig. S3). Thus, for all following experiments, the DMSO concentration was kept at 25%. We further examined the effect of cell

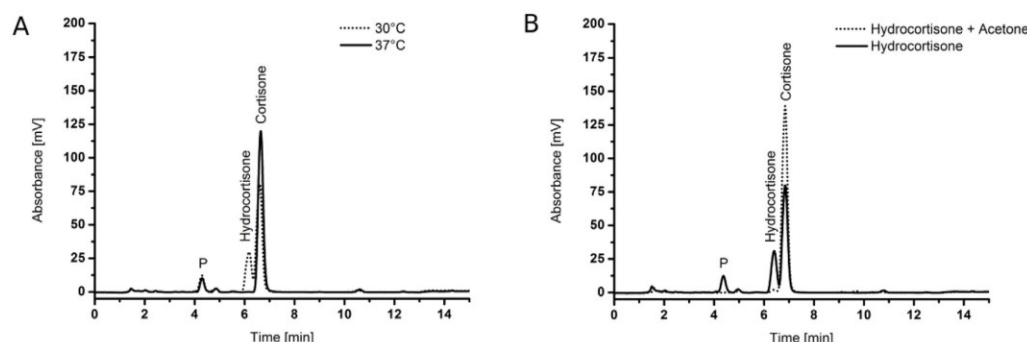


Fig. 3. HPLC chromatograms of hydrocortisone bioconversions using *B. megaterium* MS941 overexpressing LbADH and the N-terminally truncated version of the modified guinea pig 11 β -HSD1 F277R (sequences contained in pARA_XN). Resting cells in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) were used for whole-cell biotransformation of 100 μ M hydrocortisone, supplied in 5% EtOH (v/v). P indicates a side-product formed by cortisone conversion. A: temperature dependent hydrocortisone bioconversion for 1 h at 30 °C and 37 °C, respectively; B: hydrocortisone conversion at 30 °C for 2 h, with or without supplementation of 2.5% acetone.

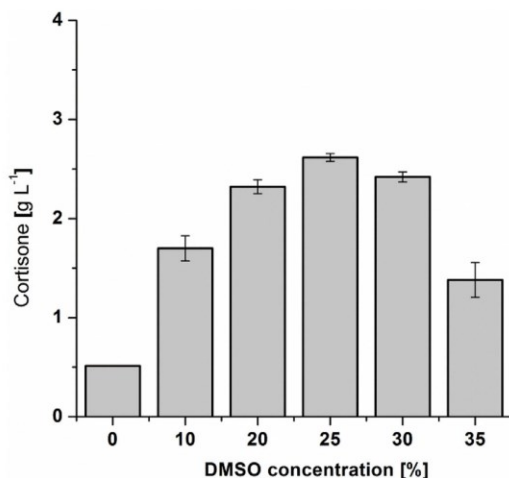


Fig. 5. Effect of DMSO concentration on 11β -HSD1 dependent cortisone formation in *B. megaterium* after 24 h. Protein production using the vector pARA_XNC was conducted in TB medium for 24 h after induction with 0.4% arabinose. The biotransformations of hydrocortisone were carried out in test tubes containing 2 mL reaction volume. The harvested cells were suspended in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) by adjustment of 100 g L^{-1} WCW. The reaction mixtures comprise varying concentrations of DMSO, 2.5% acetone and 15 mM hydrocortisone. Steroid quantification was conducted via RP-HPLC analysis. The results represent the mean of three conversion experiments, performed simultaneously. Error bars indicate respective standard deviations.

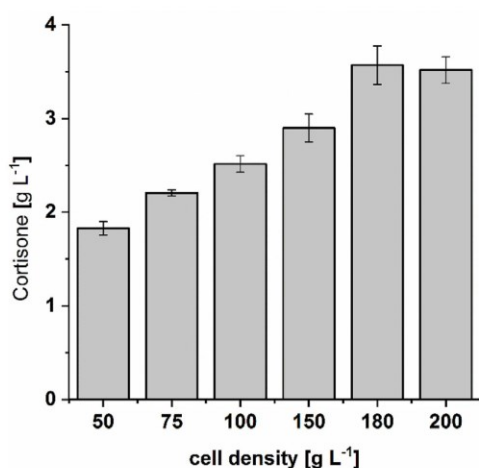


Fig. 6. Effect of increasing cell densities (WCW) on cortisone formation with *B. megaterium* MS941. Protein production using vector pARA_XNC was conducted in TB medium for 24 h after induction of protein expression with 0.4% arabinose. The whole-cell biotransformation of hydrocortisone was carried out in test tubes containing 2 mL reaction volume. The harvested cells were suspended in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) by adjustment of varying cell densities (WCW). The reaction mixtures contain 25% DMSO, 2.5% acetone and 15 mM hydrocortisone, respectively. Steroid quantification was conducted via RP-HPLC analysis. The results represent the mean of three conversion experiments, performed simultaneously. Error bars indicate respective standard deviations.

density on cortisone productivity. To this end, we adjusted varying cell densities in the range of $50\text{--}200 \text{ g L}^{-1}$ wet cell weight (WCW) (Fig. 6). Cortisone yield was found to increase linearly from $1.83 \pm 0.07 \text{ g L}^{-1}$ at 50 g L^{-1} WCW to $3.57 \pm 0.21 \text{ g L}^{-1}$ at 180 g L^{-1} WCW. Further

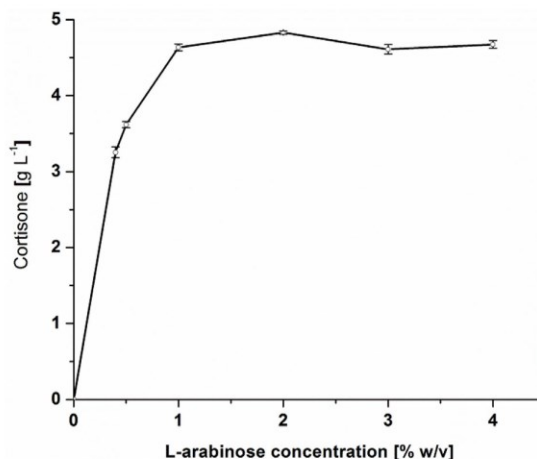


Fig. 7. Bioconversion of hydrocortisone using increasing arabinose concentrations for induction of gene expression. Protein production using the vector pARA_XNC was induced by arabinose in different concentrations and was conducted in TB medium for 24 h. The biotransformation of 15 mM hydrocortisone was performed in test tubes in 2 mL final volume. The harvested cells were suspended in 200 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 25% DMSO, 2.5% acetone and cell density was adjusted to 180 g L^{-1} WCW. After a 24 h reaction period, the steroids were quantified via RP-HPLC. The results represent the mean of three conversion experiments. Error bars indicate respective standard deviations.

increase in cell density up to 200 g L^{-1} resulted in insignificant changes in cortisone production ($3.52 \pm 0.14 \text{ g L}^{-1}$). Therefore, cell density was maintained at 180 g L^{-1} WCW for all further experiments.

3.4.2. Expression conditions: inducer concentration

We further improved hydrocortisone conversion by studying efficient induction of protein expression. For this, we varied the supply of arabinose in concentrations ranging from 0 to 4% (w/v) and assessed arabinose-dependent induction efficiency by product quantification of following conversion reactions (Fig. 7). The highest yields of cortisone were observed using 2% arabinose ($4.83 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1}$) showing an 1.5 fold increase in conversion compared with conversions using 0.4% arabinose for expression induction as applied in previous experiments. Cortisone yields remained constant at higher concentrations, consequently, 2% arabinose was used for all following experiments.

3.4.3. Influence of expression and conversion media on reaction selectivity

We next asked about the impact of expression and conversion media on the reaction selectivity and productivity. In Fig. 8, the activity of this reaction is demonstrated with regard to hydrocortisone consumption and cortisone production for determination of the respective reaction selectivity.

When complex medium (TB medium) was used, either for expression or for both expression and conversion, no significant difference in cortisone yield was observed, whilst the reaction selectivity was slightly increased from 88% to 93% when the conversion was carried out in recycled TB medium compared to conversions conducted in potassium phosphate buffer (Figs. 8 and 9A). In contrast, when M9CA minimal medium was used for expression followed by conversion in potassium phosphate buffer a marked loss in selectivity to 47% was observed (Fig. 9B). However, the use of M9CA minimal medium for both expression and conversion strongly increased reaction selectivity to 96% (Fig. 9C).

Nonetheless, in comparison with previous conditions, only 83% efficiency in hydrocortisone transformation was observed when expression and conversion were conducted both in M9CA medium. This

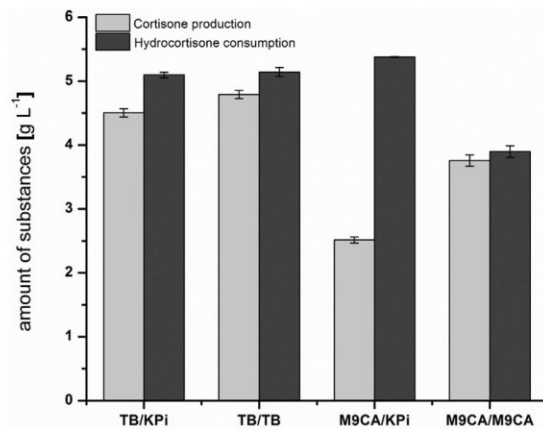


Fig. 8. Productivity and selectivity of cortisone formation dependent on expression and conversion medium. Protein production using vector pARA_XNC was carried out using TB or M9CA medium after supplementation of 2% arabinose for induction. The whole-cell biotransformation of hydrocortisone was performed in used expression medium (TB or M9CA) or 200 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4). The reactions were carried out using 25% DMSO and 2.5% acetone final concentration and 180 g L⁻¹ WCW in the presence of 15 mM hydrocortisone. Light bars represent the obtained cortisone yield and dark bars indicate hydrocortisone consumption after 24 h. The steroids were quantified via RP-HPLC. The values represent the mean of three conversion experiments. Error bars indicate respective standard deviations.

effect might arise from a decelerated growth of the cells and thus, leads to a delay in protein production. On this account, the expression temperature was raised to 37 °C. This change would additionally facilitate an industrial fermenter process by maintaining the temperature during the expression and conversion period. Indeed, the elevation in expression temperature increased cortisone production in minimal medium equal to expression in complex media at 30 °C and hydrocortisone conversion in buffer of 4.76 g L⁻¹ d⁻¹ (Fig. 10).

3.4.4. Influence of different promoters for protein expression

Finally, we investigated the consequence of utilizing different promoter constructs (pARA_XNC, pXYL_XNC and p0706_XNC) for the comparison of time-dependent cortisone productions. For these experiments we additionally increased the hydrocortisone concentration up to 50 mM, since we previously observed elevated cortisone yields (1.75 fold) by MS941/p0706_XNC if substrate concentrations were doubled from 25 to 50 mM (Fig. S4). Additionally, we monitored enzyme activity utilizing MS941/p0706_XNC without feeding acetone. Fig. 11 shows conversion efficiencies of the different constructs as function of time. When 11 β -HSD1 was expressed from the strong

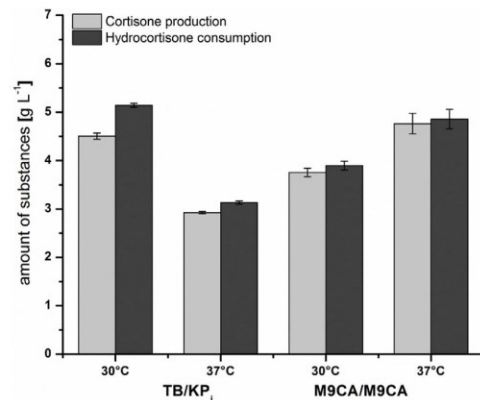


Fig. 10. Efficiency and selectivity of cortisone formation dependent on expression temperature and medium for protein expression. The expression periods of 24 h (MS941/pARA_XNC) were carried out at 30 °C or 37 °C expression temperature in TB or M9CA medium. The whole-cell biotransformation of hydrocortisone was performed at 37 °C in potassium phosphate buffer (pH 7.4) or recycled M9CA expression medium. The reactions were performed in presence of 25% DMSO, 2.5% acetone and 15 mM hydrocortisone. Light bars represent the cortisone yield and dark bars indicate the respective hydrocortisone consumption. Extracted steroids were analyzed via RP-HPLC. Values represent the mean of three conversion experiments. Error bars indicate respective standard deviations.

constitutive P₀₇₀₆ promoter, we were able to achieve cortisone yields of 13.65 ± 0.64 g L⁻¹ d⁻¹. This represents a 1.7- and even 2-fold increase in conversion efficiency compared with MS941/pARA_XNC (8.01 ± 0.32 g L⁻¹ d⁻¹) and MS941/pXYL_XNC (6.66 ± 0.11 g L⁻¹ d⁻¹), respectively. Further increase of incubation duration did not lead to a significantly elevated level of cortisone when MS941/p0706_XNC is utilized, although cortisone yield continued to increase over time in reactions in which 11 β -HSD1 was expressed from the other two promoters. The addition of acetone led to a two-fold enhanced cortisone production, which highlights the supporting property of acetone in effective bioconversions. Additionally, the use of P₀₇₀₆ and P_{ARA} promoters (Hartz et al., 2019) led to a 2-fold and 1.3-fold higher conversion efficiency respectively compared with P_{XYL} under the same conditions.

4. Discussion

In this study we report on the development of a whole-cell based system for the efficient oxidation of hydrocortisone position C11 to yield cortisone. Specifically, we expressed the guinea pig 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11 β -HSD1) in *B. megaterium* as a biocatalyst

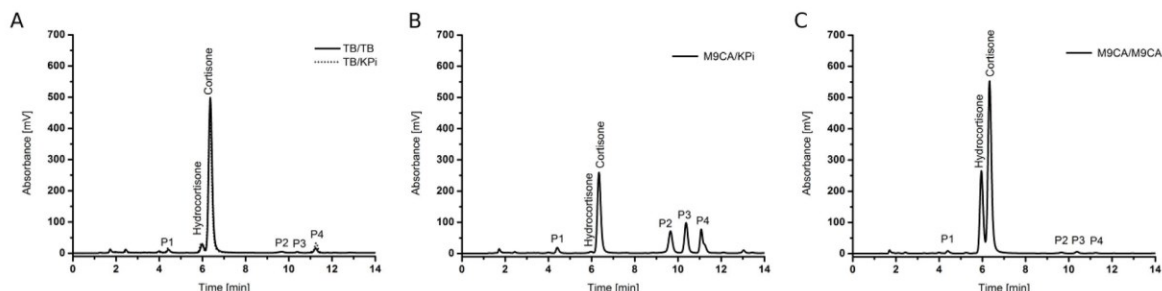


Fig. 9. HPLC chromatograms of hydrocortisone conversion in *B. megaterium* MS941 overexpressing guinea pig 11 β -HSD1 and *LbADH*. The whole-cell biotransformation of hydrocortisone was performed in different expression and conversion media. A. TB medium B. expression in M9CA medium and conversion in 200 mM potassium phosphate buffer, (pH 7.4) (KPi); C. expression in M9CA medium and reused for conversion. The reactions were carried out using 25% DMSO, 2.5% acetone and 180 g L⁻¹ WCW in the presence of 15 mM hydrocortisone.

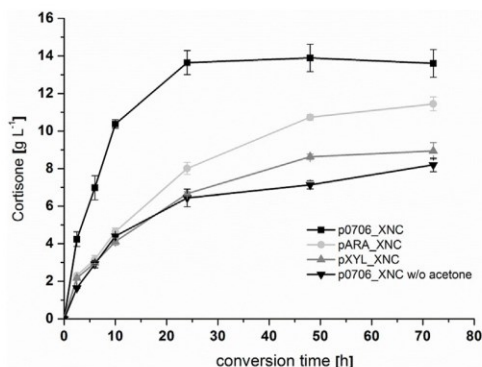


Fig. 11. Time-dependent hydrocortisone bioconversion utilizing different promoters for 11 β -HSD1-expression in *B. megaterium* MS941. The expression periods of 24 h (pARA_XNC, pXYL_XNC) and 27 h (p0706_XNC) were carried out at 37 °C in M9CA medium. The whole-cell biotransformation of hydrocortisone was performed at 37 °C in reused M9CA expression medium. Reactions containing 25% DMSO and 0 or 2.5% acetone (p0706_XNC w/o acetone and p0706_XNC, respectively) in the presence of 50 mM hydrocortisone. Extracted steroids were analyzed by RP-HPLC. Values represent the mean of three conversion experiments. Error bars indicate respective standard deviations.

to promote a highly efficient steroid conversion. Our system exhibits a 1000-fold improvement in cortisone yield compared with the CYP106A1-based starting system (Kiss et al., 2015). Due to a high reaction selectivity (> 95%) and volumetric production (13.65 g L⁻¹ d⁻¹) this system has high potential to be employed in the industrial production of steroidal compounds.

4.1. Enhancement in reaction selectivity

By the addition of acetone to the whole-cell-based reaction we inhibited a subsequent modification of cortisone (Fig. 3B) and enabled the generation of higher product concentrations (Fig. 11). The supplementation with acetone as we implemented here has three effects: (i) acetone increases membrane fluidity and permeability and thus, putatively enhances substrate uptake into the cell and facilitates substrate-protein and protein-protein interactions (Ingram, 1977; Palamanda et al., 2000); (ii) acetone inhibits the formation of the undesired side-product P (Figs. 3B and S1), most likely 20 β -dihydrocortisone. The production of this compound by the NADPH-consuming enzyme FabG was previously observed in *B. megaterium* MS941 under similar cultivation conditions, confirmed by NMR (Gerber et al., 2016; Putkaradze et al., 2017). Reduced 20 β -dihydrocortisone formation by *B. megaterium* MS941 (containing an empty vector) as a consequence of acetone addition (Fig. S1) suggests that the solvent directly affects FabG stability or activity. A similar conclusion was reached by Carrea et al. by comparison of different solvents (Carrea et al., 1988); (iii) acetone influences the cellular NADP⁺/NADPH ratio due to activation of the co-expressed *Lb*ADH. Acetone supplementation increased NADP⁺ generation 1.82-fold in non-converting cells and as much as 3.8-fold in hydrocortisone-converting cells, which consume NADP⁺ to a greater extent, after 24 h (Fig. S2). Consequently, on the one hand, the ratio of the relating co-factors play a major role in 11 β -HSD1 reaction activity and direction, which is reflected here in doubled cortisone yields when acetone was added to the conversion reaction (Fig. 11). On the other hand, the acetone-induced increase in the NADP⁺/NADPH ratio decreases NADPH availability for the FabG-mediated reaction (Fig. 12).

Therefore, the addition of acetone is an important step for increasing regioselectivity (up to 88%) towards cortisone and for an elevated conversion efficiency resulting in maximal yields of 4.5 g L⁻¹ d⁻¹ of cortisone in TB medium (Figs. 8 and 9A). As second step we conducted conversions in recycled M9CA medium which further

enhanced the selectivity up to 96% (Figs. 8 and 9C). By contrast, we observed a massive decline in the selectivity if cultures were previously cultivated in M9CA medium for protein production and subsequently transferred into buffer for conversion. Changing the conversion condition results in a drop of the pH from 7.0 to 6.8 within 24 h of expression in M9CA medium (data not shown) and is further reduced to pH 6 during hydrocortisone conversion in recycled M9CA medium, while the performance in buffer showed a constant pH of 8.4 (Fig. S5). Presumably, the change in this parameter causes the promotion of undefined enzymatic reactions, which lead to the formation of the observed hydrophobic side-products P2, P3 and P4 (Fig. 9B). In order to demonstrate if the side-products are formed by host-related reactions using either hydrocortisone or cortisone as substrate, we performed ESI MS analysis of the products P2, P3 and P4. This analysis revealed that the corresponding HPLC fractions contain a complex mixture of several compounds which are not all visible in the chromatogram (Fig. 9B). According to their determined molecular masses some compounds can be allocated to cortisone or hydrocortisone derivatives formed by esterification with differently sized short-chain fatty acids and corresponding dehydrated products. For instance, there is a possible esterification of hydrocortisone with propionic acid [415+H]⁺, 3 β -hydroxyhexanoic acid [475+H]⁺ and/or hexenoic acid [457+H]⁺ or esterification of cortisone with isobutyric acid or butyric acid [429+H]⁺. The latter is the dehydrated product of 3 β -hydroxybutyric acid, a compound which is predominantly present in hydrophobic granules (poly(3-hydroxybutyrate) granules; PHB granules) in *B. megaterium* serving as energy storage located in the cytosol (Jawed et al., 2016; Jendrossek, 2009). During the cultivation in nutrient-poor buffer, the mobilization of short-chain fatty acids is putatively induced for metabolic homeostasis (Handrick et al., 2000; James B.W. et al., 1999).

Furthermore, we found that expression and conversion in the same medium is possible without major changes in conversion efficiency (Figs. 8 and 9). Since a minimal medium is the growth medium of choice in fermenter systems, this experiment serves as proof-of-concept by imitating fermenter conditions. Thereby the utilization of additional buffer for implementation was avoided, resulting in a more sustainable process, and further, required overall preparation steps can be reduced. Moreover, the additional replacement of cultivation media by the M9CA medium resulted in an enhanced reaction selectivity of 96% (Figs. 8 and 9A) caused by impaired side-product formation, leading to a highly efficient cortisone formation of 8 g L⁻¹ d⁻¹ under optimal cultivation conditions using the pARA_XNC construct (Fig. 11).

4.2. Elevating the productivity of the system

To obtain enhanced catalytic activity and a further increase of the hydrocortisone conversion, we first created a mutated variant of 11 β -HSD1. Specifically, we removed the N-terminal hydrophobic domain and modified the C-terminal region of the enzyme by the deletion of four terminal residues as well as introducing a positively charged residue at position F277R. These modifications were previously shown to enhance protein solubility upon overexpression in bacterial systems due to limiting hydrophobic protein-protein or protein-membrane interactions which can result in the formation of inactive protein aggregates (Blum et al., 2000; Lawson et al., 2009; Walker et al., 2001; Zhang et al., 2014). Indeed, cortisone production was observed to be 2.8-fold higher upon truncation of the C-terminus (pARA_XNC) compared with the full-length version (pARA_XN; Figs. 4 and 13), which is consistent with previous observations (Zhang et al., 2014).

We further optimized cortisone production up to 5-fold by using DMSO at 25% (v/v) (Fig. 5). This phenomenon is probably mainly caused by enhancing hydrocortisone solubility and thus increasing substrate bioavailability (Katsu and Iguchi, 2016). Additionally, DMSO may protect the biological system from damage by free radicals (Barker et al., 1965) and increases membrane permeability, which putatively

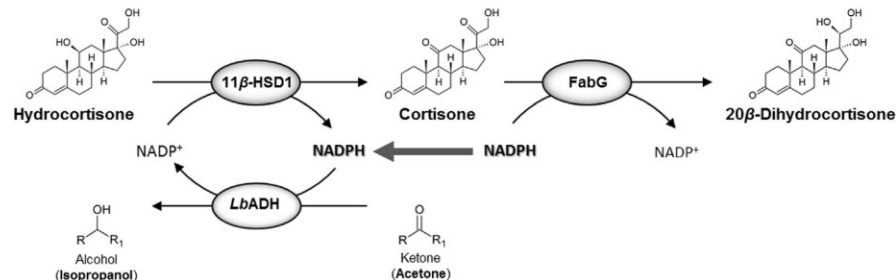


Fig. 12. Scheme of the 11 β -HSD1, LbADH and FabG catalyzed reactions yielding cortisone, isopropanol and 20 β -dihydrocortisone. The FabG related formation of the unwanted side-product 20 β -dihydrocortisone occurs in dependence of NADPH.

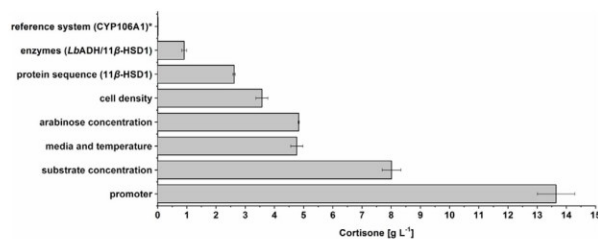


Fig. 13. Summary of the milestones in the enhancement of the presented biotechnological process. The stages of process-optimization were visualized in chronological order showing their impact on cortisone production per 24 h. The cortisone productivity using the 11 β -HSD1 assumes the preliminary adjustment of the DMSO and acetone concentration. *The value of 14 mg L⁻¹ d⁻¹ refers to the process established by Kiss et al. in a *B. megaterium* whole-cell system (Kiss et al., 2015).

leads to an enhanced hydrocortisone uptake (Kametani and Umezawa, 1966). Although the previously described optimizations considerably increased the efficiency of cortisone formation, the major improvement in the productivity of the process was obtained by the replacement of the inducible promoters (P_{ARA} , P_{XYL}) by a constitutive promoter enabling a fully autonomous expression process, without the requirement of manual intervention for changing cultivation conditions. We realized this by substitution of P_{ARA} with P_{0706} within the pSMF2.1 backbone, which both represent two novel promoters, recently identified. These promoters have been found to be equal or even more efficient in lacZ-expression compared with the xylose-inducible system (Hartz et al., 2019). In contrast to P_{XYL} and P_{ARA} , the constitutive promoter P_{0706} displayed a 1.7- to 2.0-fold increase in cortisone productivity, elevating the yield from 6.66 g L⁻¹ d⁻¹ or 8.01 g L⁻¹ d⁻¹, respectively, up to 13.65 g L⁻¹ d⁻¹ under optimal cultivation conditions (Figs. 11 and 13). Furthermore, the use of a constitutive promoter provides the possibility to conduct multi-enzyme reactions, without having to consider possible catabolite repression as side-effect of the addition of sugars for induction (e.g. sucrose or arabinose) (Rygus and Hillen, 1992). These favorable properties make the system presented here ideally suited for biotechnological purposes.

4.3. Perspective

The efficient performance of C11-oxidation of hydrocortisone or other 11 β -hydroxylated steroids could open a broad field of applications, yielding further substances of analytical and pharmaceutical interest. For instance, the complementation of the oxidation reaction, demonstrated in this study, by a subsequent Δ^1 -dehydrogenation could enable the generation of the synthetic derivative prednisone, which possesses elevated glucocorticoid receptor affinity and selectivity compared with naturally occurring steroids. These properties result in higher drug potency and in elimination of physiological side-effects

such as corticoid-induced salt-retention (Schacke, 2002; Zhang et al., 2013). Furthermore, exploitation of this system is conceivable for 11 β -dehydrogenation in prednisolone yielding prednisone, producing an alternative drug with anti-inflammatory properties and increased value. Moreover, the isolated or additional C21-acetylation (Mosa et al., 2015) could enable the production of cortisone acetate or prednisone acetate, which are also substances used for therapeutic purposes.

5. Conclusions

Herein, we (i) established a functional and self-sufficient whole-cell system in *B. megaterium* serving as a model for the efficient C11-oxidation of C11-hydroxylated steroids. The co-expression of LbADH, which represents a supporting NADP⁺ regeneration system, enhanced the efficiency of the biotransformation. (ii) We optimized the reaction conditions for biocatalysis by inhibition of the *B. megaterium* FabG-mediated modification of cortisone and by replacement of expression and conversion media from TB medium to M9CA minimal medium, which resulted in a remarkably high selectivity of the reaction (> 95%); (iii) We established a sustainable high-yield cortisone production of 13.65 g L⁻¹ d⁻¹ by utilizing an efficient host-derived constitutive promoter for gene expression. Its combination with the established optimized conditions resulted in a process independent of inducer supplementation or changes in fermentation conditions during cultivation, making the presented whole-cell system applicable for up-scaling and deployment in industrial fermenter processes. The presented reaction shows high potential for future studies to enable and expand its application for subsequent down-stream processing (yielding e.g. prednisone, prednisone acetate, or cortisone acetate) and for the production of further 11-keto derivatives of C19 or C21 steroids, which can be produced for pharmaceutical or analytical purposes.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LK conducted the presented experiments and drafted the manuscript. PH assisted in the conduction of experiments and interpretation of the results. FH participated in the design of the study, interpretation of the results and manuscript drafting. RB participated in the interpretation of the results and in manuscript drafting.

Funding

This work was supported by a grant of the Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU).

Acknowledgements

We thank Prof. Dr. Bruce Morgan for helpful advice in writing the manuscript, Yannik Zimmermann for his assistance in conducting the fluorescence measurements and Dr. Klaus Hollemeyer (Institute of Bioanalytical Chemistry) for mass spectrometry.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.06.005>.

References

- Bachmann, W.E., Cole, W., 1939. The total synthesis of the sex hormone Equilenin. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 974–975. <https://doi.org/10.1021/ja01873a513>.
- Barker, S., Crews, S., Marsters, J., Stacey, M., 1965. Inhibition of hyaluronic acid degradation by dimethyl sulphoxide. *Nature* 207 (5004), 1388–1389.
- Bernhardt, R., Urlacher, V.B., 2014. Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6185–6203. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5767-7>.
- Biedendieck, R., Borgmeier, C., Bunk, B., 2017. Systems Biology of Recombinant Protein Production Using *Bacillus Megaterium*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385118-5.00010-4>.
- Bleif, S., Hannemann, F., Zapp, J., Hartmann, D., Jauch, J., Bernhardt, R., 2012. A new *Bacillus megaterium* whole-cell catalyst for the hydroxylation of the pentacyclic triterpene 11-keto- β -boswellic acid (KBA) based on a recombinant cytochrome P450 system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1135–1146. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3467-0>.
- Blum, A., Martin, H.J., Maser, E., 2000. Human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1/carbonyl reductase: recombinant expression in the yeast *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. *Toxicology* 144, 113–120. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(99\)00197-3](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00197-3).
- Bureik, M., Bernhardt, R., 2007. Steroid hydroxylation: microbial steroid biotransformations using cytochrome P450 enzymes. *Mod. Biooxidation Enzym. React. Appl.* 155–176. <https://doi.org/10.1002/9783527611522.ch6>.
- Carrea, G., Riva, S., Bovara, R., Pasta, P., 1988. Enzymatic oxidoreduction of steroids in two-phase systems: effects of organic solvents on enzyme kinetics and evaluation of the performance of different reactors. *Enzym. Microb. Technol.* 10, 333–340. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(88\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90011-7).
- Chang, S., Cohen, S.N., 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *MGG Mol. Gen. Genet.* 168, 111–115. <https://doi.org/10.1007/BF00267940>.
- de Carvalho, C.C.R., 2017. Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry. *Microb. Biotechnol.* 10, 250–263. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12363>.
- Donova, M.V., Egorova, O.V., 2012. Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1423–1447. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4078-0>.
- Elleby, B., Svensson, S., Wu, X., Stefansson, K., Nilsson, J., Hallén, D., Oppermann, U., Abrahmsén, L., 2004. High-level production and optimization of monodispersity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1700, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.05.003>.
- Eppinger, M., Bunk, B., Johns, M.A., Edirisinghe, J.N., Kutumbaka, K.K., Koenig, S.S.K., Creasy, H.H., Rosovitz, M.J., Riley, D.R., Daugherty, S., Martin, M., Elbourne, L.D.H., Paulsen, I., Biedendieck, R., Braun, C., Grayburn, S., Dhingra, S., Lukyanchuk, V., Ball, B., Ul-Qamar, R., Seibel, J., Bremer, E., Jahn, D., Ravel, J., Vary, P.S., 2011. Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319. *J. Bacteriol.* 193, 4199–4213. <https://doi.org/10.1128/JB.00449-11>.
- Funder, J.W., 2010. Minireview: aldosterone and mineralocorticoid receptors: past, present, and future. *Endocrinology* 151, 5098–5102. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0465>.
- Gerber, A., Milhim, M., Hartz, P., Zapp, J., Bernhardt, R., 2016. Genetic engineering of *Bacillus megaterium* for high-yield production of the major teleost progestogens 17 α ,20 β -di- and 17 α ,20 β ,21 α -trihydroxy-4-pregnen-3-one. *Metab. Eng.* 36, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.02.010>.
- Handrick, R., Reinhardt, S., Jendrossek, D., 2000. Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* 182, 5916–5918. <https://doi.org/10.1128/JB.182.20.5916-5918.2000>.
- Hartz, P., Milhim, M., Trenkamp, S., Bernhardt, R., Hannemann, F., 2018. Characterization and engineering of a carotenoid biosynthesis operon from *Bacillus megaterium*. *Metab. Eng.* 49, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.07.017>.
- Hartz, P., Mattes, C., Schad, M., Bernhardt, R., Hannemann, F., 2019. Expanding the promoter toolbox of *Bacillus megaterium*. *J. Biotechnol.* 294, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.01.018>.
- Hollmann, F., Arends, I.W.C.E., Buehler, K., Schallmey, A., Bühler, B., 2011. Enzyme-mediated oxidations for the chemist. *Green Chem.* 13, 226–265. <https://doi.org/10.1039/C0GC00595A>.
- Ingram, L., 1977. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives EConc. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1233–1236.
- James, B.W., Mauchline, W.S., Dennis, P.J., Keevil, C.W., Wait, R., 1999. Poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an energy source for survival in low-nutrient environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 822–827.
- Jawed, K., Mattam, A.J., Fatma, Z., Wajid, S., Abdin, M.Z., Yazdani, S.S., 2016. Engineered production of short chain fatty acid in *Escherichia coli* using fatty acid synthesis pathway. *PLoS One* 11, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160035>.
- Jendrossek, D., 2009. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *J. Bacteriol.* 191, 3195–3202. <https://doi.org/10.1128/JB.01723-08>.
- Kametani, T., Umezawa, O., 1966. NII-electronic library service. *Chem. Pharm. Bull.* 14, 369–375. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.3229>.
- Katsu, Y., Iguchi, T., 2016. Cortisol, *Handbook of Hormones*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00476-1>.
- Kiss, F.M., Schmitz, D., Zapp, J., Dier, T.K.F., Volmer, D.A., Bernhardt, R., 2015. Comparison of CYP106A1 and CYP106A2 from *Bacillus megaterium* – identification of a novel 11-oxidase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 8495–8514. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6563-8>.
- Korneli, C., Bolten, C.J., Godard, T., Franco-lara, E., 2012. Debottlenecking Recombinant Protein Production in *Bacillus Megaterium* under Large-Scale Conditions – Targeted Precursor Feeding Designed from Metabolomics, vol 109. pp. 1538–1550. <https://doi.org/10.1002/bit.24434>.
- Korneli, C., David, F., Biedendieck, R., Jahn, D., Wittmann, C., 2013. Getting the big beast to work-Systems biotechnology of *Bacillus megaterium* for novel high-value proteins. *J. Biotechnol.* 163, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.018>.
- Lawson, A.J., Walker, E.A., White, S.A., Dafforn, T.R., Stewart, P.M., Ride, J.P., 2009. Mutations of key hydrophobic surface residues of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 increase solubility and monodispersity in a bacterial expression system. *Protein Sci.* 18, 1552–1563. <https://doi.org/10.1002/pro.150>.
- Lednicer, D., 2011. *Steroid Chemistry at a Glance*. John Wiley & Sons.
- Liebers, V., Bruning, T., Raulf-Heimsoth, M., 2006. Occupational endotoxin-exposure and possible health effects on humans. *Am. J. Ind. Med.* 49, 474–491. <https://doi.org/10.1002/ajim.20310>.
- Mosa, A., Hutter, M.C., Zapp, J., Bernhardt, R., Hannemann, F., 2015. Regioselective acetylation of C21 hydroxysteroids by the bacterial chloramphenicol acetyltransferase i. *Chembiochem* 16, 1670–1679. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500125>.
- Nikolova, P., Ward, O.P., 1993. Whole cell biocatalysis in nonconventional media. *J. Ind. Microbiol.* 12, 76–86. <https://doi.org/10.1007/BF01569905>.
- Ortiz de Montellano, P.R., 2010. Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P 450 enzymes. *Chem. Rev.* 110, 932–948. (Washington, DC, United States). <https://doi.org/10.1021/cr9002193>.
- Palamanda, J., Feng, W.W., Lin, C.C., Nomeir, A.A., 2000. Stimulation of tolbutamide hydroxylation by acetone and acetonitrile in human liver microsomes and in a cytochrome P-450 2C9-reconstituted system. *Drug Metab. Dispos.* 28, 38–43.
- Peterson, D.H., Murray, H.C., 1952. Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 1871–1872. <https://doi.org/10.1021/ja01127a531>.
- Putkaradze, N., Kiss, F.M., Schmitz, D., Zapp, J., Hutter, M.C., Bernhardt, R., 2017. Biotransformation of prednisone and dexamethasone by cytochrome P450 based systems – identification of new potential drug candidates. *J. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.011>.
- Rygus, T., Hillen, W., 1992. Catabolite repression of the xyl operon in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 174, 3049–3055. <https://doi.org/10.1128/jb.174.9.3049-3055.1992>.
- Schacke, H., 2002. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol. Ther.* 96, 23–43. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00297-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00297-8).
- Schiffer, L., Anderko, S., Hobler, A., Hannemann, F., Kagawa, N., Bernhardt, R., 2015. A recombinant CYP11B1 dependent *Escherichia coli* biocatalyst for selective cortisol production and optimization towards a preparative scale. *Microb. Cell Fact.* <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0209-5>.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolt, M., Witholt, B., 2001. Industrial biocatalysis and tomorrow. *Nature* 409, 258–268.
- Suzuki, K., Sanga, K., Chikaoka, Y., Itagaki, E., 1993. Purification and properties of cytochrome P-450 (P-450_{1u n}) catalyzing steroid 11 β -hydroxylation in *Curvularia lunata*. *1203*, 215–223.
- Szczębara, F.M., Chandelier, C., Villeret, C., Masurel, A., Bourot, S., Dupont, C., Blanchard, S., Groisillier, A., Testet, E., Costaglioli, P., Cautet, G., Pompon, D., Dumas, B., 2003. Total Biosynthesis of Hydrocortisone from a Simple Carbon Source in Yeast. <https://doi.org/10.1038/nbt775>.
- Walker, E.A., Clark, A.M., Hewison, M., Ride, J.P., Stewart, P.M., 2001. Functional expression, characterization, and purification of the catalytic domain of human 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J. Biol. Chem.* 276, 21343–21350. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011142200>.
- Wittechen, K.D., Meinhardt, F., 1995. Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 871–877. <https://doi.org/10.1007/BF00191184>.
- Zhang, D., Zhang, R., Zhang, J., Chen, L., Zhao, C., Dong, W., Zhao, Q., Wu, Q., Zhu, D., 2014. Engineering a hydroxysteroid dehydrogenase to improve its soluble expression for the asymmetric reduction of cortisone to 11 β -hydrocortisone. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8879–8886. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5967-1>.
- Zhang, H., Tian, Y., Wang, J., Li, Y., Wang, H., Mao, S., Liu, X., 2013. Construction of Engineered Arthrobacter Simplex with Improved Performance for Cortisone Acetate Biotransformation 9503–9514. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5172-7>.

Supplementary information

Table S1: List of used primers for cloning in this work

Primer name	Sequence (5' → 3')	Description
11 β HSD_PacI_for	GTACTTAAATTA AAAATCAAGGAGGTGA TGTACAATGAACGAAAAATCCGTCCAG	Forward primer for 11 β -HSD1 amplification (PacI site (<i>italic</i>), followed by RBS (bold) and start codon of ORF (<u>underlined</u>))
11 β HSD_NotI_rev	GTACGGCGCCGCTT AAGCCCAACGACC G	Reverse primer for 11 β -HSD1 amplification (NotI site (<i>italic</i>), and stop codon of ORF (<u>underlined</u>))
HSD_Y274stop_NotI	CATGGCGCGCCGCTTATAATTTTTTCGTTA GATAATACGTTATCCC	Reverse primer for 11 β -HSD1 amplification (C-terminally truncated version) (NotI site (<i>italic</i>), and stop codon of ORF (<u>underlined</u>))
SpeI_LbADH_for	GTACACTAGTAAAATCAAGGAGGTGAA TATACAATGTCTAACCGTTGGATGGT	Forward primer for <i>LbADH</i> amplification (SpeI site (<i>italic</i>), followed by RBS (bold) and start codon of ORF (<u>underlined</u>))
LbADH_NheI_for	GTACGCTAGCAAATCAAGGAGGTGAA TATACAATGTCTAACCGTTGGATGG	Forward primer for <i>LbADH</i> amplification (NheI site (<i>italic</i>), followed by RBS (bold) and start codon of ORF (<u>underlined</u>))
LbADH_PacI_rev	CATGTTAATTA ACTATTGAGCAGTGTAG CCACC	Reverse primer for <i>LbADH</i> amplification (PacI site (<i>italic</i>), and stop codon of ORF (<u>underlined</u>))

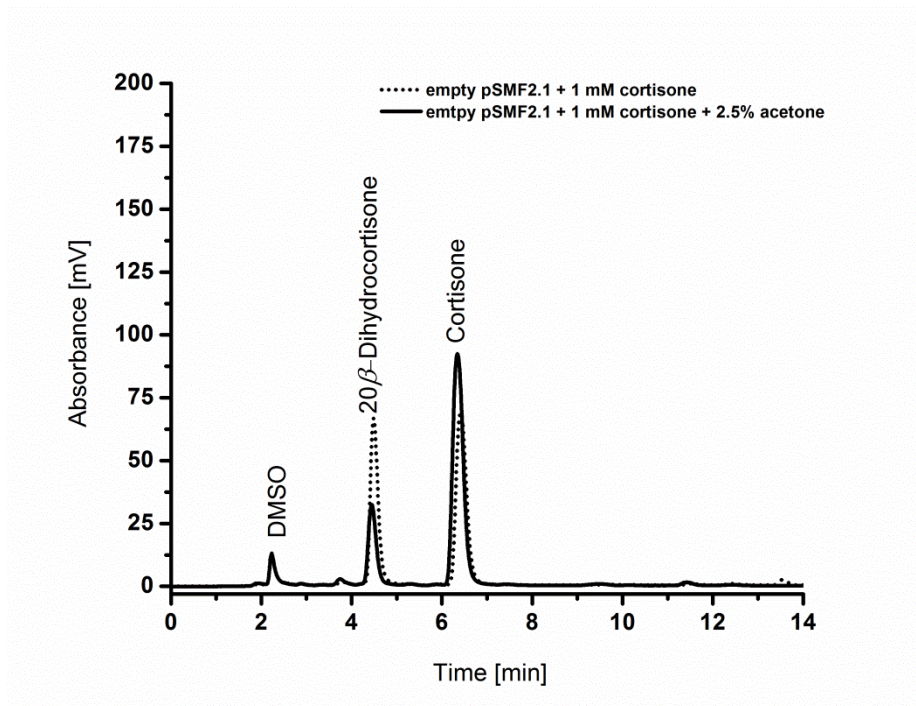


Figure S1: HPLC chromatogram of cortisone conversion in *B. megaterium* MS941 containing an empty pSMF2.1 expression vector

Following a 24 h expression period in M9CA medium at 37°C, the biotransformation of cortisone was performed in M9CA medium at the same temperature after adjustment of 180 g L⁻¹ cell density (WCW). The reaction was conducted for 24 h in 2 mL reaction volume containing 25% DMSO and 1 mM cortisone with or without supplementation of 2.5% acetone. Extracted steroids were quantified by RP-HPLC.

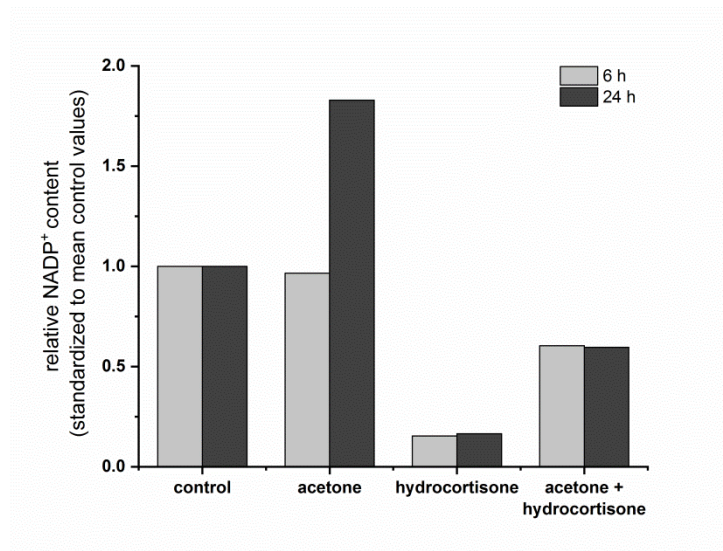


Figure S2: Relative NADP⁺ content in dependency of different cultivation conditions.

The expression periods of 27 h using p0706_XNC were carried out at 37°C in M9CA medium. The following cultivation was performed at 37°C in reused M9CA expression medium. The control reactions contained DMSO (25% v/v) and the other reaction cultures were supplied with 0 or 2.5% (v/v) acetone and/or 0 or 50 mM hydrocortisone. Samples were taken after 6 and 24 h and their NADP⁺ content was analyzed. The mean values of triplicates after a 6 h and 24 h cultivation were depicted as relative NADP⁺ contents standardized to the corresponding control mean value.

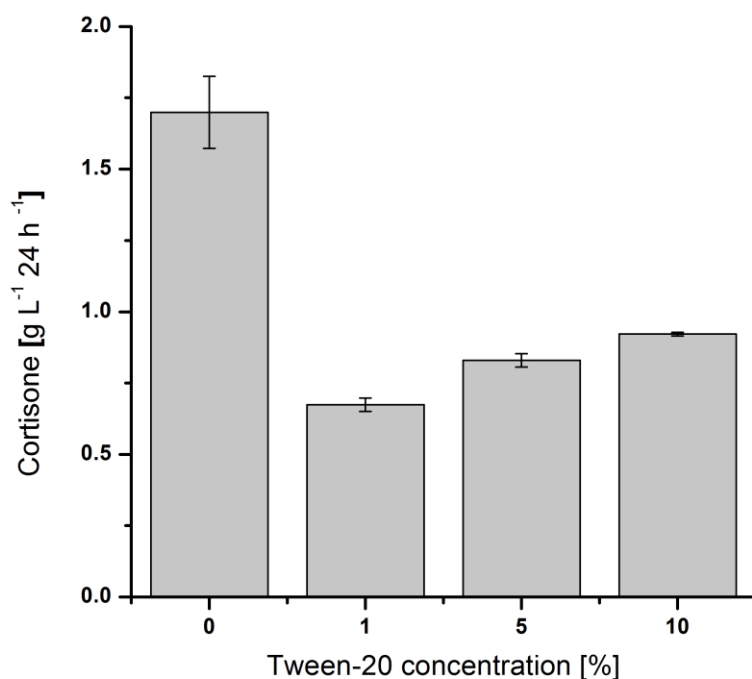


Figure S3: Effect of Tween-20 on 11 β -HSD1 dependent cortisone formation in *B. megaterium* after 24 h

Gene expression in MS941/pARA_XNC was conducted in TB medium for 24 h after induction with 0.4% arabinose. The biotransformations of hydrocortisone were carried out in test tubes containing 2 mL reaction volume. The cells were suspended in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) by adjustment of 100 g L⁻¹ WCW. The reactions contain varying concentrations of Tween-20, 10% DMSO, 2.5% acetone and 15 mM hydrocortisone. Steroid quantification was conducted by RP-HPLC analysis. The results represent the mean of three conversion experiments, performed in simultaneously. Error bars indicate respective standard deviations.

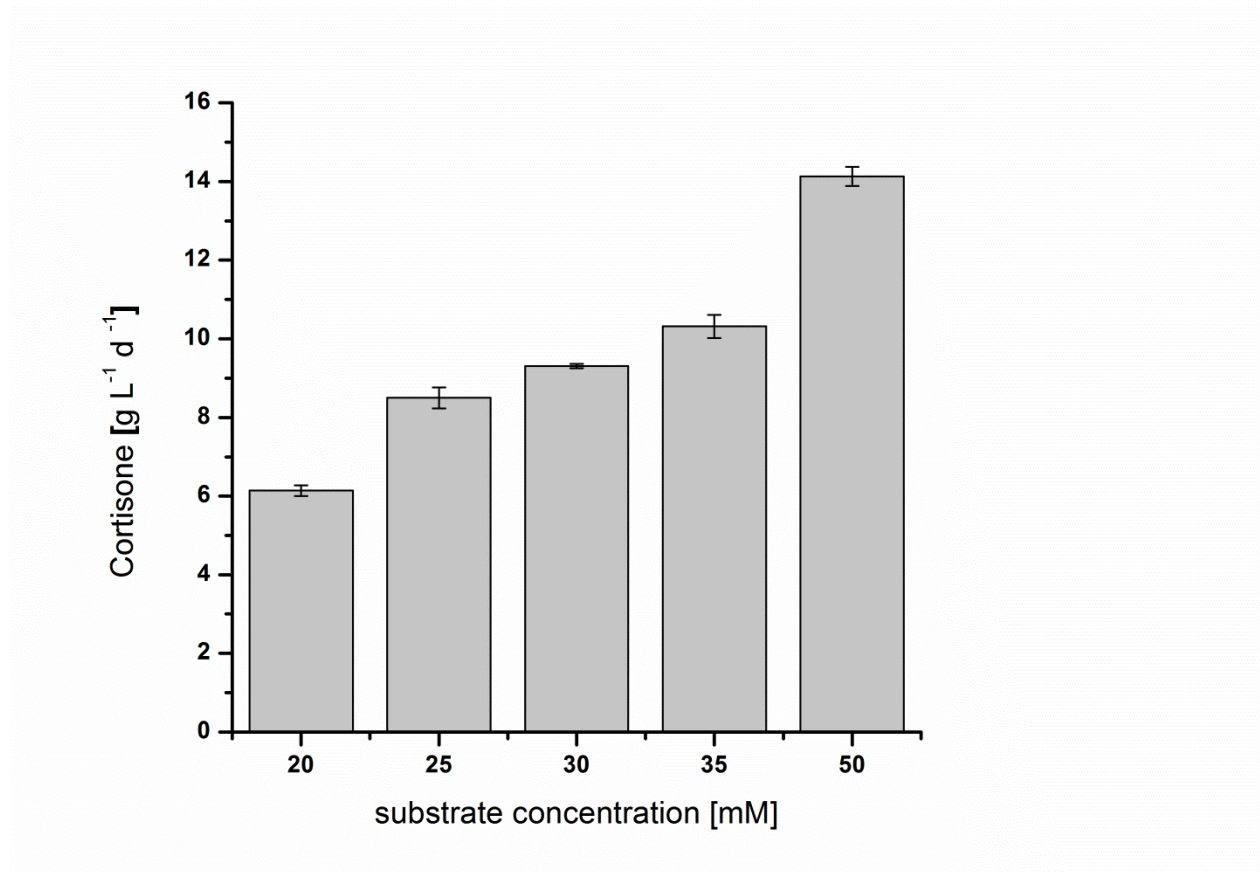


Figure S4: Effect of increasing hydrocortisone concentrations on 11 β -HSD1 dependent cortisone formation in *B. megaterium* after 24 h

Gene expression in MS941/p0706_XNC was conducted in M9CA medium for 24 h. The biotransformations of hydrocortisone were carried out in test tubes containing 2 mL reaction volume. The cells were suspended in previously used medium by adjustment of 180 g L⁻¹ WCW. The reactions contain varying concentrations of the substrate hydrocortisone using the same final concentrations of DMSO (25 %) and acetone (2.5%). Steroid quantification was conducted by RP-HPLC analysis. The results represent the mean of three conversion experiments, performed simultaneously. Error bars indicate respective standard deviations.

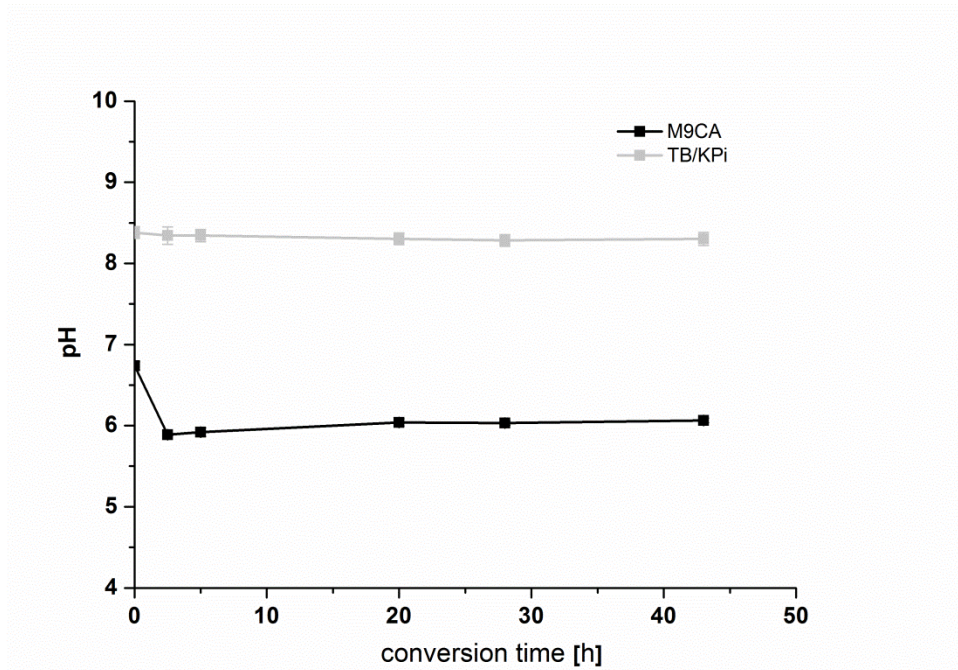


Figure S5: pH monitoring during cortisol bioconversion in *B. megaterium* MS941

The whole-cell biotransformation of cortisol was performed in different expression and conversion media. The grey line shows development of pH of cortisol conversion reaction potassium phosphate buffer when cells were previously cultivated in TB; The black line represents values of pH monitoring in M9CA medium, recycled after expression period for conversion. The reactions were carried out using 25% DMSO, 2.5% acetone final concentration and 180 g L⁻¹ WCW in the presence of 15 mM hydrocortisone.

2.2 Lisa König et al. (2020a)

Identification and circumvention of bottlenecks in CYP21A2 - mediated premedrol production using recombinant *Escherichia coli*




Lisa König, Simone Brixius-Anderko, Mohammed Milhim, Daniela Tavouli-Abbas, Michael C. Hutter, Frank Hannemann, Rita Bernhardt

Biotechnology and Bioengineering. 2020;117(4):901-911. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.27246>

Reprinted with the permission of Wiley.

ARTICLE

Identification and circumvention of bottlenecks in CYP21A2-mediated premedrol production using recombinant *Escherichia coli*

Lisa König¹ | Simone Brixius-Anderko¹  | Mohammed Milhim¹ | Daniela Tavouli-Abbas¹ | Michael C. Hutter² | Frank Hannemann¹  | Rita Bernhardt¹ 

¹Department of Biochemistry, Saarland University, Saarbrücken, Germany

²Center for Bioinformatics, Saarland University, Saarbrücken, Germany

Correspondence

F. Hannemann and R. Bernhardt, Department of Biochemistry, Saarland University, Campus B 2.2, 66123 Saarbrücken, Germany.
Email: f.hannemann@mx.uni-saarland.de (F. H.) and ritabern@mx.uni-saarland.de (R. B.)

Present address

Simone Brixius-Anderko, College of Pharmacy, Department of Medicinal Chemistry, 428 Church St, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109.

Abstract

Synthetic glucocorticoids such as methylprednisolone are compounds of fundamental interest to the pharmaceutical industry as their modifications within the sterane scaffold lead to higher inflammatory potency and reduced side effects compared with their parent compound cortisol. In methylprednisolone production, the complex chemical hydroxylation of its precursor medrane in position C21 exhibits poor stereo- and regioselectivity making the process unprofitable and unsustainable. By contrast, the use of a recombinant *E. coli* system has recently shown high suitability and efficiency. In this study, we aim to overcome limitations in this biotechnological medrane conversion yielding the essential methylprednisolone-precursor premedrol by optimizing the CYP21A2-based whole-cell system on a laboratory scale. We successfully improved the whole-cell process in terms of premedrol production by (a) improving the electron supply to CYP21A2; here we use the N-terminally truncated version of the bovine NADPH-dependent cytochrome P450 reductase (bCPR₋₂₇) and coexpression of microsomal cytochrome *b*₅; (b) enhancing substrate access to the heme by modification of the CYP21A2 substrate access channel; and (c) circumventing substrate inhibition which is presumed to be the main limiting factor of the presented system by developing an improved fed-batch protocol. By overcoming the presented limitations in whole-cell biotransformation, we were able to achieve a more than 100% improvement over the next best system under equal conditions resulting in 691 mg·L⁻¹·d⁻¹ premedrol.

KEYWORDS

C21 hydroxylation, CYP21A2, cytochrome *b*₅, enzyme engineering, whole-cell biotransformation

1 | INTRODUCTION

Synthetic glucocorticoids are often used as immunosuppressants or for hormone replacement therapy compensating enzymatic disorders or deficiencies to treat various diseases like rheumatoid arthritis (Kadmiel & Cidlowski, 2013; McMaster & Ray, 2008). They are very similar to physiologically produced steroids, whereas their structure differs in additional functional groups such as hydroxy or methyl

groups. These changes in the steroid framework modify the physiological properties such as solubility, skin or intestinal absorption, or steroid receptor affinity (Diederich et al., 2015). The latter particularly influences the suitability of the active substance for targeted medication, as natural glucocorticoids often cause unwanted side effects that typically manifest themselves in hypertension, hypokalemia, osteoporosis, and other symptoms (Henzen, 2003; Schäcke, 2002; Schäcke et al., 2004). These occur due to the

high coaffinity of these glucocorticoid ligands to the mineralocorticoid receptor (MR) causing an aldosterone-like response (Farman & Rafestin-Oblin, 2017). Avoiding such side effects while increasing the therapeutic effect of steroidal drugs is a realistic goal and is often achieved by steroid modification. This can be illustrated particularly well using the example of the synthetic glucocorticoid methylprednisolone, which exhibits reduced MR affinity and multiplied glucocorticoid potency compared with its unmethylated derivative, prednisolone. Methylprednisolone, also known as medrol, is applied for the treatment of arthritis and other inflammatory diseases and thus, highly appreciated by the pharmaceutical industry (Bavetta, Bekhor, Shah, O'Day, & Nimni, 1962). The increasing demand of this compound requires the development of production strategies, that are aimed at achieving high-product yields while maintaining the cost-effectiveness of the process. Besides that, there is a common interest in reducing the ecological footprint to a minimum. The synthesis of this compound is challenging since, in particular, the introduction of a hydroxyl group in position C21 is a demanding step and difficult to achieve by chemical methods. Such reactions often require multistep processes involving the introduction of protective groups and the use of toxic reagents such as halogens. In addition, by-products increase the total expenditure and thus reduce production efficiency due to required purification by chromatographic methods (Koechlin, Kritchevsky, & Gallagher, 1951). The replacement of chemical by biotechnological processes has therefore aroused interest in recent decades, as the latter are highly suitable for the environmentally sustainable and economic production of pharmaceuticals. Bacterial fermentation for the production of pharmaceuticals offers (a) the possibility to accumulate high amounts of biomass by the use of simple and nontoxic raw materials, (b) a high-yield production of catalytically active enzymes and (c) the production of whole cells acting as biocatalysts. The latter can be used for the execution of regio- and stereospecific reactions under mild conditions while the cells provide and regenerate expensive cofactors such as NADPH (Bureik & Bernhardt, 2007). In particular, the use of cytochrome P450 enzymes (P450) in optimized bacterial whole-cell systems shows high potential and suitability for pharmaceutical production (Bernhardt, 2006; Urlacher & Girhard, 2012). Recently, the C21 hydroxylation of medrane has been established in a recombinant *Escherichia coli* (*E. coli*) whole-cell system that enables the CYP21A2-mediated production of premedrol, the precursor of methylprednisolone (Brixius-Anderko, Schiffer, Hannemann, Janocha, & Bernhardt, 2015). Although this system allows the production of considerable quantities of this compound, there is still potential for improvement by circumventing existing limitations of the CYP21A2-mediated conversion. Frequently observed bottlenecks of P450 systems include an insufficient electron delivery (Bernhardt & Urlacher, 2014; Sagadin, Riehm, Milhim, Hutter, & Bernhardt, 2018), whose efficiency is dependent on the choice of redox partners for bioconversion. Their suitability varies dependent on the respective P450 isoform. Additionally, there is evidence that the rate-limiting transfer of the second electron can be supported by an alternative bypass-pathway via cytochrome *b₅*, affecting product

formation velocity and efficiency (Vergères & Waskell, 1995). Another possible limitation that can occur in recombinant whole-cell biocatalysis is the molecular obstruction of substrate access to the active site (Wade, Winn, Schlichting, & Sudarko, 2004), which can be modulated by substitution of the relevant residues that cause steric or polar constraints. There is also the possibility of the substrate and product inhibition (Edwards, 1970; Lin et al., 2001), caused by exposure of toxic substrates or complex-formation of the enzyme with the substrate or product at excessively high concentrations, respectively. Here, we addressed all of these possible obstacles and, thus, (a) improved the efficiency of electron supply by using the modified natural redox partner bCPR₋₂₇ and the coexpression of cytochrome *b₅*, (b) improved substrate conversion by molecular modification of the substrate access channel, and (c) bypassed substrate or product inhibition by performing fed-batch cultivation of *E. coli*.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Chemicals and enzymes

Medrane and premedrol were obtained from Sanofi, Frankfurt-Höchst (DE) and of highest purity. Restriction enzymes were obtained from New England Biolabs (Ipswich, MA) and Fast-Link™ Ligase was purchased from Lucigen Corporation. The PCRs were performed with Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase and dNTP's, both obtained from New England Biolabs (Ipswich, MA). Further chemicals and reagents were purchased from standard resources and are of highest purity.

2.2 | Bacterial strains and cultivation

All cloning experiments were performed with *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen). Protein synthesis and whole-cell biotransformation were carried out in the *E. coli* strain C43(DE3) as described in (Miroux & Walker, 1996). Transformed cells were stored as glycerol stock with a 1:1 mixture of an overnight culture and glycerol (80%) at -80°C.

2.3 | Plasmid construction and mutagenesis

2.3.1 | CYP21A2 and CPR₋₂₇ expression

The bovine CYP21A2 [UniProt ID: P00191; PDB code: 3QZ1] and CPR₋₂₇ [UniProt ID: Q3SYT8] were expressed in C43(DE) while the latter is an N-terminally truncated version with a C-terminal 3-glycine-6-histidine tag as described (Neunzig et al., 2014). The truncation of 27 amino acids at the N-terminus enables high-yield expression of a soluble catalytically active CPR. The cloning and generation of the vector p21b_bRED(-27) was performed as described in (Brixius-Anderko et al., 2015; Neunzig et al., 2017) (Figure 1a).

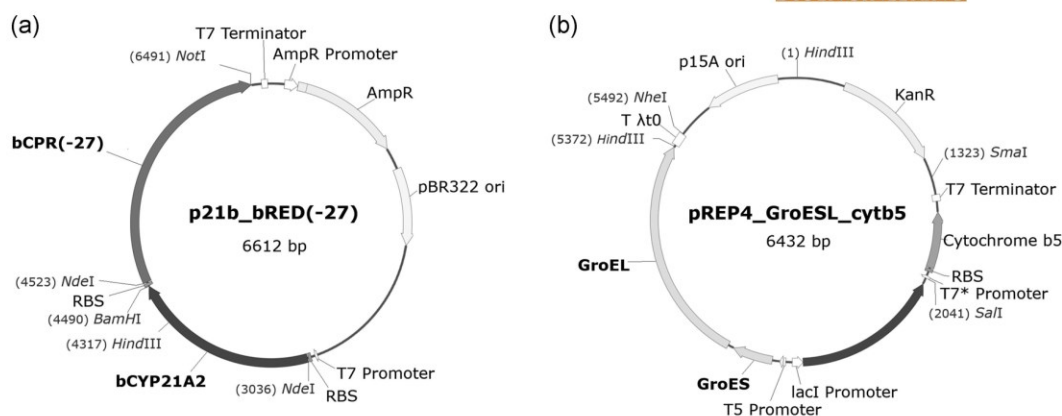


FIGURE 1 Vector maps containing genes for CYP21A2, CPR, cytochrome b_5 , and chaperonins. Restriction enzyme cleaving sites are depicted in red with corresponding positions in the respective plasmid. (a) Vector map of bicistronic p21b_bRED(-27) containing the genes of the bovine CYP21A2 and N-terminally truncated bovine CPR (CPR₋₂₇) with the corresponding ribosome binding sites (RBS). Expression of these proteins is regulated by the T7 promoter. The plasmid contains the gene for ampicillin resistance (AmpR) and a pBR322 origin of replication (ori). (b) Vector map of the plasmid pREP4-groESL_cytb5, a modified derivative of pREP4-groESL (Cole, 1996) containing the additional gene of cytochrome b_5 with corresponding RBS under control of a modified T7 promoter (T7*) with decreased induction strength (Ikeda et al., 1992) and the gene for kanamycin resistance (KanR)

2.3.2 | Cytochrome b_5 and GroEL, GroES chaperonins

The vector pREP4-groESL_cytb5 (Figure 1b) was generated using the pREP4-groESL backbone (Cole, 1996). For cloning of the bovine cytochrome b_5 [UniProt ID: P00171], the expression cassette *SmaI*-P_{T7mod}-cytochrome b_5 -T_{7mod}-*SalI* was amplified via PCR using the template previously described (Klymiuk et al., 2017) and primers listed in Table S1. The T7 promoter sequence was modified (P_{T7mod}), to reduce the cytochrome b_5 expression level. Hence, adenine was substituted into thymine in position -6 of the T7 sequence as proposed by Ikeda, Ligman, and Warshamana (1992). Following, the digested amplicon was inserted into *SmaI* and *SalI* treated pREP4-groESL via ligation.

2.3.3 | Site-directed mutagenesis in M210 of CYP21A2

p21b_bRED(-27) served as a template for a Quik change[®] mutagenesis changing position M210 of the bovine CYP21A2 sequence. For this, *Pfu* polymerase was used and mutagenesis was performed according to manual instructions from Agilent Technologies (Santa Clara, CA). All utilized primers are listed in Table S1.

2.4 | Purification of CYP21A2, cytochrome b_5 , and CPR₋₂₇ and in vitro conversion of medrane

Expression and purification of the bovine proteins CYP21A2, CPR₋₂₇, and cytochrome b_5 were performed as described before (Brixius-Anderko et al., 2015; Neunzig et al., 2014; Schiffer et al., 2016).

Aliquots were stored at -80°C until used. Protein concentration of bCPR₋₂₇ was calculated using a molar extinction coefficient $\epsilon_{585} = 2.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Vermillion, Janice, & Coon, 1978). The concentration of bovine cytochrome b_5 was determined using a difference extinction coefficient of $185 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for the absorbance change at 424–409 nm (Mulrooney & Waskell, 2000). CYP21A2 concentration was determined by performing difference spectroscopy according to Omura and Sato using a molar extinction coefficient of $\epsilon_{448} = 91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Omura & Sato, 1964). The determination of reaction velocity dependent on enzyme ratio were performed using the purified enzymes in a reconstituted in vitro system. The reaction was carried out in 250 μl reaction buffer containing potassium phosphate buffer (KPi buffer) [50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄; pH 7.4], 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose-6-phosphate and 1 U glucose-6-phosphate dehydrogenase. Purified bCYP21A2 (0.5 μM) and varying concentrations of the CPR₋₂₇, cytochrome b_5 and medrane were added to the reaction buffer. The reaction was started by application of 500 μM NADPH into the prewarmed reaction mixture, followed by incubation at 37°C for a defined time. The reaction was stopped by addition of 250 μl of chloroform.

2.5 | Steroid quantification by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)

For product quantification via RP-HPLC, the samples were extracted twice with double volumes of chloroform. The organic solvent was evaporated and the remaining steroids were suspended in 50% acetonitrile and separated on a Jasco reverse phase HPLC system of the LV2000 and LV900 series using a reverse-phase ec MN NucleoDur C18 (4.0 \times 125 mm; Macherey-Nagel, Bethlehem, PA). The column was kept at an oven temperature of 40°C. For measurements of the samples

an acetonitrile/water gradient was applied with a flow rate of 0.8 ml/min and absorbance of the substances was detected at a wavelength of 240 nm (Solution A: 50% ACN; Solution B: 100% ACN; 0–8 min: 100% A; 8–10 min: 10% A; 10–10.1 min 100% A, 10.1–15 min 100% A). The retention times of medrane (3.2 min) and premedrol (2.2 min) were verified with the respective standards. The relative peak area of each substance was used for calculation of the conversion rates and product concentration.

2.6 | Protein expression and whole-cell biocatalysis

Expression of CYP21A2 and redox partners was performed by inoculation of LB medium with glycerol stocks from transformed C43(DE3) *E. coli* cells with the vectors p21b_bRED(-27) (Figure 1a) or p21b_ArEt (Brixius-Anderko et al., 2015) and pGro12 (Nishihara, Kanemori, Kitagawa, & Yura, 1998) or pREP-groESL_b5 (Figure 1b). The seed culture was incubated at 37°C overnight. The main culture was generated in 300 ml baffled flasks by inoculation of 30 ml of terrific broth (TB) medium containing the respective antibiotics (100 µg/ml ampicillin and 50 µg/ml kanamycin) inoculated with the seed culture using a ratio of 1:100. When the OD_{600 nm} reached 0.5, the protein production was induced by the addition of 4 g L⁻¹ arabinose, 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) and 1 mM δ-aminolevulinic acid. The temperature was reduced to 30°C and the expression was performed for 24 hr at 150 rpm. After the expression period, the cells were harvested by centrifugation (2500 g, RT, 15 min) and washed with 50 mM KP_i. After the second centrifugation, the pellet was suspended in 50 mM KP_i adjusting cell densities of 24–96 g wet cell weight (g_{wcw})/L. The biotransformations were performed in 100 ml baffled flasks containing 10 ml of the culture unless otherwise stated. Polymyxin B (32.5 µg/ml) was added for cell permeabilization providing an improved substrate uptake (Janocha & Bernhardt, 2013). Biotransformations using batch cultivation were performed by the addition of 1.2 or 4.8 mM medrane and 2% or 8% (vol/vol) glycerol. Fed-batch fermentation was carried out by adding 1.2 mM medrane and 2% (vol/vol) glycerol, which was repeated for three times in 2 hr periods. Medrane conversions were performed at 30°C and 150 rpm for a defined time. The steroid substrate was dissolved in dimethyl sulfoxide, which did not exceed 4.8% in conversion cultures. The reaction was stopped by the addition of the double volume of chloroform.

2.7 | Computational methods

The crystal structure of the bovine CYP21 (PDB 3QZ1) was used as a receptor for docking into the wild-type, whereas the M210V mutant was constructed using the SWISS pdb viewer (version 4.0.1) (Guex & Peitsch, 1997). For the necessary preparation steps before docking AutoDock Tools (Windows version 1.5.6r3) was used (Sanner, 1999). AMBER charges were assigned to the amino acids of the protein part and Gasteiger-Marsili charges were computed for the heme cofactor.

To account for its oxidation state, the partial charges were adjusted to 0.400e on the iron atom and -0.348e to each of its ligating nitrogen atoms, respectively. The rectangular grid box (56 × 50 × 64) was centered around residue 210 To capture all conceivable binding positions of the ligands in this region. The grid spacing was set to the default value of 0.375 Å. Medrane and 17α-hydroxyprogesterone (17OHP) were constructed manually and energetically optimized using the MM+ force field parameters as implemented in HYPERCHEM (HYPERCHEM, Version 6.02, Hypercube Inc., Gainesville, FL). Atom types and Gasteiger-Marsili charges for use in AutoDock (version 4.2) (Huey, Morris, Olson, & Goodsell, 2007; Morris et al., 1998) were computed with in-house PERL scripts. During docking all rotatable bonds of the ligands were treated as flexible, whereas the protein part was kept rigid. A total of 250 runs of the Lamarckian Genetic Algorithm for each ligand were carried out, otherwise default parameters of AutoDock were applied. Hydrophobicity profiles of the full-length and truncated bCPR were determined and compared using the ExpASy online tool Protscale (Gasteiger et al., 2005) based on the amino acid scale of Kyte and Doolittle (1982).

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | In vivo effect of the N-terminal CPR truncation on premedrol formation in the *E. coli* whole-cell system

To enhance the previously established whole-cell system in *E. coli* C43(DE3) (Brixius-Anderko et al., 2015), we considered different aspects frequently limiting the efficiency of whole-cell biotransformations. The hydroxylating activity of bovine CYP21A2 depends on the coexistence of a suitable redox partner that mediates the transfer of two electrons from NADPH⁺ to CYP21A2. This event enables the enzymatic regioselective oxidation of medrane in C21 resulting in premedrol. Since an optimal electron supply is allocated to be an important factor in limiting the conversion yield of P450 mediated systems, we sought to optimize this by substitution of the coexpressed redox partner in the *E. coli* whole-cell system. Therefore, we modified the membrane-bound microsomal bovine CPR, which is the naturally occurring redox partner of bovine CYP21A2. According to a previous study, the N-terminal truncation of 27 amino acids (-27) of the human CPR led to an improved solubility and higher protein concentrations without affecting the enzyme's activity in a recombinant *E. coli* system (Sandee & Miller, 2011). For electron transfer, positively charged residues on the proximal site of CYP21A2 are interacting with acidic residues on the CPR surface (Hlavica, Schulze, & Lewis, 2003; Shen, Porter, Wilson, & Kasper, 1989). Since the removal of 27 N-terminal amino acids did not affect catalytic activity (Sandee & Miller, 2011), the binding sites should be unaffected. To this end, we generated a modified version of the plasmid p21b_bRED (Brixius-Anderko et al., 2015), harboring the encoding sequence of bCPR₋₂₇. The truncated protein-enhanced medrane conversion in whole-cell biotransformations by about 19%

compared with the reported *arh1/etp^{fd}* based redox system resulting in $196.8 \pm 24.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ although statistical significance cannot be assured (Figure 2). The presented premedrol production here did not exceed $320 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ as observed by Brixius-Anderko et al. using *arh1/etp^{fd}*, since the latter yield was obtained by multiple addition of lower substrate concentrations summed up to 1 mM. However, comparing premedrol production obtained by non-successive substrate addition, using the *bCPR₋₂₇* increased the premedrol production 2.4-fold compared with premedrol production supported by WT CPR (Brixius-Anderko et al., 2015).

This difference in efficiency is due to the membrane-bound nature of the WT microsomal CPR which makes it difficult to be overexpressed in a recombinant bacterial system. The removal of the N-terminal membrane-binding domain putatively increased the protein's solubility, as this region is described to be hydrophobic in rat (Gilep, Guryev, Usanov, & Estabrook, 2001), yeast (Venkateswarlu, Lamb, Kelly, Manning, & Kelly, 1998), human (Migita, Togashi, Minakawa, Zhang, & Yoshida, 2005) and rabbit (Masters, 2005) CPR. Additionally, in silico determination of hydrophobicity profiles and average hydrophobicity indices of the bovine CPR sequence revealed that the truncation of the N-terminus decreased hydrophobicity of the protein by 2.7%. This could result in increased stability and, therefore, higher expression level in the recombinant host. With this, the excessive accumulation and degradation of hydrophobic proteins in the cytoplasm is prevented. Consequently, this facilitated the presence of higher quantities of catalytically active protein. Additional in vitro experiments using different ratios of P450:CPR revealed that the increase of CPR up to 1:4 leads to an increase in reaction velocity (Figures S1 and 3) forming premedrol. Based on this

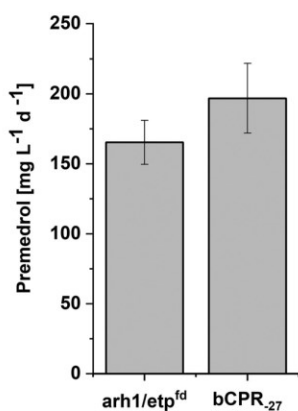


FIGURE 2 CYP21A2-mediated whole-cell conversion of medrane in dependence on the redox partners (*arh1/etp^{fd}*; *bCPR₋₂₇*). The 24 hr expression took place in TB medium after induction with 1 mM IPTG, δ -ALA, and 0.4% arabinose. The reactions were carried out in 30 ml of KP_i (pH 7.4), containing 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polymyxin B, 2% glycerol, 1 mM medrane, and 24 g_{wc}/L of recombinant *Escherichia coli* cells for 24 hr. Extracted steroids were quantified via RP-HPLC. Values represent the mean of three conversion experiments. Error bars indicate respective standard deviations. IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactoside; RP-HPLC, reverse-phase high-performance liquid chromatography; δ -ALA, δ -aminolevulinic acid

observation, *bCPR₋₂₇* was consecutively used for all subsequent experiments.

3.2 | In vitro effect of cytochrome *b₅* on premedrol formation

As shown before by using a truncated CPR version, the efficiency of electron transfer is one of several limiting factors on whole-cell medrane conversions in recombinant *E. coli* (Figure 2). Thus, we sought to introduce a putatively supporting protein that is able to interact with the CPR and/or CYP21A2. In microsomes, cytochrome *b₅* is colocalized with CYP21A2 and CPR and has previously been shown to support several individual P450s in their reaction efficiency, for instance, CYP3A4, CYP2B4 and CYP17A1 (Bart & Scott, 2017; Bridges et al., 1998; Gilep et al., 2001; Katagiri, Kagawa, & Waterman, 1995). However, the supportive effect is dependent on the individual P450 isoform as well as the corresponding redox partner and the molar ratio of the present enzymes (Imai & Sato, 1977; Lu, West, Vore, Ryan, & Levin, 1974; Morgan & Coon, 1984; Schenkman, Jansson, & Robie-Suh, 1976).

The mechanism of cytochrome *b₅* action is hypothesized as follows: (a) allosteric activation of P450 supporting the correct positioning towards CPR (Miller, 2005), (b) cytochrome *b₅* acts as an electron transfer intermediate between the reductase and P450s. Whereas the CPR transfers the first electron with high efficiency, cytochrome *b₅* provides the rate-limiting input of the second electron to P450 (Schenkman & Jansson, 2003), (c) complexation of cytochrome *b₅* to P450 leading to a stabilization of the oxycytochrome P450 complex. In this way, cytochrome *b₅* can provide a faster transfer of the second electron than the formation and release of a superoxide anion. The three suggested mechanisms allow the

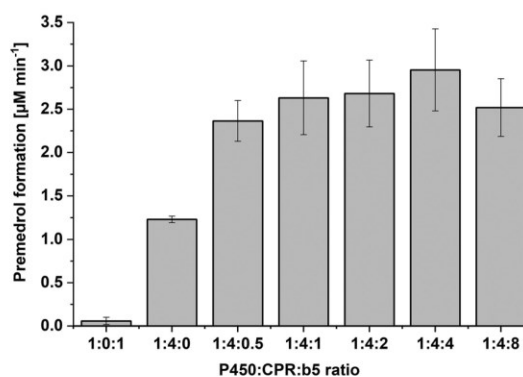


FIGURE 3 Time-dependent in vitro conversion of medrane to its 21-hydroxylated product, premedrol, in dependence on the CYP21A2:CPR:cytochrome *b₅* ratio. The in vitro conversions of 100 μM medrane were performed utilizing purified *bCYP21A2*, *bCPR₋₂₇* and cytochrome *b₅* in KP_i buffer. Independent samples were measured within the linear range (3, 5, 10, and 30 min) via RP-HPLC. Error bars indicate the respective standard deviation. *b₅*: cytochrome *b₅*; CPR, *CPR₋₂₇*; P450, CYP21A2; RP-HPLC, reverse-phase high-performance liquid chromatography

increase of product formation without influencing NADPH consumption (Gorsky & Coon, 1986; Gruenke, Konopka, Cadieu, & Waskell, 1995). To investigate the effect of cytochrome b_5 on CYP21A2 activity, we performed *in vitro* conversions of medrane using the purified bovine enzymes of CYP21A2, bCPR₋₂₇ and cytochrome b_5 (Table S2) at varying ratios from 1:4:0 to 1:4:8 (Figure 3). The optimal P450:CPR ratio was previously determined to be 1:4, as shown in Figure S1. At a P450:CPR:cytochrome b_5 ratio of 1:0:1 no product was formed highlighting the mandatory role of CPR for CYP21A2 activity which increased up to 1.25 μM premedrol/min at a ratio of 1:4:0 (Figure 3). We observed that cytochrome b_5 has a supporting effect on product formation, which is increased at least by 90% at a ratio of 1:4:0.5 compared with 1:4:0 and did not alter considerably at higher P450:bCPR₋₂₇:cytochrome b_5 ratios (Figure 3). The lack of premedrol production at ratio 1:0:1 confirmed the above-stated hypothesis that the electron transfer, at least the transfer of the first electron, is exclusively mediated by CPR and cannot be replaced by cytochrome b_5 (Miller, 2005; Schenkman & Jansson, 2003). The enhancing effect of the cytochrome b_5 at ratios of 1:4:0.5 and above shows that despite the removal of the first 27 amino acids of the CPR protein sequence, interaction between both, CPR and cytochrome b_5 , still is possible resulting in a higher reaction velocity. With regard to the elevating effect of cytochrome b_5 on the CYP21A2 related biotransformation, hypotheses (a)–(c) are conceivable in this context. By contrast, a previous study described an inhibitory effect of

cytochrome b_5 on the CYP21A2 activity *in vitro* (Wang et al., 2017). The opposite effect demonstrated there may, on one hand, be due to the use of enzymes from different sources. Whereas in our experiments all enzymes originate exclusively from the bovine species, in those experiments human CYP21A2, cytochrome b_5 and rat CPR were used. Moreover, different substrates were investigated (medrane and progesterone, respectively), which could affect the influence of cytochrome b_5 on the performance of P450 (Bart & Scott, 2017). Finally, in the experiments described by Wang et al. (2017), excessive concentrations of cytochrome b_5 (1:300) were used, which may lead to the contrary effect as observed in our studies, since we did not exceed a P450 to cytochrome b_5 ratio of 1:8.

3.3 | Protein engineering of bCYP21A2 via site-directed mutagenesis and *in vivo* screening

Another possible limiting factor in biotransformations is steric hindrance of the substrate access into the active site, preventing substrate-uptake or product release. Compared with the natural CYP21A2 substrate 17 α -hydroxyprogesterone (17OHP) (Figures 4a and 4c) medrane possesses an additional methyl group in C6 and a hydroxy group in C11 (Figures 4b and 4d). Hence, modification of the substrate access channel could lead to higher efficiency in medrane

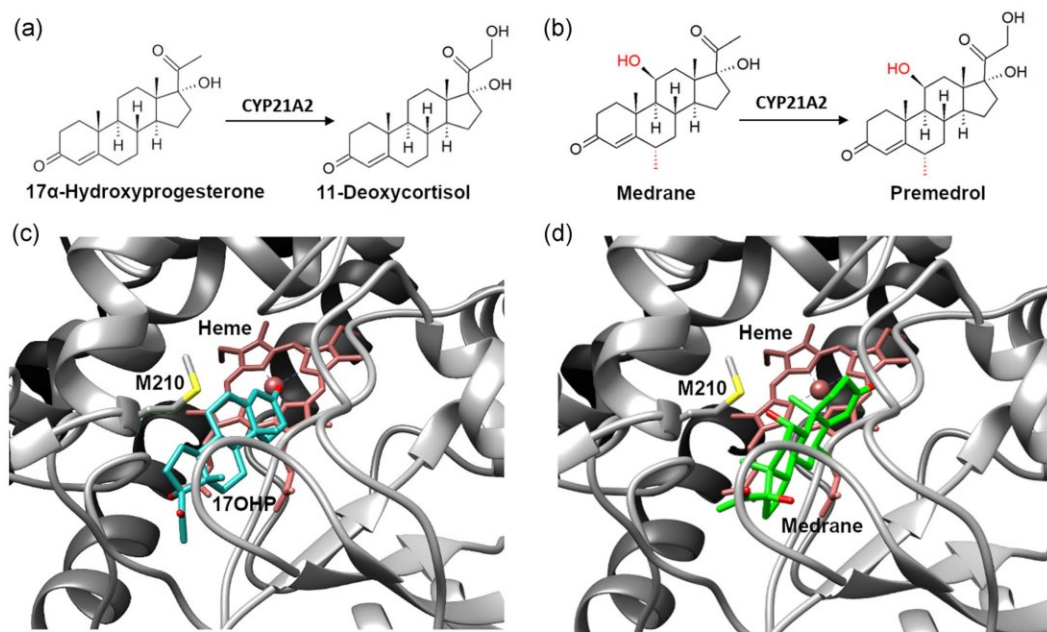


FIGURE 4 Scheme of the CYP21A2-catalyzed C21-hydroxylation and structure of the wild type (WT) CYP21A2 substrate access channel in the presence of 17 α -hydroxyprogesterone (17OHP). (a) The natural substrate 17OHP is hydroxylated by CYP21A2 yielding 11-deoxycortisol. (b) The synthetic steroid medrane is hydroxylated at position C21 producing premedrol. Compared to 17OHP, medrane possesses an additional hydroxy group at C11 and a methyl group at C6 as depicted in red. (c, d) Top view on the CYP21A2 substrate access channel illustrating the location of methionine 210, sulfur colored in yellow) and the ligand. (c) 17OHP as being present in the X-ray protein structure of bovine CYP21A2 (PDB: 3QZ1 [marine sticks] (Zhao et al., 2012). (d) Obtained docking position of medrane (green sticks). Oxygen atoms of the steroidal structure are depicted in red, the prosthetic heme group in pink, and its iron atom as sphere [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

conversion. According to Zhao et al. (2012), the methionine in position 210 of bCYP21A2 is part of the distal 17OHP-binding region which interacts with the substrate within 4 Å and is located at the substrate access channel (Figure 4c). To enhance substrate access to the active site, we thus examined the impact of steric effects in product formation *in vivo*. To this end, we performed site-directed mutagenesis of M210 by introducing other hydrophobic residues of different size (valine, glycine, alanine, isoleucine and phenylalanine). Indeed, substitution with the smaller valine yielded a 1.3-fold increase in premedrol formation (Figure 5a), resulting in $255 \pm 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 48 \text{ hr}^{-1}$ (Figure 5b), whereas the introduction of smaller residues into position M210 produced premedrol levels not different from that of the WT (Figure 5a). We assume that steric and hydrophobic effects play a role in this context. Since valine is a more hydrophobic residue than methionine (Eisenberg, 1984; Kyte and Doolittle, 1982), hydrophobic interactions could be implicated to allow correct substrate orientation and faster guidance towards the catalytically active heme. Our docking results showed energetically preferred binding positions of both medrane and 17OHP in the same region as the ligand in the crystal structure (3QZ1), considering its limited resolution of 3 Å (see Figures 4c and 4d). Interestingly, the obtained docking conformations in the M210V mutant were identical to those in the wild type (data not shown). However, since residue 210 is not in direct contact with the ligands, the introduction of a smaller side chain (valine) obviously does not affect their binding position. Nevertheless, it is likely that conformational changes of the protein go along with the diffusion of the ligands further to the active site, which, however, cannot be elucidated by docking. Therefore, we assume that the smaller side chain in position 210 affects the dynamics of substrate access indirectly, for example by

altered enzyme stability or expression level. However, it cannot be ruled out that the mutation may facilitate the substrate's access by conformational changes of the protein. Unfortunately, experiments analyzing modifications of the active site (M197 with saturation mutagenesis) or the surface (L442A and L224R) of CYP21A2 for altered solubility did not produce any improved variants for premedrol production (data not shown).

3.4 | Combinatorial application of developed strategies on whole-cell biotransformation of medrane

Although the effect of CPR truncation on premedrol production and CYP21A2 mutagenesis has been demonstrated in the *E. coli* whole-cell system, the effects of cytochrome b_5 copresence were so far shown only *in vitro*. This encouraged us to create a functional *in vivo* whole-cell system that combines the three optimization strategies. To keep the number of expression vectors to a limit of two, we created a vector containing the genes for the chaperonins GroES/EL and cytochrome b_5 . For this purpose, we modified the vector pREP4-groESL (Cole, 1996) and introduced the gene for cytochrome b_5 under the control of a modified T7 promoter. As the P450:CPR: b_5 ratio 1:4:0.5 is sufficient to have an elevating impact on product formation *in vitro* (Figure 3) we introduced a point mutation into the T7 promoter according to Ikeda et al. (1992). This modification leads to a residual promoter activity of 13%, which prevents excessive cytochrome b_5 production and thus maintains efficient coexpression of bCPR₋₂₇ and CYP21A2. *E. coli* C43(DE3) was cotransformed with the WT CYP21A2 (p21b_bRED(-27)) or modified CYP21A2

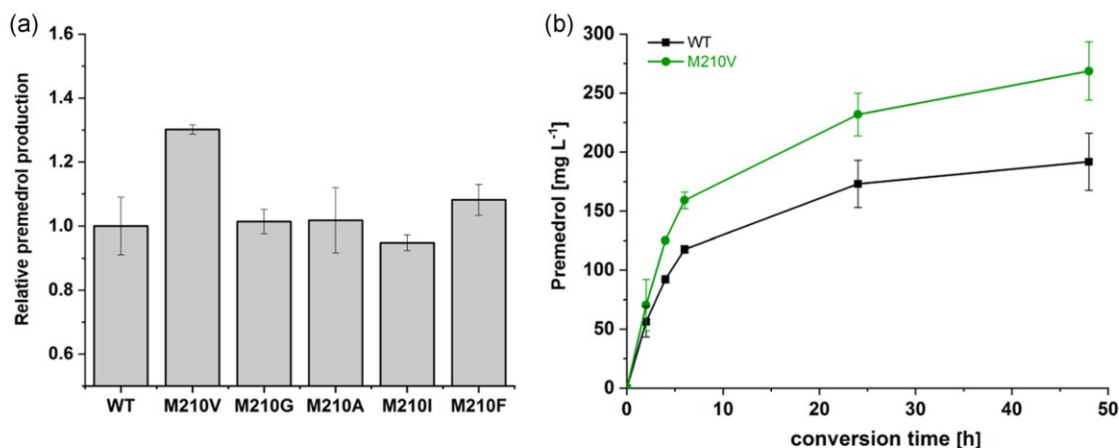


FIGURE 5 *In vivo* conversion of medrane dependent on replacements in position M210 of bCYP21A2. (a) Relative premedrol production standardized to the WT (M210). Premedrol concentrations were analyzed via RP-HPLC after a conversion period of 24 hr. (b) Absolute premedrol concentration dependent on the conversion time. The 24 hr expression period took place in TB medium after induction with 1 mM IPTG, δ -ALA, and 0.4% arabinose. The reactions were carried out in 30 ml of KPI (pH 7.4) containing 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polymyxin B, 2% glycerol, 1.2 mM medrane, and 24 $\text{g}_{\text{wet wt}}/\text{L}$ of recombinant *Escherichia coli* cells for 24 hr. Extracted steroids were quantified via RP-HPLC. Values represent the percentage mean of three conversion experiments. Error bars indicate the respective standard deviation. Values were normalized on premedrol productions of the WT. IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactoside; RP-HPLC, reverse-phase high-performance liquid chromatography; TB, terrific broth; WT, wild type; δ -ALA, δ -aminolevulinic acid [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

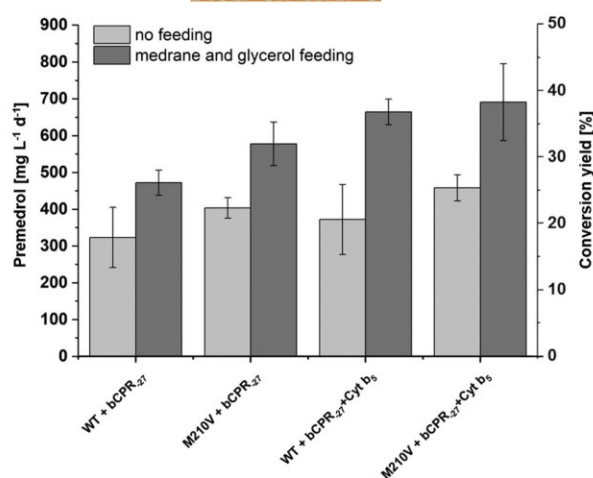


FIGURE 6 CYP21A2-mediated whole-cell conversion of medrane dependent on the CYP21A2 variant (WT or M210V) and the presence of cytochrome b_5 (Cyt b_5). The 24 hr expression period took place in TB medium after induction with 1 mM IPTG, δ -ALA and 0.4% arabinose. The reactions were carried out in 10 ml of KP_i buffer (pH 7.4) for 24 hr, containing 32.5 μ g/ml polymyxin B, 2% glycerol and 96 g_{wc}/L of recombinant *Escherichia coli* cells. 4.8 mM of medrane was either added at the beginning of the conversion period (no feeding, bright columns) or stepwise in 2-hr time slots each with 1.2 mM medrane (t₀-t₆) and 2% glycerol (t₂-t₆) (feeding, dark columns). Extracted steroids were quantified via RP-HPLC. Values represent the mean of three conversion experiments. Error bars indicate respective standard deviations. IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactoside; RP-HPLC, reverse-phase high-performance liquid chromatography; TB, terrific broth; δ -ALA, δ -aminolevulinic acid

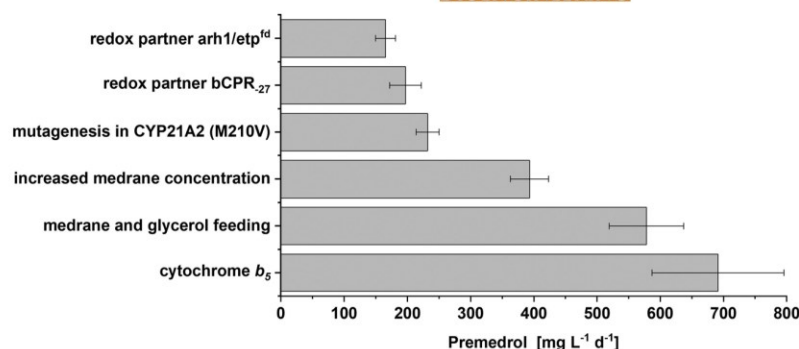
containing vector (p21b_M210V_bRED(-27)) and with the chaperonin vector (pGro12) or chaperonins and cytochrome b_5 containing vector (pREP4-groESL_cytb₅), respectively (Figure 1). Biotransformation was performed by adding 4.8 mM medrane (Figure 6, bright columns) and 8% (vol/vol) glycerol. In batch cultures (Figure 6, bright columns) the coexpression of cytochrome b_5 with WT CYP21A2 showed an elevating effect on premedrol production by 15% compared with cultures solely expressing WT CYP21A2. The substitution M210V in CYP21A2 yielded 404 ± 28 mg·L⁻¹·d⁻¹, corresponding to a 25% increased product formation compared with WT CYP21A2, which is in good agreement with the observations of the mutant screening shown above (Figure 5). The additional coexpression of cytochrome b_5 slightly increased premedrol formation by further 13%, summing up to 41% compared with WT CYP21A2 without cytochrome b_5 under batch-cultivation conditions. To investigate whether a possible substrate inhibition could be a bottleneck of the process encountered with high initial substrate concentrations, we changed the protocol from batch- into fed-batch cultivation. To this end, we applied 1.2 mM of the steroidal substrate medrane together with 2% glycerol in four consecutive feeding steps, every 2 hr (Figure 6, dark columns). Indeed, the successive addition of the substrates, medrane and glycerol, had an increasing effect on final premedrol concentrations as well as on the respective

conversion yields. The latter was enhanced by a maximum of 16% (WT CYP21A2 with coexpressed cytochrome b_5) when using fed-batch cultivation in comparison to the batch method.

The fed-batch method led to substantially higher product concentrations for both, the CYP21A2 WT and M210 mutant showing an enhancement by 46% and 43%, respectively, compared with respective premedrol concentrations resulted from batch cultivation (Figure 6, bright columns). This resulted in concentrations of 472 ± 34 (WT) and 578 ± 59 mg·L⁻¹·d⁻¹ (M210V) (Figure 6, dark columns). The enhancing effect of the amino acid replacement M210V in CYP21A2 is reflected by an improvement of 22% in premedrol productivity in fed-batch cultivation, compared with the WT CYP21A2. This improvement corresponds to a final product concentration of 578 ± 59 mg·L⁻¹·d⁻¹. However, the enhancing effect of the mutation M210V seemed to be limited to 4% (691 ± 104 mg·L⁻¹·d⁻¹), when cytochrome b_5 is coexpressed compared with WT CYP21A2 coexpressed with cytochrome b_5 (664 ± 35 mg·L⁻¹·d⁻¹). The premedrol production is leveled off at 691 ± 104 mg·L⁻¹·d⁻¹. This indicates that there are still other aspects, limiting the process such as restricted substrate uptake or product release. Cultures coexpressing cytochrome b_5 show highest divergence between batch- and fed-batch induced premedrol productivity which correspond to an increase by 79% and 51% of the WT and M210V variant, respectively, compared with the respective batch induced premedrol productivity. The improved method led to final space-time yields of 665 ± 35 and 691 ± 104 mg·L⁻¹·d⁻¹, respectively. In fed-batch cultivation the coexpression of cytochrome b_5 results in an elevation of final premedrol concentrations by 40% when WT CYP21A2 is used and by 19% when mutant M210V is applied (compared with the respective fed-batch cultivation values without cytochrome b_5 coexpression). The latter reflects the maximum productivity and conversion yield obtained here by the optimized process.

Taken together, we showed that by successive substrate feeding we reduced inhibition encountered with high initial substrate concentrations. This effect was also observed under conditions, where the conversion yield decreases asymptotically with increasing substrate concentrations indicating a substrate-mediated inhibition of CYP21A2 (Figure S2). Lin et al. showed the same phenomenon for several P450 isoforms, and, thus, proposed a two-site model for understanding dose-depending substrate inhibition in P450-catalyzed reactions. They hypothesized that the substrate has high affinity to the active site and lower affinity to a second binding site, which is occupied at extensive concentrations of the substrate (Lin et al., 2001). This model can be helpful to describe the higher productivity by feeding experiments, where substrate concentrations are kept low due to continuous substrate consumption. In vivo, this mechanism could be used for a natural regulation process, since steroid metabolism is a sensitive, fine-tuned physiological system. Especially the activity of CYP21A2 is needed to be regulated for example by feedback-responses, as the C21 hydroxylation results in activation of the steroids to act as highly potent ligands of the glucocorticoid or MR (Attardi et al., 2007; Boland, 1961). Further, we

FIGURE 7 Summary of the milestones during optimization of the presented whole-cell system. The individual stages are visualized in chronological order showing their impact on premedrol production per 24 hr



showed that the enhancing effects of the M210V mutation and cytochrome *b*₅ on CYP21A2 activity are recognizable more clearly under the conditions of fed-batch cultivation. Thus, we assume that the inhibitory effect, which is related to a high substrate concentration is a major limitation of the process. Further optimization to exploit the complete catalytic potential could be realized by controlled fermentation in an automated bioreactor, that allows continuous titration of the substrate, which is ideally matched on residual substrate concentration within the culture.

4 | CONCLUSION

We successfully optimized the CYP21A2-based whole-cell system in *E. coli*. The application of a truncated CPR and coexpression of cytochrome *b*₅ led to increased efficiency of premedrol formation putatively based on an improved electron supply or allosteric interaction (Figure 7). The amino acid replacement M210V located in the substrate access channel caused a slightly increased product formation. The visibility of the supportive optimizations was limited by single-step substrate application, which we finally uncovered by successive substrate feeding. Applying the enhanced fed-batch protocol together with the use of bCPR₂₇ and CYP21A2_M210V as well as the coexpression of cytochrome *b*₅ enabled us to produce up to 691 mg·L⁻¹·d⁻¹ premedrol within a biotechnological *E. coli* based whole-cell system which is a more than a 100% improvement compared with our previously reported system under similar conditions (Brixius-Anderko et al., 2015). This is a big step forward towards application of this system in an industrial process for the sustainable production of the methylprednisolone-precursor premedrol.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Bernd Janocha and Dr. Claus Lattemann for having introduced us to the needs of industrial steroid production.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L. K. drafted the manuscript and performed in vivo experiments. S. B. A. participated in study design and manuscript drafting, created the M210 mutant library, performed in vivo experiments and purified CYP21A2. M. M. designed and established the truncated CPR-dependent whole-cell system, performed in vivo experiments and purified cytochrome *b*₅, in addition to participation in the interpretation of the results. D. T. generated the pREP4-groESL_b5 vector, performed in vitro experiments, and purified bCPR₂₇. M. C. H. performed and interpreted the docking simulations. F. H. and R. B. designed the study, participated in the interpretation of the results and manuscript drafting.

ORCID

Simone Brixius-Anderko  <http://orcid.org/0000-0002-3036-9285>

Frank Hannemann  <http://orcid.org/0000-0001-7991-9033>

Rita Bernhardt  <http://orcid.org/0000-0003-0961-7755>

REFERENCES

- Attardi, B. J., Zeleznik, A., Simhan, H., Chiao, J. P., Mattison, D. R., & Caritis, S. N. (2007). Comparison of progesterone and glucocorticoid receptor binding and stimulation of gene expression by progesterone, 17- α hydroxyprogesterone caproate, and related progestins. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 197, 599–599.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.05.024>
- Bart, A. G., & Scott, E. E. (2017). Structural and functional effects of cytochrome b5 interactions with human cytochrome P450 enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 292, 20818–20833. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000220>
- Bavetta, L. A., Bekhor, I., Shah, R., O'Day, P., & Nimni, M. (1962). Metabolic and anti-inflammatory properties of 6-methyl prednisolone alone and in combination with anabolic hormones. *Endocrinology*, 71, 221–226. <https://doi.org/10.1210/endo-71-2-221>
- Bernhardt, R. (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology*, 124, 128–145. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.01.026>
- Bernhardt, R., & Urlacher, V. B. (2014). Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: Chances and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 6185–6203. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5767-7>

- Boland, E. W. (1961). Antirheumatic potency of chemically modified adrenocortical steroids. *American Journal of Medicine*, 31, 581–590. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(61\)90142-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(61)90142-5)
- Bridges, A., Gruenke, L., Chang, Y. T., Vakser, I. A., Loew, G., & Waskell, L. (1998). Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b_5 and cytochrome P450 reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 17036–17049. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.27.17036>
- Brixius-Anderko, S., Schiffer, L., Hannemann, F., Janocha, B., & Bernhardt, R. (2015). A CYP21A2 based whole-cell system in *Escherichia coli* for the biotechnological production of premedrol. *Microbial Cell Factories*, 14, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0333-2>
- Bureik, M., & Bernhardt, R. (2007). Steroid hydroxylation: Microbial steroid biotransformations using cytochrome P450 enzymes. *Modern Biooxidation: Enzymes, Reactions and Applications*, 155–176. <https://doi.org/10.1002/9783527611522.ch6>
- Cole, P. A. (1996). Chaperone-assisted protein expression. *Structure*, 4, 239–242. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00028-7)
- Diederich, S., Eigendorff, E., Burkhardt, P., Quinkler, M., Bumke-vogt, C., Rochel, M., ... Ba, V. (2015). Important Pharmacokinetic Determinant for the Activity of Synthetic Mineralo- and Glucocorticoids, 87, 5695–5701. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020970>
- Edwards, V. H. (1970). The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 12, 679–712. <https://doi.org/10.1002/bit.260120504>
- Eisenberg, D. (1984). Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 53, 595–623. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.53.070184.003115>
- Farman, N., & Rafestin-Oblin, M.-E. (2017). Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *American Journal of Physiology—Cell Physiology*, 280, F181–F192. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.2.f181>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *Proteomics protocols handbook* (pp. 571–607). Humana Press.
- Gilep, A. A., Guryev, O. L., Usanov, S. A., & Estabrook, R. W. (2001). An enzymatically active chimeric protein containing the hydrophilic form of NADPH-cytochrome P450 reductase fused to the membrane-binding domain of cytochrome b_5 . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284, 937–941. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5075>
- Gorsky, L. D., & Coon, M. J. (1986). Effects of conditions for reconstitution with cytochrome b_5 on the formation of products in cytochrome P-450-catalyzed reactions. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 14, 89–96.
- Gruenke, L. D., Konopka, K., Cadieu, M., & Waskell, L. (1995). The stoichiometry of the cytochrome P-450-catalyzed metabolism of methoxyflurane and benzphetamine in the presence and absence of cytochrome b_5 . *Journal of Biological Chemistry*, 270, 24707–24718. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.42.24707>
- Gueux, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18, 2714–2723. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181505>
- Henzen, C. (2003). Therapie mit Glukokortikoiden: Risiken und Nebenwirkungen. *Schweizerisches Medizin-Forum*, 3(19), 442–446. <https://doi.org/10.4414/smf.2003.04866>
- Hlavica, P., Schulze, J., & Lewis, D. F. V. (2003). Functional interaction of cytochrome P450 with its redox partners: A critical assessment and update of the topology of predicted contact regions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 96, 279–297. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(03\)00152-1](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(03)00152-1)
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., & Goodsell, D. S. (2007). Software news and update. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, 28(6), 1145–1152. <https://doi.org/10.1002/jcc>
- Ikeda, R. A., Ligman, C. M., & Warshamana, S. (1992). T7 promoter contacts essential for promoter activity in vivo. *Nucleic Acids Research*, 20, 2517–2524. <https://doi.org/10.1093/nar/20.10.2517>
- Imai, Y., & Sato, R. (1977). The roles of cytochrome b_5 in a reconstituted N-demethylase system containing cytochrome P-450. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 75, 420–426. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)91059-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(77)91059-2)
- Janocha, S., & Bernhardt, R. (2013). Design and characterization of an efficient CYP105A1-based whole-cell biocatalyst for the conversion of resin acid diterpenoids in permeabilized *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(17), 7639–7649. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5008-5>
- Kadmiel, M., & Cidlowski, J. A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34, 518–530. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.07.003>
- Katagiri, M., Kagawa, N., & Waterman, M. R. (1995). The role of cytochrome b_5 in the biosynthesis of androgens by human P450c17. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 317, 343–347. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1173>
- Klymiuk, M. C., Neunzig, J., Bernhardt, R., Sánchez-guijo, A., Hartmann, M. F., & Wudy, S. A. (2017). Journal of steroid biochemistry and molecular biology efficiency of the sulfate pathway in comparison to the Δ_4 - and Δ_5 -pathway of steroidogenesis in the porcine testis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.10.017>
- Koechlin, B. A., Kritchevsky, T. H., & Gallagher, T. (1951). Partial synthesis of compounds related to adrenal cortical hormones. XV. 17α , 21-dihydroxy- Δ_4 -pregnene-3, 20-dione (Reichstein's "Substance S"). *Journal of the American Chemical Society*, 73, 189–194.
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157, 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Lin, Y., Lu, P., Tang, C., Mei, Q., Sandig, G., Rodrigues, A. D., ... Shou, M. (2001). Substrate inhibition kinetics for cytochrome P450-catalyzed reactions. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 29, 368–374.
- Lu, A. Y., West, S. B., Vore, M., Ryan, D., & Levin, W. (1974). Role of cytochrome b_5 in hydroxylation by a reconstituted cytochrome P-450-containing system. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 6701–6709.
- Masters, B. S. S. (2005). The journey from NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase to nitric oxide synthases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 507–519. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.165>
- McMaster, A., & Ray, D. W. (2008). Drug Insight: Selective agonists and antagonists of the glucocorticoid receptor. *Nature clinical practice. Endocrinology & Metabolism*, 4, 91–101. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0745>
- Migita, C. T., Togashi, S., Minakawa, M., Zhang, X., & Yoshida, T. (2005). Evidence for the hydrophobic cavity of heme oxygenase-1 to be a CO-trapping site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 584–589. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.045>
- Miller, W. L. (2005). Minireview: Regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology*, 146, 2544–2550. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0096>
- Miroux, B., & Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, 260(3), 289–298.
- Morgan, E. T., & Coon, M. J. (1984). Effects of cytochrome b_5 on cytochrome P-450-catalyzed reactions. Studies with manganese-substituted cytochrome b_5 . *Drug Metabolism and Disposition*, 12, 358–364.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., ... Ai, M. E. T. (1998). Automated docking using a Lamarckian

- Genetic Algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19, 1639–1662.
- Mulrooney, S. B., & Waskell, L. (2000). High-level expression in *Escherichia coli* and purification of the membrane-bound form of cytochrome *b₅*. *Protein Expression and Purification*, 19, 173–178. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1228>
- Neunzig, J., Milhim, M., Schiffer, L., Khatri, Y., Zapp, J., Sánchez-Guijo, A., ... Bernhardt, R. (2017). The steroid metabolite 16(β)-OH-androstenedione generated by CYP21A2 serves as a substrate for CYP19A1. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 167, 182–191. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2017.01.002>
- Neunzig, J., Sánchez-Guijo, A., Mosa, A., Hartmann, M. F., Geyer, J., Wudy, S. A., & Bernhardt, R. (2014). A steroidogenic pathway for sulfonated steroids: The metabolism of pregnenolone sulfate. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 144, 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.07.005>
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., & Yura, T. (1998). Chaperone coexpression plasmids: Differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen Cryj2, in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), 1694–1699.
- Omura, T., & Sato, R. (1964). The carbon of liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 2370–2378.
- Sagadin, T., Riehm, J. L., Milhim, M., Hutter, M. C., & Bernhardt, R. (2018). Binding modes of CYP106A2 redox partners determine differences in progesterone hydroxylation product patterns. *Communications Biology*, 1(1), 199. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0104-9>
- Sandee, D., & Miller, W. L. (2011). High-yield expression of a catalytically active membrane-bound protein: Human P450 oxidoreductase. *Endocrinology*, 152, 2904–2908. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0230>
- Sanner, M. F. (1999). Python: A programming language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 17(1), 57–61.
- Schenkman, J. B., & Jansson, I. (2003). The many roles of cytochrome *b₅*. *Pharmacology and Therapeutics*, 97, 139–152. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00327-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00327-3)
- Schenkman, J. B., Jansson, I., & Robie-Suh, K. M. (1976). The many roles of cytochrome *b₅* in hepatic microsomes. *Life Sciences*, 19, 611–623. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(76\)90156-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(76)90156-9)
- Schiffer, L., Brixius-Anderko, S., Hannemann, F., Zapp, J., Neunzig, J., Thevis, M., & Bernhardt, R. (2016). Metabolism of oral turinabol by human steroid hormone-synthesizing cytochrome P450 Enzymes. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 44, 227–237. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.066829>
- Schäcke, H. (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 96, 23–43. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00297-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00297-8)
- Schäcke, H., Schottelius, A., Döcke, W. D., Strehlke, P., Jaroch, S., Schmees, N., ... A. K. (2004). Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 227–232. <https://doi.org/10.1073/pnas.0300372101>
- Shen, A. L., Porter, T. D., Wilson, T. E., & Kasper, C. B. (1989). Structural analysis of the FMN binding domain of NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 7584–7589.
- Urlacher, V. B., & Girhard, M. (2012). Cytochrome P450 monooxygenases: An update on perspectives for synthetic application. *Trends in Biotechnology*, 30, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.012>
- Venkateswarlu, K., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Manning, N. J., & Kelly, S. L. (1998). The N-terminal membrane domain of yeast NADPH-cytochrome P450 (CYP) oxidoreductase is not required for catalytic activity in sterol biosynthesis or in reconstitution of CYP activity. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 4492–4496. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.8.4492>
- Vergères, G., & Waskell, L. (1995). Cytochrome *b₅*, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie*, 77, 604–620. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(96\)88176-4](https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)88176-4)
- Vermillion, Janice, L., & Coon, M. (1978). Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Spectral characterization of oxidation-reduction states. *Journal of Biological Chemistry*, 253(8), 2694–2704.
- Wade, R. C., Winn, P. J., Schlichting, I., & Sudarso (2004). A survey of active site access channels in cytochromes P450. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98, 1175–1182. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.02.007>
- Wang, C., Pallan, P. S., Zhang, W., Lei, L., Yoshimoto, F. K., Waterman, M. R., ... Guengerich, X. F. P. (2017). Functional analysis of human cytochrome P450 21A2 variants involved in congenital adrenal hyperplasia. *Journal of Biological Chemistry*, 450, 10767–10778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.792465>
- Zhao, B., Lei, L., Kagawa, N., Sundaramoorthy, M., Banerjee, S., Nagy, L. D., ... Waterman, M. R. (2012). Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 10613–10622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323501>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: König L, Brixius-Anderko S, Milhim M, et al. Identification and circumvention of bottlenecks in CYP21A2-mediated premedrol production using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019;1–11. <https://doi.org/10.1002/bit.27246>

Supplementary information

Table S1: Primers used for site-directed mutagenesis in M210 of bovine CYP21A2 and cloning of cytochrome *b*₅. The modified triplets are depicted in bold.

F_M210V	CTATTCAAATTTTAGAT GTGGT ACCATTCTTACGTTTCTTC
R_M210V	GAATGGTAC CAC ATCTAAAATTTGAATAGACCAGTGATC
F_M210G	CTATTCAAATTTTAGAT GCGT ACCATTCTTACGTTTCTTC
R_M210G	GAATGGTAC GCC ATCTAAAATTTGAATAGACCAGTGATC
F_M210A	CTATTCAAATTTTAGAT GCAGT ACCATTCTTACGTTTCTTC
R_M210A	GAATGGTACT GC ATCTAAAATTTGAATAGACCAGTGATC
F_M210F	CTATTCAAATTTTAGAT TTCG TACCATTCTTACGTTTCTTC
R_M210F	GAATGGTAC GAA ATCTAAAATTTGAATAGACCAGTGATC
F_M210I	CTATTCAAATTTTAGAT ATTG TACCATTCTTACGTTTCTTC
R_M210I	GAATGGTACA AAT ATCTAAAATTTGAATAGACCAGTGATC
F_Sall_T7*	GATCGTCGACAAATTAATACGACTCTCTATAGGGAGACC
R_T7term_SmaI	CCCGGGTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACC

Table S2: concentration of recombinant bovine enzymes CPR₋₂₇, cytochrome *b*₅ and CYP21A2

	concentration of purified protein [μM]
bovine CPR ₋₂₇	146
bovine cytochrome <i>b</i> ₅	670
bovine CYP21A2	375

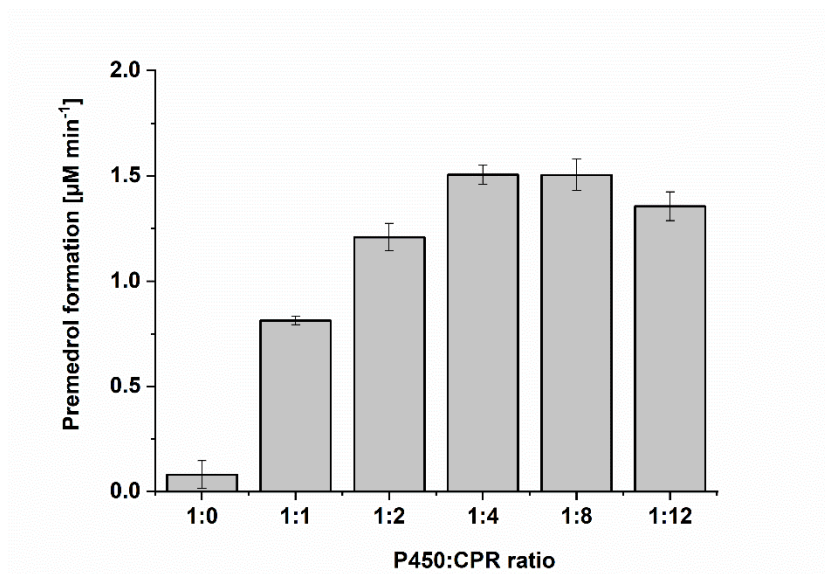


Figure S1: Time-dependent *in vitro* conversions of medrane to its 21-hydroxylated product premedrol in dependence on the CYP21A2 to CPR ratio. The *in vitro* conversions of 100 μM medrane were performed utilizing purified bCYP21A2 and CPR in 50 mM potassium phosphate buffer. Independent samples were measured within the linear range (3, 5, 10 and 30 min) via RP-HPLC. Error bars indicate the respective standard deviation. P450: CYP21A2; CPR: bCPR₋₂₇.

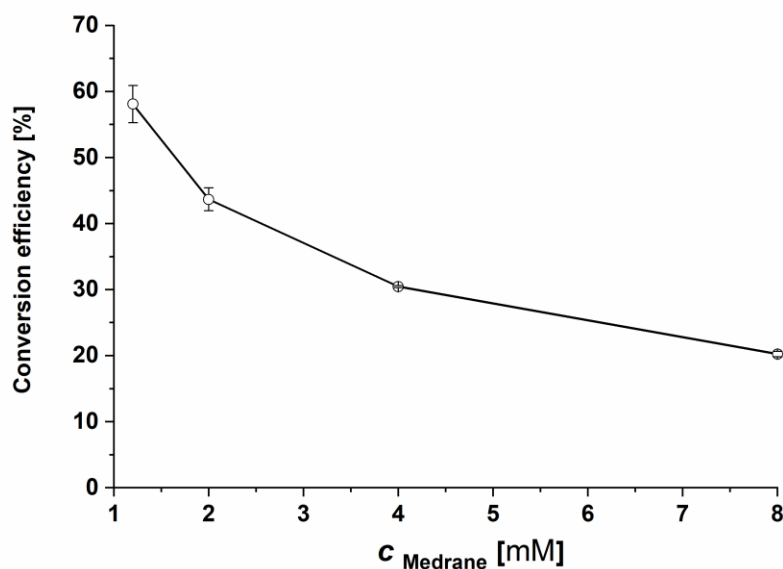


Figure S2: Conversion efficiency of WT CYP21A2 co-expressed with cytochrome b_5 in dependence on the substrate concentration. Biotransformations were performed using varying medrane concentrations (1.2 to 8 mM) in KPi buffer supplemented with 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ polymyxin B and 8 % glycerol. Reaction takes place in 2 mL reaction volume in test tubes. Samples were taken after 24 h conversion time and premedrol production was quantified via RP-HPLC. Values correspond to the mean of three conversion experiments. Error bars indicate the respective standard deviation.

2.3 Lisa König et al. (2020b)

Mixed-culture Fermentation for Enhanced C21-hydroxylation of Glucocorticoids

Lisa König, Sabine Szczesny, Simone Brixius-Anderko, Rita Bernhardt, Frank Hannemann

Journal of Biotechnology. 2020;314-315:14-24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.03.008>.

Reprinted with the permission of Elsevier.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Biotechnology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbiotec

Mixed-culture fermentation for enhanced C21-hydroxylation of glucocorticoids

Lisa König^a, Sabine Szczesny^a, Simone Brixius-Anderko^{a,b}, Rita Bernhardt^{a,*}, Frank Hannemann^{a,*}

^a Department of Biochemistry, Campus B2.2, 66123, Saarland University, Saarbrücken, Germany

^b College of Pharmacy, Department of Medicinal Chemistry, 428 Church St., University of Michigan, Ann Arbor, MI, 48109, United States

ARTICLE INFO

Keywords:

Chloramphenicol acetyl transferase
Mixed-culture fermentation
Cortisone
Steroid acetylation
CYP21A2
Whole-cell conversion

ABSTRACT

Synthetic glucocorticoids are generally preferred over their natural counterparts as these compounds exhibit improved anti-inflammatory potency and glucocorticoid receptor selectivity. However, the biotechnological production of these molecules is often subject to limitations inferred by restricted enzyme stability, selectivity or inhibition thereof. The latter is particularly important during 6 α -methylprednisolone production, as the essential C21-hydroxylation of its precursor medrane appears to be hampered by product inhibition of the steroid-21-hydroxylase (CYP21A2). To circumvent this bottleneck, we established a two-step reaction for controlled mixed-culture fermentation, using recombinant *E. coli*. This process comprises the previously reported C21-hydroxylation of medrane by CYP21A2, followed by an instant derivatization of the hydroxylated product premedrol by chloramphenicol acetyl transferase 1 (CAT1). The CAT1-mediated C21-acetylation prevents the product from regaining access to the enzyme's active site which effectively shifts the chemical equilibrium toward premedrol formation. The successful circumvention of product inhibition at optimized conditions resulted in the formation of more than 1.5 g of product per liter which corresponds to an increase by more than 100 %. Taken together, we demonstrate an efficient system to enhance cytochrome P450-mediated biotransformations, holding great ecological and economic potential to be applied in industrial processes.

1. Introduction

Steroidal compounds form the second largest group in the pharmaceutical sector next to antibiotics (Tong and Dong, 2009). Glucocorticoids (GC) in particular represent the most prescribed class of anti-inflammatory and immunosuppressive drugs (Löwenberg et al., 2008; Luhder and Reichardt, 2009). They are frequently applied to treat several diseases like rheumatoid arthritis (Buttgereit et al., 2004; Thiele et al., 2005), asthma (Barnes, 1996) and inflammatory bowel diseases (Metge et al., 2001). Compounds within the steroidal class of GC are characterized by possessing a hydroxyl group at C21 which is, besides the hydroxyl groups at C11 and C17, most likely responsible for physiological activity due to interaction with the GC receptor (Hellal-Levy et al., 1999; King and Mainwaring, 2014). Since these substituents are also partially present in mineralocorticoids (MC), both of the steroid classes show similar affinity to homologous receptor binding domains (Fagart et al., 1998; Farman and Rafestin-Oblin, 2017). During

medication with GCs, these overlapping activator signals lead to transactivation of the MC receptor, which is manifested in undesired side-effects like osteoporosis and hypertension (Schäcke, 2002). Thus, a current research goal is the development of derivatives that show higher receptor specificity. 6 α -methylprednisolone, for instance, exhibits increased potency and reduced side-effects compared with its non-methylated analogue prednisolone (Gessi et al., 2010). However, the chemical synthesis of these compounds is very complex and associated with time-consuming multi-step reactions. They often include tedious chemical reactions for integration of protecting groups performed under harsh conditions and the requirement for toxic substances (Frazzetto, 2003; Rabe et al., 2008). Hence, biotechnological approaches for synthetic GC production have experienced growing interest and importance in pharmaceutical industry during the last few decades. For this purpose, biological tools like immobilized enzymes or (recombinant) microorganisms are applied which allow regio- and stereoselective biotransformation of steroids under mild and eco-

Abbreviations: CAT1, chloramphenicol acetyl transferase; *E. coli*, *Escherichia coli*; CYP21A2, steroid-21-hydroxylase; GC, glucocorticoids; MC, mineralocorticoids; acetyl CoA, acetyl coenzyme A; NaOAc, sodium acetate

* Corresponding authors.

E-mail addresses: ritabern@mx.uni-saarland.de (R. Bernhardt), f.hannemann@mx.uni-saarland.de (F. Hannemann).

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.03.008>

Received 17 December 2019; Received in revised form 10 March 2020; Accepted 24 March 2020

Available online 01 April 2020

0168-1656/ © 2020 Published by Elsevier B.V.

friendly conditions with regard to pH, temperature and resources (Bernhardt and Urlacher, 2014; Urlacher and Girhard, 2012). However, during the application of these strategies, some limitations often become apparent, such as a weak production or solubility of recombinant enzymes and limitations in substrate solubility. The latter often impedes substrate access to the active enzymes, whereas the enhancement of enzyme production requires optimization of cultivation and expression conditions tailored to the respective enzyme (König et al., 2019; Martinez and Rupasinghe, 2013). In addition, the accumulation of reaction products in the culture medium can reduce enzyme activity, also known as product inhibition (Kiss et al., 2015; Lundemo and Woodley, 2015). Existing methods to circumvent product inhibition are *in situ* product removal (ISPR) (Martinez and Rupasinghe, 2013) or product derivatization preventing further interaction with the enzymatic active site (Chacón et al., 2019). Product derivatization in particular can be achieved by the presence of an additional enzyme, capable to selectively modify the product such as the acetylation of hydroxyl groups by several microorganisms (Chacón et al., 2019; Liu et al., 2016). Recently, another promising whole-cell system for steroid acetylation has been established in *E. coli* producing chloramphenicol acetyl transferase (CAT1), which is commonly used for mediating bacterial antibiotic resistance. CAT1 acts as a carrier enzyme transferring an acetyl group from acetyl CoA to the hydroxyl group of the acceptor molecule and esterification thereof. Interestingly, Mosa et al. have shown that besides chloramphenicol, a wide range of glucocorticoids serve as substrate for the regioselective acetylation of their C21-hydroxyl group (Mosa et al., 2015). This encouraged us to employ CAT1 as an effective tool aimed for enhancing steroid-producing biosystems as it could help to circumvent product-mediated enzyme inhibition. Furthermore, the modified product hydrophobicity can allow easy compound removal from the culture, whereas the isolated product can undergo a subsequent hydrolysis for premedrol regeneration or may serve as precursor for the production of prodrugs such as methylprednisolone acetate (Fokina et al., 2003; Fokina and Donova, 2003). In this work, we demonstrate CAT1 versatility by application in a biotechnological production process yielding the pharmaceutically relevant compound 6 α -methylprednisolone. The C21-hydroxylation of its precursor medrane is known to be the major bottleneck of the whole process which appears to be limited to 691 mg L⁻¹ product yield in a fermentation process under laboratory conditions (Brixius-Anderko et al., 2015; König et al., 2020). Thus, we generated a multi-step process allowing hydroxylation of medrane and the instant derivatization of the hydroxylated product premedrol. The latter reaction is aimed to affect flux balance by counteracting product inhibition of the steroid-21-hydroxylase (CYP21A2) leading to improved productivity toward C21-hydroxylation. For this, we generated a highly active cell suspension which serves as an effective tool for enhancing steroid-producing systems while using simple and inexpensive equipment.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals, kits and enzymes

Cortisone for CAT1-dependent whole-cell conversions and cortisone acetate as standard are obtained from TCI Deutschland GmbH (Eschborn, Germany). Premedrol and medrane for CYP21A2-dependent whole-cell biotransformations were obtained from Sanofi, Frankfurt-Höchst (DE). Restriction enzymes were obtained from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) and Fast-Link™ Ligase was purchased from Lucigen Corporation. PCRs and site-directed mutagenesis were performed with Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase and dNTP's, both obtained from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Further chemicals and reagents were purchased from standard resources.

2.2. Bacterial strains and cultivation

Cloning experiments were conducted using *E. coli* Top10F⁺(F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG). For experiments including gene expression and whole-cell conversions, *E. coli* BL21(DE3) (for *cat1* expression) or C43(DE3) (Miroux and Walker, 1996) (for bCYP21A2, bCPR₂₇, cytochrome *b*₅, GroEL and GroES production) were used. The cultivation of the precultures took place in Luria-Bertani broth (BD, Heidelberg, DE). The main cultures were incubated in terrific broth complex medium (TB) or modified auto-induction mineral medium (M9CAauto medium) previously described by Ringle et al. (Ringle et al., 2013). Here, the glycerol portion was replaced by solution 5052 (Studier, 2005) with final concentrations of 0.5 % (v/v) glycerol, 0.05 % (w/v) glucose and 0.2 % (w/v) α -D-lactose. For rhamnose-mediated induction the α -D-lactose portion was substituted by rhamnose at various concentrations ranging from 0.02 to 0.2 %. Transformed cells were stored as glycerol stock with a 1:1 mixture of an overnight culture and glycerol (87 %) at -80 °C.

2.3. Vector construction

The construction of the used vectors 3–10 (Table 1) was performed by QuikChange mutagenesis using the listed primers 1–12 (Table S1). Construction of pET22b_PrhaB_CAT1 was performed by amplification of the *rhaB* promoter adding the restriction sites BglIII and XbaI via PCR using the template pRham™ vector and primers 13 and 14 (Table S1). The digested amplicon and the vector pET22b_T7_CAT1 were ligated and transformed into *E. coli* BL21(DE3).

2.4. Protein production and purification

Bovine CYP21A2 as well as chloramphenicol acetyltransferase I (CAT1: EC 2.3.1.28) were synthesized and purified as previously

Table 1
Plasmids and designation of recombinant *E. coli* strains used for protein expression and whole-cell biocatalysis.

#	Plasmid	<i>E. coli</i> strain	Designation of recombinant <i>E. coli</i> strain	Reference Plasmid
1	pTG10_CAT1	BL21(DE3)	B_pTG10_CAT1	Mosa et al. (2015)
2	pET22b_T7_CAT1	BL21(DE3)	B_T7	This study
3	pET22b_C4_CAT1	BL21(DE3)	B_C4	This study
4	pET22b_C15_CAT1	BL21(DE3)	B_C15	This study
5	pET22b_C15_0_CAT1	BL21(DE3)	B_C15_0	This study
6	pET22b_PCAT_CAT1	BL21(DE3)	B_PCAT	This study
7	pET22b_P3_CAT1	BL21(DE3)	B_P3	This study
8	pET22b_P8_CAT1	BL21(DE3)	B_P8	This study
9	pET22b_P13_CAT1	BL21(DE3)	B_P13	This study
10	pET22b_PrhaB_CAT1	BL21(DE3)	B_PrhaB	This study
11	pRham™ vector			Lucigen Corporation (Middleton, USA)
12	pR_ACS + pET22b_C4_CAT1	BL21(DE3)	B_C4_ACS	This study
13	p21b_bRED(-27) + pREP4_GroESL_cytb5	C43(DE3)	C_CYP21_b5	König et al. (2020)

described (Brixius-Anderko et al., 2015; Mosa et al., 2015).

2.5. CAT1 activity assay

CAT1 activity assays were carried out in a final volume of 250 mL with 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) containing 4 μM CAT1, 200 μM acetyl-CoA and 200 μM steroidal substrate. The reaction was incubated at 37 °C for 1 h and quenched with chloroform. Steroids were extracted twice with chloroform, dried and stored at –20 °C for HPLC analysis.

2.6. CAT1 expression and whole-cell steroid conversion

For whole-cell conversions, *E. coli* BL21(DE3) cells were transformed with the vector pET22b_T7_CAT1 (or derivative, listed in Table 1), carrying the gene for chloramphenicol acetyltransferase I from *E. coli*. For the seed culture, 10 mL LB medium, supplemented with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin for selection, was inoculated with transformed cells from a glycerol stock and grown overnight at 37 °C and 150 rpm. The main culture contained 50 mL M9CAauto medium, supplemented with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin, inoculated with 1:100 (v/v) of the seed culture and grown at 37 °C and 150 rpm for 24 h in 300 mL baffled Erlenmeyer flasks. Gene expression was performed by autoinduction. After the expression period, cells were harvested, washed and suspended in 100 mM KP_i buffer (pH 7.4) containing 500 mM glucose. Steroids were dissolved in DMSO and added to the cell suspension in concentrations ranging from 600 μM to 25 mM (final concentrations of DMSO did not exceed 10 %) and conversion took place in test tubes containing 2 mL reaction volume. The whole-cell reaction mixture was incubated at 37 °C for 24 h at 200 rpm. Samples for HPLC analysis were taken at different time points, extracted twice with chloroform, dried and stored at –20 °C.

2.7. CYP21A2-dependent whole-cell biotransformation in shaking flasks

Protein production of bovine CYP21A2 and its redox partner for whole-cell biotransformation was performed with C43(DE3) cells co-transformed with the vector p21b_bRED(-27), carrying the coding sequences for a truncated and modified form of bovine CYP21A2 and a truncated form of the NADPH-dependent cytochrome P450 reductase (CPR), and the vector pREP4-groESL_cytb5 encoding the *E. coli* chaperones GroES/EL to ensure a proper protein folding and additionally the gene for cytochrome *b₅* supporting the CYP21A2 dependent reaction (Cole, 1996; König et al., 2020). For the seed culture, 10 mL LB medium, supplemented with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin for pET17b_21b selection and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kanamycin for pGro12 or pREP4 selection, were inoculated with transformed cells from a glycerol stock and grown overnight at 37 °C and 160 rpm. For the main culture, 50 mL TB medium, supplemented with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kanamycin, were inoculated with 1/100 (v/v) of the seed culture and grown at 37 °C and 190 rpm to an OD₆₀₀ of 0.5. At this time point, gene expression was induced by adding 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), 1 mM δ -aminolevulinic acid as heme precursor and 4 mg mL⁻¹ L-arabinose for the induction of the chaperones GroES/EL production. Protein synthesis was carried out at 30 °C and 120 rpm. After 24 h expression time, cells were harvested at 4000g for 15 min at room temperature. The cell pellets were washed once with 50 mM potassium phosphate buffer and cell wet weight (cww) was adjusted to 96 g cww L⁻¹. The whole-cell biotransformation was carried out with resting cells in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) supplemented with 2 % glycerol and 32.5–150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ polymyxin B. The reaction volume was 10 mL in 50 mL baffled Erlenmeyer flasks. The steroid substrate was dissolved in DMSO and added at concentrations ranging from 1.2 mM to 4.8 mM. The whole-cell reaction mixture was incubated at 30 °C for 24 h at 120 rpm. Samples for HPLC analysis were taken at different time points, extracted twice with chloroform, dried and stored at –20 °C.

2.8. CYP21A2 and CAT1-dependent whole-cell biotransformation of medrane using mixed cultures

For biotransformation with mixed cultures, B_C4 cells, and C_CYP21_b5 cells (Table 1) were cultivated and protein synthesis was carried out according to the respective protocol described above. For biotransformation, the cell mass of CYP21A2- and CAT1-producing cells was adjusted and united after washing to varying cell densities. Whole-cell conversion in 50 mL shaking flasks was carried out as described above. Substrate and glycerol feeding were carried out by increasing the substrate concentration in 1.2 mM steps after 2, 4, and 6 h and addition of 2 % glycerol per step. As control the CYP21A2-producing cells (C_CYP21_b5) were cultivated separately using the respective cell density. To test different concentrations of the carbohydrate source as impact on premedrol formation, either glycerol or glucose was used.

2.9. Reversed phase HPLC analysis (RP-HPLC)

Steroid analysis was carried out by RP-HPLC using a Jasco reversed phase HPLC system of the LC900 series and a 4.6 mm \times 125 mm NucleoDur C18 Isis Reversed Phase column (Macherey-Nagel). *In vivo* biotransformations of cortisone to cortisone acetate the samples were measured within 30 min at 240 nm and a flow rate of 0.8 mL/min with the gradient: 80 % solvent A (10 % acetonitrile in water) for 13 min, 60 % solvent A for 7 min, 80 % solvent B (100 % acetonitrile) for 2 min and 80 % solvent A for 8 min. The reconstituted *in vitro* assays were analyzed at 240 nm within 15 min at 40 °C and a flow rate of 0.8 mL/min with the gradient: 100 % solvent A (50 % acetonitrile in water) for 8 min, 90 % solvent B (100 % acetonitrile) for 2 min and 100 % solvent A for 5 min. For analysis of medrane, premedrol and premedrol acetate, the samples were measured within 30 min at 240 nm and a flow rate of 0.8 mL/min with the gradient: 80 % solvent A (10 % acetonitrile in water) for 13 min, 60 % solvent A for 7 min, 80 % solvent B (100 % acetonitrile) for 2 min and 80 % solvent A for 8 min. The collected fractions were evaporated to dryness and analyzed by mass spectrometry (MS) using a QTRAP® 5500 LC-MS/MS System via Electrospray ionization (ESI).

3. Results and discussion

The C21 hydroxylation of medrane yielding premedrol is a demanding step in the biotechnological production of the pharmaceutically relevant compound 6 α -methylprednisolone. To date, maximum yields of 691 mg L⁻¹ of premedrol were obtained by a biotechnological process at laboratory-scale established and optimized in our lab (Brixius-Anderko et al., 2015; König et al., 2020). However, we found that product inhibition takes place being the major bottleneck of the process (Fig. S1). In order to elevate the production efficiency, we sought to integrate an additional modification step of the arising product premedrol, preventing further interaction with the CYP21A2 active site and this way shifting the chemical equilibrium in favor of hydroxylation. To realize such derivatization, we investigated the use of chloramphenicol acetyl transferase 1 (CAT1), which was already successfully applied in our lab showing C21 acetylation of diverse glucocorticoids (Mosa et al., 2015). Although premedrol has never been reported before to serve as CAT1 substrate, the structural similarity of the molecule to the used 21-hydroxylated glucocorticoids indicated that this compound is also a candidate for conversion by the CAT1 protein. After confirmation of this assumption (data not shown), we sought to establish a biotechnological multi-step process realized by step-wise hydroxylation and esterification of the C21-hydroxyl group of medrane. While the CYP21A2-producing system already has been optimized previously in our lab (König et al., 2020), we aimed to further increase the production by premedrol derivatization. Since the starting CAT1-producing system did not show sufficient steroid acetylation efficiency (Mosa et al., 2015) we sought to optimize the system individually. Due

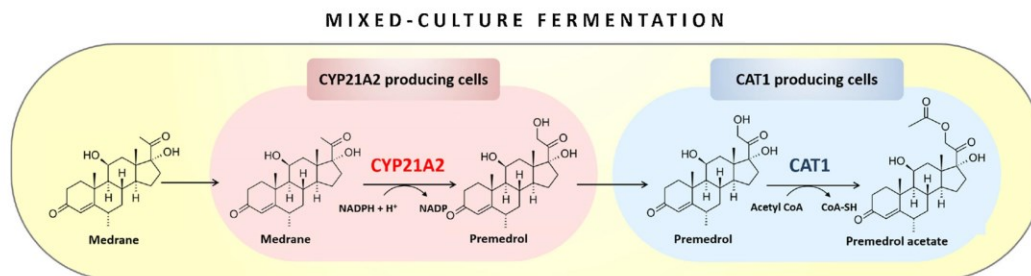


Fig. 1. Schematic overview of CYP21A2-mediated medrane hydroxylation by CYP21A2-producing cells (red) and subsequent 21-acetylation of premedrol by CAT1-producing cells (blue). Both cells are present in the same reaction medium (yellow). Medrane is added to the medium and the CYP21A2-producing cells take up the substrate. CYP21A2 catalyzes medrane hydroxylation in position C21 resulting in premedrol. The compound is released to the medium and subsequently taken up by CAT1-producing cells. CAT1 enables efficient acetylation of premedrol. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

to varying cultivation requirements, we implemented the two-step reaction by using two separate expression systems (Fig. 1). We improved the CAT1-mediated system by enhancing protein synthesis and engineered the metabolism of *E. coli* forcing the production of higher concentrations of the relevant co-factor acetyl CoA. The optimized whole-cell catalysts were combined after individual protein synthesis for the mixed-culture fermentation process converting medrane to premedrol acetate *via* premedrol.

3.1. Premedrol is a substrate for CAT1-mediated 21-acetylation under *in vitro* conditions

Our group has previously shown that CAT1 performs a highly selective acetylation of 21-hydroxylated steroids, the first reported 21-acetylation with an isolated enzyme (Mosa et al., 2015). So far, six steroidal substrates, 11-deoxycorticosterone, cortisol, 11-deoxycortisol, aldosterone, corticosterone and prednisolone, appeared to be derivatized by CAT1. In contrast to these substances, premedrol, a product derived from CYP21A2-mediated medrane conversion, possesses an additional methyl group at carbon atom 6. Therefore, it first had to be ensured that premedrol is converted by CAT1 despite the additional functional group, which could lead to steric interference. We carried out *in vitro* assays with purified CAT1 and premedrol as a substrate. As a negative control we also tested the CYP21A2 substrate medrane. As expected, medrane did not serve as a substrate for CAT1 due to the absence of a hydroxyl group at C21 (Fig. 2A), exclusively showing the substrate peak at a retention time of 16 min. By contrast, premedrol conversion showed, next to the substrate peak (11.8 min), an additional product peak (17.8 min). The late elution from the column indicated that the product is more hydrophobic than the substrate (Fig. 2B). The presence of the additional acetyl group was confirmed *via* LC-MS analysis (Fig. S2). Mosa et al. characterized the converted glucocorticoids to be acetylated exclusively at C21, which is due to favorable steric and acidic properties of the C21 hydroxyl group (Mosa et al., 2015). Hence, in our case the product is likely to be the C21-acetylated derivative, premedrol-21-acetate. This finding indicates that premedrol derived from CYP21A2-mediated biotransformation of medrane serves as a substrate for CAT1.

3.2. Optimization of the CAT1-producing whole-cell system

3.2.1. Application of a model substrate for the optimization of the CAT1-producing whole-cell system

Since we found that performing both reactions, steroid hydroxylation by CYP21A2 and acetylation by CAT1 within one cell is insufficient for high product formation, we divided the process into a hydroxylating and acetylating step, performed in separate cells. To this end, we used a whole-cell system producing CYP21A2, CPR, cytochrome *b₅* and the

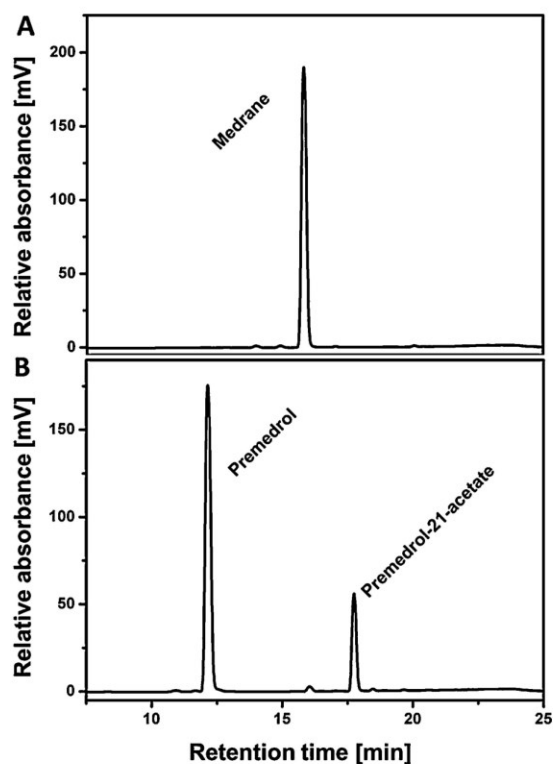


Fig. 2. Reconstituted *in vitro* assays with purified CAT1. *In vitro* assays were carried out with 4 μM purified CAT1 and 200 μM steroidal substrate. The reaction was conducted for 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, extracted twice with chloroform and analyzed *via* HPLC. A: Medrane was not converted by CAT1. B: Premedrol conversion resulted in a more hydrophobic acetylated product, premedrol-21-acetate.

chaperonins GroES and GroEL and a CAT1-producing system. Both systems were combined after expression. The CYP21A2-producing system has already been optimized in our lab (König et al., 2020), thus, we focused on the subsequent reaction step. Since the C21-acetylation of steroids did not yield sufficient product (Mosa et al., 2015), we sought to optimize the corresponding whole-cell system in *E. coli* by increasing the expression level of CAT1 (Mosa et al., 2015). To obtain this, the process parameters, e.g. *E. coli* expression strain or promoter sequence, were optimized. The vector pET22b_CAT1 was used for conducting the experiments (Table 1). However, when using premedrol as substrate for the following *in vivo* whole-cell acetylation, a substrate-

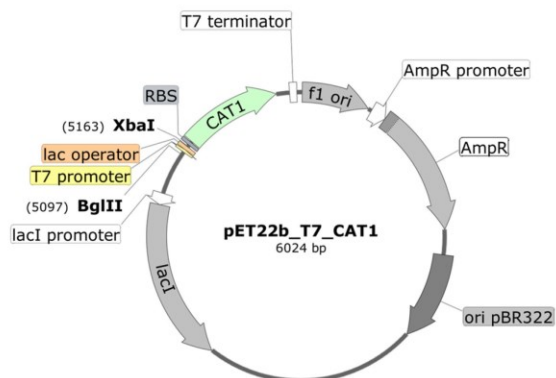


Fig. 3. Vector map of pET22b_T7_CAT1 for *cat1* gene expression. Restriction sites are depicted in bold. The CAT1 related sequence section is depicted in green, the promoter section in yellow and lac operator section is pictured in orange. Abbreviations: RBS (ribosomal binding site), AmpR (ampicillin resistance gene). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

related inhibition of the reaction applying concentrations above 2 mM was observed (data not shown).

By contrast, converting premedrol within the envisaged biotechnological multi-stage synthesis is unproblematic, due to the consistent and continuous delivery by CYP21A2, which prevents the occurrence of high amounts of the compound. However, to optimize the CAT1 whole-cell system we had to switch to alternative substrates that do not show the phenomenon of substrate inhibition in the relevant concentration range. In addition to cortisol, we found that cortisone serves as suitable model substrate to conduct CAT1 optimization experiments and to visualize efficiency enhancements (Fig. S3). In preliminary tests, we investigated the impact of different *E. coli* strains on CAT1 activity and found the strain BL21(DE3) to be most suitable for utilization in the whole-cell system (data not shown). By using the vector pET22b_T7_CAT1 (Fig. 3) for expression we obtained $3.61 \pm 0.05 \text{ g L}^{-1}$ of cortisone acetate after conversion within 24 h which served as starting vector of our optimization experiments. The product concentration is 13-fold higher than that obtained by the conversion of cortisol to cortisol acetate (Mosa et al., 2015) (Fig. S4). This is putatively due to the expression system used here, containing an alternative plasmid backbone and promoter (P_{T7}). Furthermore, the selection of the *E. coli* strain BL21(DE3) instead of JM109(DE3) putatively led to enhanced expression and performance.

3.2.2. Influence of the promoter on CAT1 production and whole-cell biotransformation

In the next step we aimed to optimize CAT1 synthesis, potentially resulting in higher concentrations of acetylated product. To study the impact of changes in the expression level and expression velocity of *cat1* on the acetylation of the model substrate cortisone, a promoter library comprising weaker and stronger promoters compared with the T7 promoter was generated and applied in conversion studies. Two T7 promoter derivatives (P_{C4} and P_{C15} ; Table 2) were produced by

Table 2

T7 promoter sequence and corresponding derivatives. The modifications of the T7 promoter sequence were selected as described previously for P_{C4} and P_{C15} (Jones et al., 2015; Paul et al., 2013) and highlighted in bold.

Designation	Promoter sequence	Lac Operator sequence	reference
P_{T7}	TAATACGACTCACTATAGG	GGAATTGTGAGCGGATAACAATTCC	Studier et al. (1990)
P_{C15}	TAATACGACTCACAATCGC	GGAGTTGTGAGCGGATAACAATTCC	Paul et al. (2013)
$P_{C15,0}$	TAATACGACTCACAATCGC	GGAATTGTGAGCGGATAACAATTCC	this work
P_{C4}	TAATACGACTCACTATCAA	GGAATTGTGAGCGGATAACAATTCC	Jones et al. (2015)

QuikChange mutagenesis starting from pET22b_T7_CAT1 (Fig. 3), which should lead to increased gene expression compared with P_{T7} based on previous literature data (Jones et al., 2015; Paul et al., 2013). As the promoter sequence of P_{C15} exhibits a point mutation within the lac operator, we generated an additional derivative of this promoter with the parental lac operator sequence ($P_{C15,0}$; Table 2). Moreover, we tested a rhamnose-inducible promoter P_{RhaB} which was aimed to achieve higher expression levels compared with the T7 promoter (Kuipers et al., 2017). For this, we replaced lactose by rhamnose within the autoinduction medium with an optimal concentration of 0.2 % (Wagner et al., 2008). In addition, we generated further pET22b_T7_CAT1 derivatives by replacing the T7 promoter with the sequences of three constitutive promoters with varying induction strengths. These promoters have been described by Mutalik et al. (2013) as weak (P_3), medium (P_8) and strong (P_{13}) constitutive promoters regarding RFP and GFP (Mutalik et al., 2013) (Table 3). Finally, we inserted the original constitutive promoter of CAT1 (P_{CAT} ; Table 3) which was used in previous studies for CAT1 production and appeared to be a weaker promoter compared with the T7 inducible system (Mosa et al., 2015). The weaker promoters could promote slower and this way more stable production of proteins by avoiding possible misfolding. After generation of the corresponding pET22b derivatives (Table 1), we transformed the vectors into *E. coli* BL21 (DE3) and performed *cat1* gene expression.

Subsequently, we tested the different constructs in *E. coli* whole-cell systems in terms of cortisone acetylation (Fig. 4). The whole-cell conversions using the recombinant strain B_T7 led to cortisone acetate concentrations of $3.61 \pm 0.05 \text{ g L}^{-1}$. Replacing the T7 promoter by the constitutive promoters P_3 , P_8 , P_{13} and P_{CAT} led to significantly lower product concentrations (compared with B_T7). The strains containing the promoters P_3 , P_8 and P_{13} based on Mutalik et al. (2013) did not exceed product concentrations above $0.37 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$, as produced by B_P3. Using the natural CAT1 promoter, P_{CAT} , we observed a cortisone acetate concentration of $1.13 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$, corresponding to 31.3 % of B_T7 activity. Furthermore, the rhamnose-inducible promoter containing strain, B_PrhaB, only showed a minimal increase by 8.6 % in cortisone acetate formation, as compared with B_T7. Modification of the T7 promoter resulting in the strains B_C15 and B_C15_0 drastically reduced cortisone acetate production to 0.45 ± 0.02 and $0.25 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$, respectively. However, another T7 modification according to Jones et al. (2015) (B_C4) markedly enhanced cortisone acetate production to $6.12 \pm 0.22 \text{ g L}^{-1}$, which represents an increase by 70 %, as compared with B_T7.

Overall, exclusively B_C4 exceeded the efficiency of the presented starting system (B_T7) in a significant manner. According to Jones et al., the promoter P_{C4} leads to higher end-point protein concentrations and a decreased slope of expression compared with P_{T7} (Jones et al., 2015). We hence used the recombinant strain B_C4, as it revealed the highest efficiency in steroid acetylation.

3.2.3. Elevating cell-internal co-factor concentrations

The production efficiency in whole-cell systems often correlates with the presence of required co-factors. Therefore, metabolic modulation in favor of co-factor regeneration is an efficient tool to overcome this limitation. The here presented CAT1-mediated acetylation of

Table 3
promoter sequences of the rhamnose-inducible (P_{rham}) and constitutive promoters used for CAT1 production.

Designation	Promoter sequence	reference
P_{rham}	CACCACAAITTCAGCAAAITTTGAAACATCAATCAGCTTCATCTTTCCCTGGTGGCCAAITGGCCGATTTTCCTGTCAGTAAACGAGAAAGTCGGCAATTCAGGGCGCTTTTAGACTGGTTCGTA	Wagner et al. (2008)
P_3	AAAAATTTATTTGGCTTATTAAATTCATCGGGCTCGTATAATGTG	Mutalik et al. (2013)
P_8	TTACGTTTAAATCATCGGGCTGGTATAATGGT	Mutalik et al. (2013)
P_{13}	TTCCCTAATTAATCATCGGGCTCGTATAATGTG	Mutalik et al. (2013)
P_{CAT}	TGATCGGCAGTAAAGAGGTTCCAACTTTCACCATTAATGAATAAGATCACTACCGGGGGTATTTTTTCAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAA	

steroids is acetyl CoA-dependent (Fig. 5A). Hence, we sought to increase the concentration of this co-factor, to further enhance the final product titers. External addition of acetyl CoA is unfavorable, due to the emergence of excessive costs of the fermentation process and limited/unknown uptake-efficiency of the co-factor. Consequently, two strategies to elevate internal acetyl CoA concentrations were applied: (i) the addition of higher glucose concentrations, which is aimed to support the intrinsic acetyl CoA production. This substrate represents the starting compound of the glycolysis and is decomposed into acetyl CoA (Fig. 5A). However, increasing glucose concentrations in the conversion buffer resulted in reduced CAT1 activity in B_C4 (Fig. S5), which is probably due to exceeding cell osmolarity leading to cell lysis and, therefore, complete stagnation of co-factor regeneration.

As glucose putatively affects cell viability and, thus, metabolic functionality of the cells (ii) the over-expression of a metabolic system which enhances cell-internal carbon flux toward acetyl CoA formation was performed. This was realized by plasmid-driven over-expression of the acetyl CoA-synthetase (ACS: EC 6.2.1.1), which catalyzes the conversion of acetate into acetyl-AMP followed by the formation of acetyl CoA through coenzyme A (Fig. 5A) (Lin et al., 2006). To this end, an expression vector containing the ACS sequence, termed pR_ACS was constructed (Fig. S6). We co-transformed pR_ACS into BL21(DE3) together with pET22b_C4_CAT1, resulting in the recombinant *E. coli* strain B_C4_ACS (Table 1). In order to determine suitable induction conditions, which allow optimal production of both proteins, we analyzed the respective expression levels of ACS and CAT1 in dependence on the recombinant strain, inducer, chronologic order of inducer addition and rhamnose concentration (Figs. 5B and S7). It was observed that the replacement of lactose by IPTG as inducer for *cat1* expression caused a massive reduction in protein production thereof, as shown for B_C4 and B_C4_ACS. Switching the chronological order of inducers, i.e., using rhamnose as autoinduction component instead of lactose for B_C4_ACS and delayed addition of lactose or IPTG for CAT1 production, both massively repressed synthesis of CAT1, as compared with the control (B_C4 induced with 0.2 % lactose). We further found decreased CAT1 levels in B_C4_ACS without rhamnose addition, compared with CAT1 concentration in B_C4 lacking ACS production and a “leaky” *acs* gene expression promoted by P_{rham} in B_C4_ACS (Figs. 5B and S7). The addition of rhamnose at increasing concentrations also reduces CAT1 synthesis, proportionally to the increase of ACS production. It is noteworthy that the addition of 0.02 % rhamnose already led to a reduction of *cat1* gene expression by about 50 % (Fig. S7). Corresponding whole-cell conversions of the recombinant cell cultures shown in Fig. 5B exhibited similar tendencies in cortisone acetate formation (Fig. 5C). We observed the highest cortisone conversion for B_C4, which was not exceeded by any induction condition for B_C4_ACS. As expected, the acetylation efficiency reduced linearly with increasing rhamnose concentrations. Unfortunately, the addition of sodium acetate (NaOAc) during cultivation could not compensate the decreased activity of the system regarding cortisone acetylation (data not shown). Thus, the applicability of ACS co-expression within the same bacterial cell is significantly affected by reduced CAT1 production. Both protein-producing processes obtain their energy from the same supply, this way limiting each other. In general, the use of a rhamnose-inducible system is advantageous in such cases due to its tunability in promoter strength; however, its slightly “leaky” expression obviously limits its usability in the system presented here (Fig. S7). Taken together, attempts to engineer a better supply of acetyl CoA within the bacterial cell were unsuccessful for our CAT1-producing system.

3.3. Whole-cell biotransformation using mixed culture

3.3.1. Localization and uptake of the steroidal compounds

Up to this point, we completed the optimization of the acetylation reaction and envisaged to apply it in a multi-stage reaction for (previously optimized) medrane hydroxylation and subsequent acetylation.

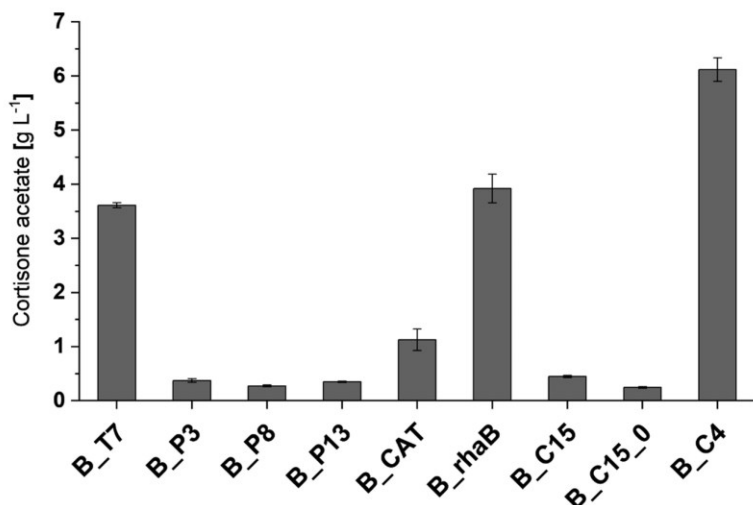


Fig. 4. Whole-cell biotransformations of 20 mM cortisone were performed with recombinant strains listed in Table 1. After CAT1 production, the cells were adjusted to 25 g_{cww} L⁻¹ and transferred into 100 mM KP_i (pH 7.4) containing 500 mM glucose. The yield of the product cortisone acetate per 24 h (ordinate) is shown in dependence of the utilized recombinant strain for CAT1 production (abscissa). Samples were taken after 24 h and analyzed via RP-HPLC. All values represent the mean of triplicates with respective standard deviation.

For this, we first had to ensure that predmrol is released by C_CYP21_b5 cells and taken up by the B_C4 cells, enabling access to CAT1. Although, there is a chance that medrane is also taken up by B_C4 cells, we assume that uptake and release are in equilibrium and the compound is not irreversibly trapped within the CAT1-producing cells. Hence, exclusively predmrol release and uptake should be the determining factors, which significantly affect the mixed-culture fermentation. Therefore, cultures of C_CYP21_b5 were analyzed after biotransformation regarding the localization of medrane and predmrol. The steroids contained in the pellet and the supernatant fraction after centrifugation were extracted and analyzed via RP-HPLC. Medrane almost completely precipitated with the pellet (Fig. 6A), while predmrol is predominantly released to the supernatant and, thus, is available for downstream processing by B_C4 in the mixed culture (Fig. 6B) which aims to eliminate predmrol-mediated inhibition of CYP21A2 (Fig. S1).

3.3.2. Determination of cultivation conditions for efficient mixed-culture fermentation

To investigate whether given reaction conditions of the CYP21A2-mediated hydroxylation are compatible with the downstream acetylation reaction in B_C4, we tested 2 % glycerol as alternative carbon source as used for the CYP21A2-mediated reaction (Fig. 7A). We observed 50 % activity of predmrol acetylation compared with conversions using 500 mM glucose. In addition, we tested a conversion temperature of 30 °C and observed no difference in productivity compared with 37 °C (Fig. 7B).

Our data is in line with previous observations demonstrating that formation of the acetylated steroid appears to be strongly dependent on the present carbon source. It has been shown that glucose as carbon source leads to the formation of high acetyl CoA concentrations, whereas the presence of glycerol as sole carbon source results in only 50 % of the co-factor (Vallari et al., 1987). This is in accordance with the results shown in Fig. 7A, as the use of glycerol causes decreased acetylated steroid. However, taking into consideration that medrane hydroxylation via CYP21A2 is the initial step in the desired cascade reaction, we used glycerol as carbon source, because it, crucially, maintains an efficient NADPH regeneration (Doig et al., 2002; Walton and Stewart, 2004). Although the use of glycerol enables only half the activity for the CAT1 reaction compared with glucose, we still expected an enhanced total predmrol production by the subsequent acetylation, since the optimal CYP21A2 reaction conditions previously determined by König et al. remained unaltered (König et al., 2020).

3.3.3. Enhancement of predmrol production by mixed-culture fermentation

After defining the optimal conditions of the individual and mixed bacterial cultures containing C_CYP21_b5 and B_C4 to increase medrane hydroxylation, we analyzed the optimal ratio of the two different cell systems for predmrol production. For this, both recombinant strains were cultivated separately for optimal protein production and subsequently mixed in different ratios of cell densities (Fig. 8A). We started the two-step synthesis by glycerol and medrane feeding according to the optimized protocol described by König et al. using a reaction volume of 2 mL (König et al., 2020). As control, we generated mono cultures solely containing C_CYP21_b5 producing predmrol. Using a cell density of 48 g_{cww} L⁻¹, the control culture (C_CYP21_b5) maximally produced 678.09 mg L⁻¹ after 120 h. Increasing the cell density from 48 to 96 g_{cww} L⁻¹ led to a marginally enhanced product formation of 684.32 mg L⁻¹ after 120 h.

Two-step reactions using mixed cultures below 96/48 g_{cww} L⁻¹ (C_CYP21_b5/B_C4) were continuously active until 120 h and ended up in total product concentrations comparable with the respective control culture. Exceptionally, cultures with the ratio 96/24 exceeded predmrol production by 27 % after 120 h compared with the corresponding control (96/0 after 120 h) resulting in 869.51 mg L⁻¹ of product. Upon increasing B_C4 concentrations, a steady-state kinetics was already observed after 48 h. Particularly, the culture termed as “96/48” exceeds the control level (96/0 after 48 h) by 75 % resulting in 1,173.13 mg L⁻¹ product concentration (Fig. 8).

Since we determined the optimal cell densities to be 96 g_{cww} L⁻¹ for CYP21A2- and 48 g_{cww} L⁻¹ of CAT1- producing cells, the total cell density results in 144 g_{cww} L⁻¹ in the reaction buffer. Consequently, in total the cultures are 50 % denser compared with mono cultures. This causes reduced permeabilization efficiency of polymyxin B, since the concentration of the antibiotic remained unaltered whereas the overall concentration of cell membranes is increased. Thus, we raised polymyxin B concentrations within the reaction buffer to provide enhanced permeabilization and, thus, substrate/product exchange. We compared conversions of mixed cultures containing 50 and 150 µg/mL of polymyxin B and found that the triple amount of antibiotic induced an increase in product formation by 20 % corresponding to a product concentration of 1.46 g L⁻¹ after 48 h (Fig. 8B). After 120 h the product concentration is even further increased resulting in 1.65 g L⁻¹ which corresponds to an increased production by 38 % compared with the mixed cultures containing 50 µg/mL polymyxin B and by 100 % compared with the corresponding mono culture control. It has to be mentioned that the observed increased predmrol formation by the mono culture (0.80 ± 0.15 g L⁻¹) compared with productions described by

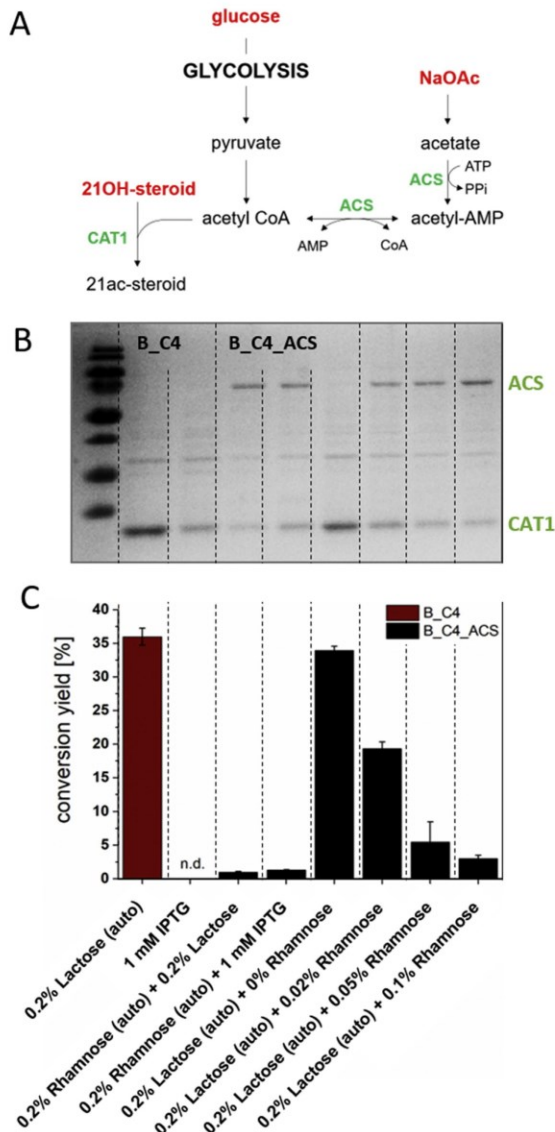


Fig. 5. Effect of acetyl CoA synthetase (ACS) over-expression in *E. coli* BL21(DE3) on heterologous CAT1 activity. *E. coli* B_C4_ACS was cultivated in M9CA autoinduction medium and supplemented with varying concentrations of rhamnose for ACS induction. B_C4 was used as a control exclusively producing the CAT1 protein. A: scheme of the acetyl CoA metabolism in *E. coli*. Components supplemented in B_C4_ACS mediated bioconversions are depicted in red, over-expressed proteins are displayed in green. Abbreviations: NaOAc (sodium acetate); 21ac-steroid (steroid acetylated in C21). B: SDS gel showing the ACS and CAT1 concentrations in dependence on rhamnose addition for ACS induction (0 to 0.1 %). Figure S7 shows corresponding absolute pixel counts as output from ImageJ. C: Bioconversions of cortisone to cortisone acetate using B_C4_ACS (black columns) and B_C4 (red columns) as a control. The recombinant *E. coli* strains were cultivated in M9CAauto medium and B_C4_ACS producing the ACS was supplemented with 0 to 0.1 % rhamnose (black columns) for ACS induction. The bioconversion was performed in 100 mM KP_i buffer (pH 7.4) containing 500 mM glucose and 20 mM cortisone. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

König et al. (2020), may be due to downscaling the conversion volume, which leads to more efficient oxygen flow rates and thus higher CYP21A2 activity.

By establishment of the presented two-step process, we were able to overcome product inhibition of CYP21A2 by efficient and prompt derivatization of arising premedrol, which led to a considerable increase in product formation. With the here presented procedure, premedrol production is more cost-effective, since fewer raw materials are required within one process period. Moreover, the derivatization of premedrol yields an interesting, more hydrophobic product with altered properties to specific absorbing materials which offers the possibility for facilitated product purification and removal. Especially the latter could lead to even higher productivities by additionally pushing the thermodynamic equilibrium of the CAT1-mediated reaction further toward the product side. It can be applied as a potent instrument in industrial processes. A subsequent hydrolysis of premedrol acetate to premedrol, if required, is simple to perform, for example by fermentation using microorganisms producing steroid esterases or lipases showing high enzymatic activity and stability. Such systems have already been described by others (Demchenko et al., 1979; Donova, 2007; Fokina et al., 2003; Tiwari et al., 2007). Taken together, by establishment of this mixed-culture fermentation protocol we were able to produce 1.65 g L⁻¹ premedrol and premedrol acetate within 120 h (Fig. 9). This value is based upon a hypothetical concentration of 1.51 g L⁻¹ premedrol after subsequent hydrolysis of premedrol acetate. The process exceeds the required minimum concentration of 1 g L⁻¹ described for bioprocesses in the fine-chemical industry. In addition, it appears to be productive in a competitive field compared to other P450-based manufacturing processes for pharmaceutical products (Julsing et al., 2008). Moreover, the calculated biocatalyst yield of 0.072 g/g cdw (yield of premedrol and premedrol acetate per g cell dry weight) can be classified in the upper segment exceeding existing P450 whole-cell processes with resting cells in a test tube process according to the guidelines of Lundemo and Woodley (Lundemo and Woodley, 2015). Thus, the obtained product concentration is in the range of highly relevant industrial processes and is a step toward target values of biocatalyst yield and product concentrations of P450 processes by using simple and inexpensive equipment.

4. Conclusions

Taken together, in this study CAT1 production was enhanced by application of a highly efficient expression system using a more suitable expression strain and promoter for CAT1 synthesis in *E. coli*. We expanded the knowledge about the substrate scope of CAT1 and elevated acetylation efficiency toward C21 hydroxylated steroids. As a proof of concept, we added the optimized CAT1-producing cells to a CYP21A2-dependent premedrol yielding whole-cell system, determined the optimal ratio of respective cell densities and obtained more than 1 g L⁻¹ of the products (Fig. 9). By increasing the concentration of polymyxin B as membrane permeabilizer, we further elevated the production of premedrol and were able to establish a mixed-culture fermentation process which is capable to increase premedrol formation by more than 100 % and to surpass the threshold of 1.5 g L⁻¹. The established procedure shows great potential for optimizing industrial processes enabling a more efficient production of highly relevant pharmaceuticals.

Authors' contributions

LK conducted *in vivo* experiments, SDS analysis, participated in study design, interpretation of the results and drafted the manuscript. SS carried out vector cloning, SDS analysis and *in vivo* experiments. SBA conducted *in vitro* experiments, assisted in manuscript drafting and participated in study design. RB and FH launched the project, participated in the interpretation of the results and in manuscript drafting.

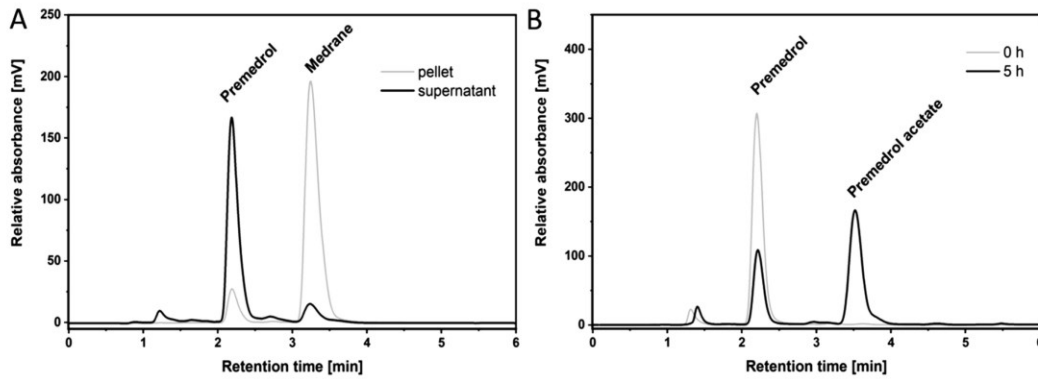


Fig. 6. Demonstration of the functionality of mixed-culture fermentation. A: Chromatograms displaying the localization of the compounds premedrol and medrane. Biotransformation of 1 mM medrane was performed by C_CYP21_b5. After 24 h, soluble and insoluble material was separated by centrifugation. The pellet (grey line) and the supernatant fraction (black line) were extracted separately and analyzed via RP-HPLC. B: Chromatograms showing the whole-cell conversion of 1 mM premedrol by B_C4 cells, producing CAT1, after 0 h (grey line) and 5 h (black line). The substrate premedrol is able to pass the cell membrane of B_C4 to get access to CAT1, which catalyzes its conversion into premedrol acetate. Products were analyzed by extraction of the cell suspension and measurements via RP-HPLC.

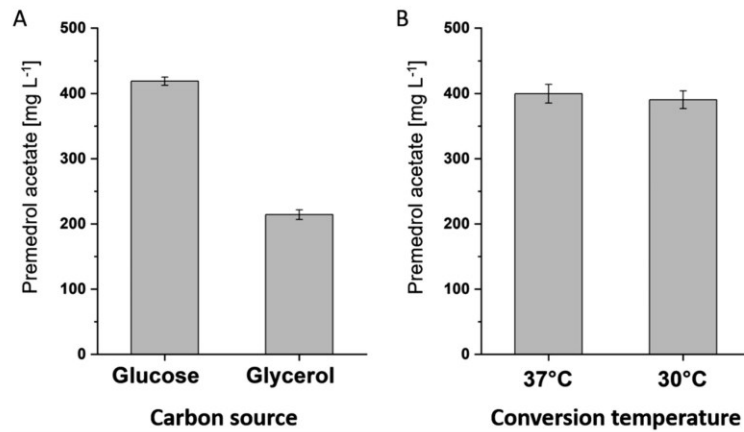


Fig. 7. Premedrol acetylation via CAT1 in dependence on conversion conditions. B_C4 cells were incubated in M9CAauto medium for CAT1 synthesis. After the expression for 24 h, cells were harvested and resting cells were suspended in KP₁ buffer (pH 7.4). The biotransformation was initiated by adding 1.2 mM premedrol. Samples were taken after 24 h and analyzed via RP-HPLC. The values correspond to the mean of three conversion reactions. Error bars indicate the standard deviation. A: The KP₁ buffer contains either 500 mM glucose or 2 % glycerol. B: Conversion was performed at 30 °C and 37 °C.

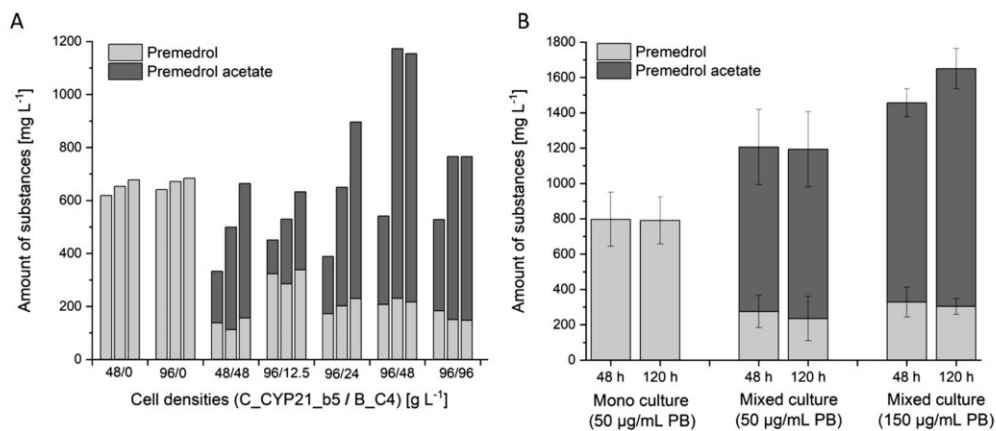


Fig. 8. Premedrol production and subsequent acetylation by mixed-culture fermentation. C_CYP21_b5 and B_C4 cells were incubated simultaneously under respective cultivation conditions (see materials and methods). Subsequent biotransformation of medrane was performed by uniting both cultures in 2 mL reaction volume and cumulative addition of medrane and glycerol. A: Production of premedrol and premedrol acetate dependent on the respective final cell densities of C_CYP21_b5 / B_C4 used for (mixed) culture fermentation. The product formation was analyzed via RP-HPLC at 24, 48 and 120 h of incubation (corresponding to the column-triplet of each cell density ratio). B: Production of premedrol and premedrol acetate dependent on Polymyxin B concentration. Samples were taken after 48 h and 120 h using cell densities of 96 g L⁻¹ of C_CYP21_b5 and 48 g L⁻¹ of B_C4 compared with mono cultivation of 96 g L⁻¹ C_CYP21_b5. Each value represents the mean of five conversion experiments. The error bars indicate the respective standard deviation. Polymyxin B is abbreviated as PB.

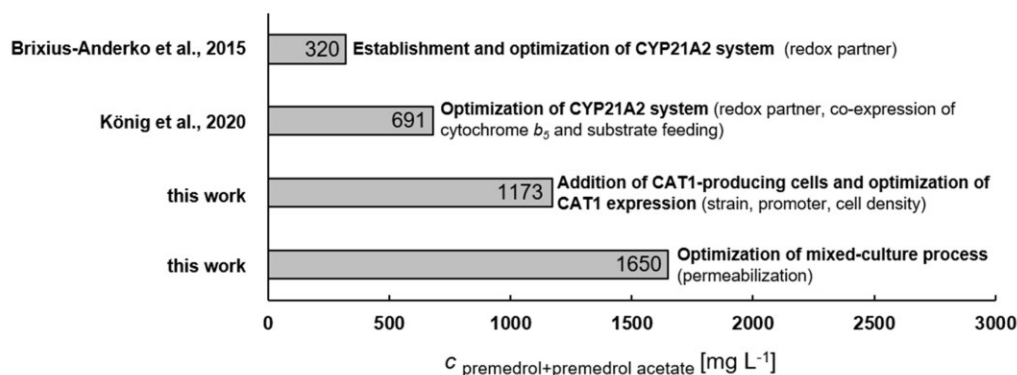


Fig. 9. Summary of the milestones during optimization of the premedrol production process. The individual stages are visualized in chronological order showing their impact on premedrol (including premedrol acetate) production.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We thank Azzam Mosa for providing the purified CAT1 enzyme. We wish to thank Daniela Tavouli-Abbas for constructing the vector pREP4-GroESL_{cytb5} and Annika Meiners and Manuel Gehl for performing of initial mixed-culture experiments. We are grateful to Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, C&BD Frankfurt Biotechnology (Frankfurt-Höchst, Germany) for providing the steroid substrates medrane and premedrol.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.03.008>.

References

- Barnes, P.J., 1996. Mechanisms of action of glucocorticoids in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 521–527.
- Bernhardt, R., Urlacher, V.B., 2014. Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6185–6203. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5767-7>.
- Brixius-Anderko, S., Schiffer, L., Hannemann, F., Janocha, B., Bernhardt, R., 2015. A CYP21A2 based whole-cell system in *Escherichia coli* for the biotechnological production of premedrol. *Microb. Cell Fact.* 14, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0333-2>.
- Buttgereit, F., Straub, R.H., Wehling, M., Burmester, G.R., 2004. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum.* 50, 3408–3417. <https://doi.org/10.1002/art.20583>.
- Chacón, M.G., Marriott, A., Kendrick, E.G., Styles, M.Q., Leak, D.J., 2019. Esterification of geraniol as a strategy for increasing product titre and specificity in engineered *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 18, 105. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1130-0>.
- Cole, P.A., 1996. Chaperone-assisted protein expression. *Structure* 4, 239–242. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00028-7).
- Demchenko, B.I., Konyakhin, A.N., Vasil'ev, V.N., Tropina, V.I., Domrachev, N.V., Naumova, G.A., 1979. Microbiological transformation of the monoacetate of substance R depending on the size of the crystals and the substrate concentration. *Pharm. Chem. J.* 13, 298–303. <https://doi.org/10.1007/BF00772056>.
- Doig, S.D., Avenell, P.J., Bird, P.A., Gallati, P., Lander, K.S., Lye, G.J., Wohlgenuth, R., Woodley, J.M., 2002. Reactor operation and scale-up of whole cell Baeyer-Villiger catalyzed lactone synthesis. *Biotechnol. Prog.* 18, 1039–1046. <https://doi.org/10.1021/bp0200954>.
- Donova, M.V., 2007. Transformation of steroids by actinobacteria: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43, 1–14. <https://doi.org/10.1134/S0003683807010012>.
- Fagart, J., Wurtz, J.M., Souque, A., Hellal-Levy, C., Moras, D., Rafestin-Oblin, M.E., 1998. Antagonism in the human mineralocorticoid receptor. *EMBO J.* 17, 3317–3325. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3317>.
- Farman, N., Rafestin-Oblin, M.-E., 2017. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am. J. Physiol. Physiol.* 280, F181–F192. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.2.f181>.
- Fokina, V.V., Donova, M.V., 2003. 21-Acetoxy-pregna-4(5),9(11),16(17)-triene-21-ol-3,20-dione conversion by *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 87, 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2003.10.002>.
- Fokina, V.V., Sukhodolskaya, G.V., Baskunov, B.P., Turchin, K.F., Grinenko, G.S., Donova, M.V., 2003. Microbial conversion of pre-gna-4,9(11)-diene-17 α ,21-diol-3,20-dione acetates by *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D. *Steroids* 68, 415–421. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(03\)00043-6](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(03)00043-6).
- Frazzetto, G., 2003. White biotechnology. *EMBO Rep.* 5, 835–837. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor928>.
- Gessi, S., Merighi, S., Andrea Borea, P., 2010. Glucocorticoids pharmacology: past, present and future. *Curr. Pharm. Des.* 16, 3540–3553. <https://doi.org/10.2174/138161210793797915>.
- Hellal-Levy, C., Couette, B., Fagart, J., Souque, A., Gomez-Sanchez, C., Rafestin-Oblin, M.E., 1999. Specific hydroxylations determine selective corticosteroid recognition by human glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *FEBS Lett.* 464, 9–13. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01667-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01667-1).
- Jones, J.A., Vernacchio, V.R., Lachance, D.M., Lebovich, M., Fu, L., Shirke, A.N., Schultz, V.L., Cress, B., Linhardt, R.J., Koffas, M.A.G., 2015. EPathOptimize: a combinatorial approach for transcriptional balancing of metabolic pathways. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/srep11301>.
- Julsing, M.K., Cornelissen, S., Bühler, B., Schmid, A., 2008. Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.029>.
- King, R.J.B., Mainwaring, W.I.P., 2014. *Steroid-Cell Interactions*. Elsevier.
- Kiss, F.M., Lundemo, M.T., Zapp, J., Woodley, J.M., Bernhardt, R., 2015. Process development for the production of 15 β -hydroxycyproterone acetate using *Bacillus megaterium* expressing CYP106A2 as whole-cell biocatalyst. *Microb. Cell Fact.* 14, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0210-z>.
- König, L., Hartz, P., Bernhardt, R., Hannemann, F., 2019. High-yield C11-oxidation of hydrocortisone by establishment of an efficient whole-cell system in *Bacillus megaterium*. *Metab. Eng.* 55, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.06.005>.
- König, L., Brixius-Anderko, S., Milhim, M., Tavouli-Abbas, D., Hutter, M.C., Hannemann, F., Bernhardt, R., 2020. Identification and circumvention of bottlenecks in CYP21A2-mediated premedrol production using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 117, 901–911. <https://doi.org/10.1002/bit.27246>.
- Kuipers, G., Peschke, M., Bernsel, N., Ismail, N.B., Hjelm, A., Schlegel, S., Vikström, D., Luirink, J., de Gier, J.W., 2017. In: Burgess-Brown, N. (Ed.), *Optimizing E. coli-Based Membrane Protein Production Using Lemo21(DE3) or pREx and GFP-Fusions*. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6887-9_7. 1586.
- Lin, H., Castro, N.M., Bennett, G.N., San, K.Y., 2006. Acetyl-CoA synthetase over-expression in *Escherichia coli* demonstrates more efficient acetate assimilation and lower acetate accumulation: a potential tool in metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 870–874. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0230-4>.
- Liu, W., Xu, X., Zhang, R., Cheng, T., Cao, Y., Li, X., Guo, J., Liu, H., Xian, M., 2016. Engineering *Escherichia coli* for high-yield geraniol production with biotransformation of geranyl acetate to geraniol under fed-batch culture. *Biotechnol. Biofuels* 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0466-5>.
- Löwenberg, M., Stahn, C., Hommes, D.W., Buttgereit, F., 2008. Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids* 73, 1025–1029. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.12.002>.
- Luhder, F., Reichardt, H.M., 2009. Traditional concepts and future avenues of glucocorticoid action in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis therapy. *Crit. Rev. Immunol.* 29, 255–273. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v29.i3.50>.
- Lundemo, M.T., Woodley, J.M., 2015. Guidelines for development and implementation of biocatalytic P450 processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2465–2483. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6403-x>.
- Martinez, C., Rupasinghe, S., 2013. Cytochrome P450 bioreactors in the pharmaceutical industry: challenges and opportunities. *Curr. Top. Med. Chem.* 13, 1470–1490. <https://doi.org/10.2174/15680266113139990111>.

- Metge, C.J., Blanchard, J.F., Peterson, S., Bernstein, C.N., 2001. Use of pharmaceuticals by inflammatory bowel disease patients: a population-based study. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 3348–3355. [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(01\)03817-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(01)03817-5).
- Miroux, B., Walker, J.E., 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260 (3), 289–298.
- Mosa, A., Hutter, M.C., Zapp, J., Bernhardt, R., Hannemann, F., 2015. Regioselective acetylation of C21 hydroxysteroids by the bacterial chloramphenicol acetyltransferase I. *ChemBioChem* 16, 1670–1679. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500125>.
- Mutalik, V.K., Guimaraes, J.C., Cambray, G., Lam, C., Christoffersen, M.J., Mai, Q.A., Tran, A.B., Paull, M., Keasling, J.D., Arkin, A.P., Endy, D., 2013. Precise and reliable gene expression via standard transcription and translation initiation elements. *Nat. Methods* 10, 354–360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2404>.
- Paul, S., Stang, A., Lennartz, K., Tenbusch, M., Überla, K., 2013. Selection of a T7 promoter mutant with enhanced in vitro activity by a novel multi-copy bead display approach for in vitro evolution. *Nucleic Acids Res.* 41, 1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks940>.
- Rabe, K.S., Gandubert, V.J., Spengler, M., Erkelenz, M., Niemeyer, C.M., 2008. Engineering and assaying of cytochrome P450 biocatalysts. *Anal. Bioanal. Chem.* 392, 1059–1073. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2248-9>.
- Ringle, M., Khatri, Y., Zapp, J., Hannemann, F., Bernhardt, R., 2013. Application of a new versatile electron transfer system for cytochrome P450-based *Escherichia coli* whole-cell bioconversions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7741–7754. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4612-0>.
- Schäcke, H., 2002. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol. Ther.* 96, 23–43. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00297-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00297-8).
- Studier, F.W., 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 41, 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W., 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60–89.
- Thiele, K., Buttgerit, F., Huscher, D., Zink, A., 2005. Current use of glucocorticoids in patients with rheumatoid arthritis in Germany. *Arthritis Care Res.* 53, 740–747. <https://doi.org/10.1002/art.21467>.
- Tiwari, R., Köffel, R., Schneider, R., 2007. An acetylation/deacetylation cycle controls the export of sterols and steroids from *S. cerevisiae*. *EMBO J.* 26, 5109–5119. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601924>.
- Tong, W.-Y., Dong, X., 2009. Microbial biotransformation: recent developments on steroid drugs. *Recent Pat. Biotechnol.* 3, 141–153. <https://doi.org/10.2174/187220809788700157>.
- Urlacher, V.B., Girhard, M., 2012. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* 30, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.012>.
- Vallari, D.S., Jackowski, S., Rock, C., 1987. Regulation of pantothenate kinase by coenzyme A and its thioesters. *J. Biol. Chem.* 262, 2468–2471.
- Wagner, S., Klepsch, M.M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Van Wijk, K.J., Slotboom, D.J., Persson, J.O., De Gier, J., 2008. Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14371–14376. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804090105>.
- Walton, A.Z., Stewart, J.D., 2004. Understanding and improving NADPH-dependent reactions by nongrowing *Escherichia coli* cells. *Biotechnol. Prog.* 403–411.

Supplementary data

Table S1: Used primer for T7 promoter modification via PCR

#	Primer name	Primer sequence
1	Cat_P3_for	TTATTAATTCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGATAACAATTCCCCTCTAG
2	Cat_P3_rev	GATGAATTAATAAGCAAATAAATTTTTCGAGATCTCGATCCTCTACGCCG
3	Cat_P8_for	TTAATCATCCGGCTCGTATAATGGTTGGATAACAATTCCCCTCTAG
4	Cat_P8_rev	TTATACGAGCCGGATGATTAAGTGAACGAGATCTCGATCCTCTACGCCG
5	Cat_P13_for	ATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGATAACAATTCCCCTCTAG
6	Cat_P13_rev	TATACGAGCCGGATGATTAATAGGGAACGAGATCTCGATCCTCTACGCCG
7	Cat_C4_for	ACTCACTAT CAAGGAATTGTGAGCGGATAAC
8	Cat_C4_rev	CAATTC TTGATAGTGAGTCGTATTAATTT CGC
9	Cat_C15_for	GACTCACA AATCGCGGAGTTGTGAGCGGATAACAATTCC
10	Cat_C15_rev	ACA ACTCCGCGATTGTGAGTCGTATTAATTT CGCG
11	Cat_C15_0 for	GACTCACA AATCGCGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCC
12	Cat_C15_0 rev	ACA ATTCCGCGATTGTGAGTCGTATTAATTT CGCG
13	rha_for	CCGGCGTAGAGGATCG AGATCTCG CACCACAATTCAGCAAATTGTG
14	rha_rev	CTAGAGGGGAATTGTTATCT ACGACCAGTCTAAAAAGCGCCTGAATTC

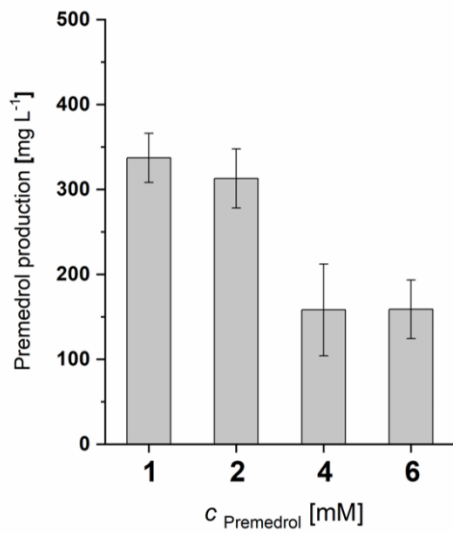


Figure S1: Premedrol production of C_CYP21_b5 in dependence on the premedrol concentration indicating product inhibition. Biotransformations were performed using a medrane concentration of 1.2 mM and varying premedrol concentrations of 1 to 6 mM in KP_i buffer supplemented with $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ polymyxin B and 2 % glycerol. Samples were taken after 24 h conversion time and premedrol production was quantified via RP-HPLC. Resulting premedrol yields (ordinate) were calculated by subtraction of the added premedrol (abscissa). Values correspond to the mean of three conversion experiments. Error bars indicate the respective standard deviation.

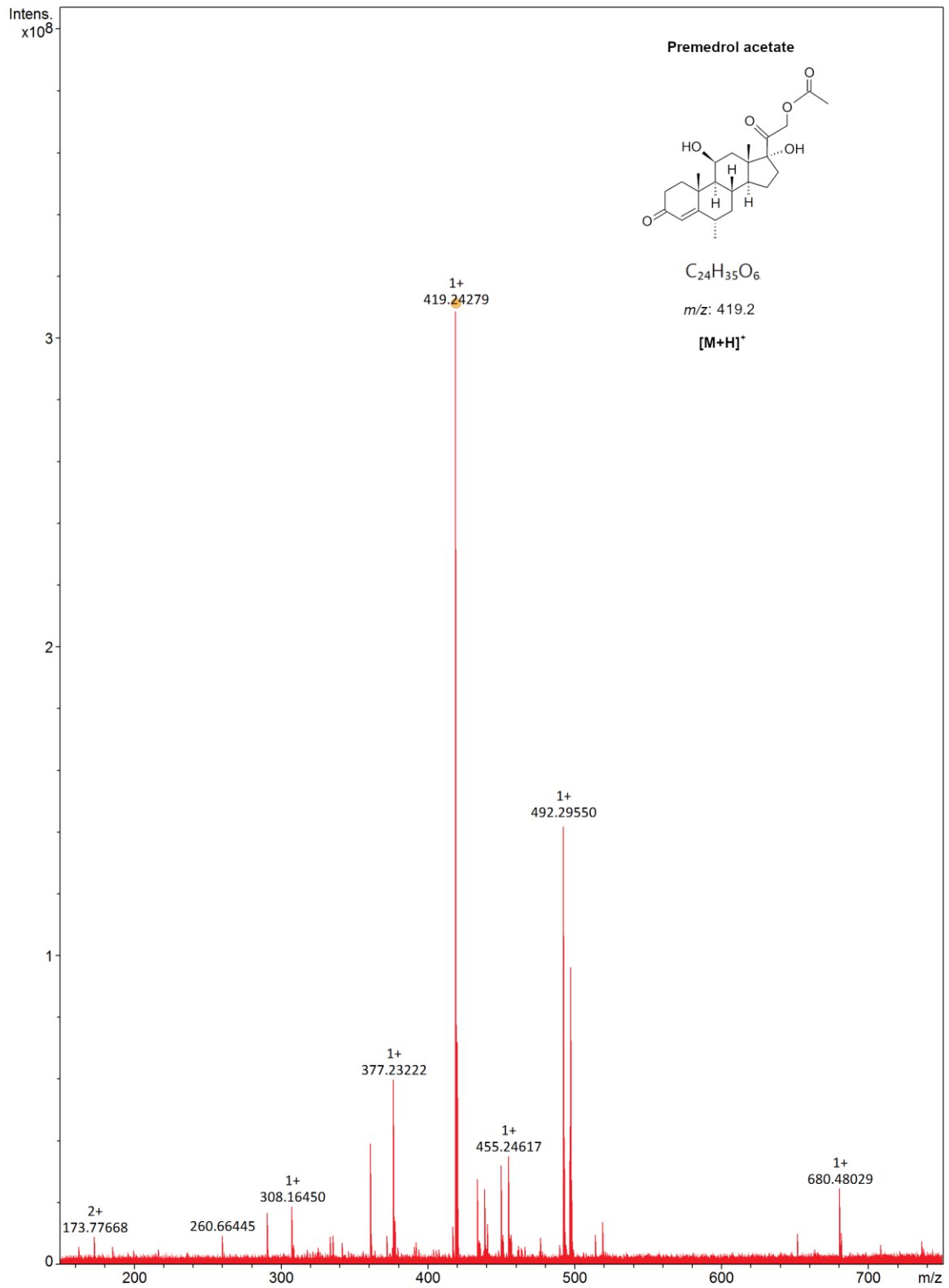


Figure S2: Mass spectra of the mixed-culture reaction with 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Polymyxin B after 120 h displayed in Fig. 8B. Mass spectrometry (MS) analysis was performed using a QTRAP[®] 5500 LC-MS/MS System via Electrospray ionization (ESI).

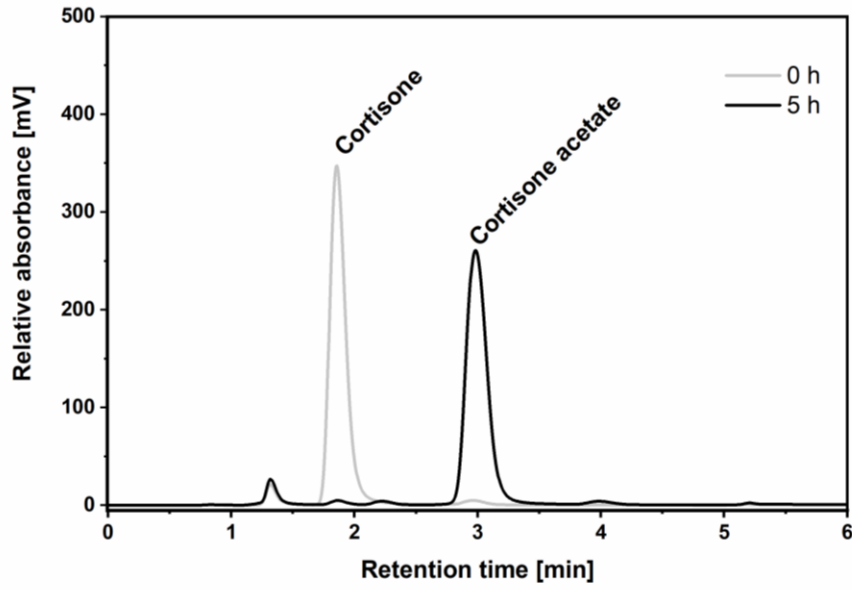


Figure S3: Whole-cell biotransformation of 1 mM cortisone was performed. After CAT1 expression, the cells were adjusted to 25 g L⁻¹ and transferred into KP_i (100 mM, pH 7.4, 500 mM glucose, 1mM cortisone). The absorbance of cortisone and the product cortisone acetate after 0 h (grey line) and 5 h (black line) are shown in the chromatogram. Samples were analyzed via HPLC.

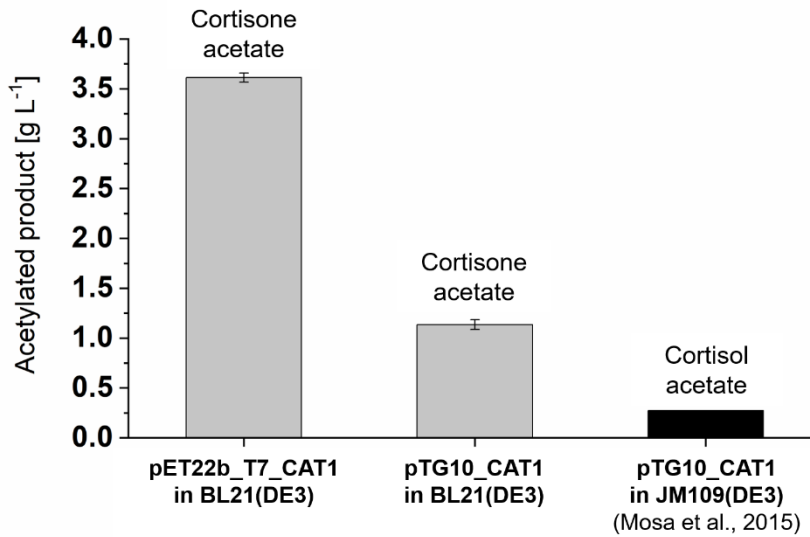


Figure S4: Cortisone acetate (grey columns) and cortisol acetate (black column, reference system, values taken from Mosa *et al.*, 2015) formation dependent on the used *E. coli* strain and expression system. The recombinant *E. coli* strains are described in Table 1. After the expression period of 24 h, resting cells were utilized for performance of steroid acetylation. Samples were taken after 24 h and analyzed via RP-HPLC. The values correspond to the mean of three conversion reactions. Error bars indicate the standard deviation.

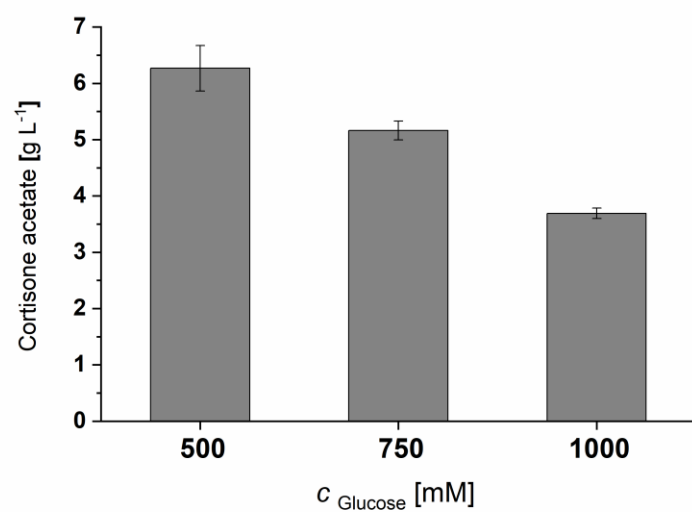


Figure S5: Cortisone acetate formation of B_C4 dependent on the glucose concentration the conversion buffer (100 mM KPi, pH 7.4). After the expression period of 24 h, resting cells were utilized for performance of steroid acetylation. Samples were taken after 24 h conversion and analyzed via RP-HPLC. The values correspond to the mean of three conversion reactions. Error bars indicate the standard deviation.

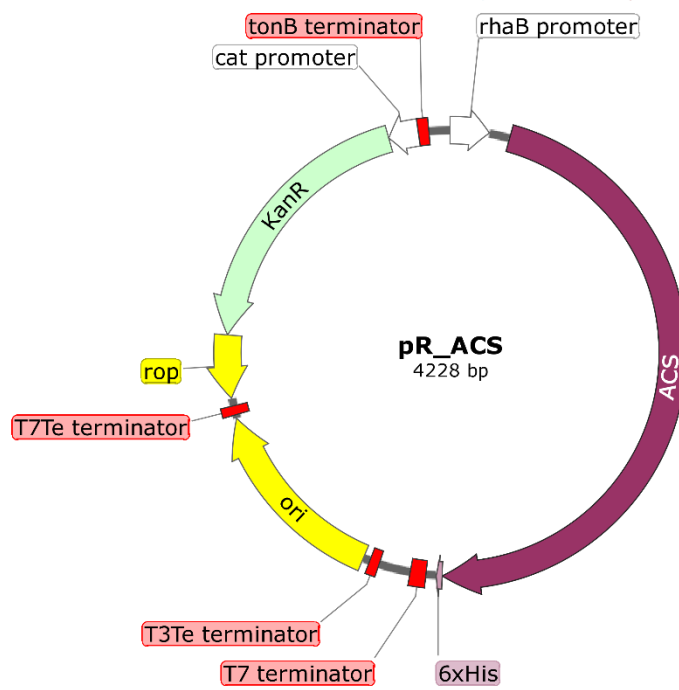


Figure S6: Vector map of pR_ACS for acetyl coA synthetase (ACS) expression. The ACS related sequence section is depicted in purple, the promoter section in white. Abbreviations: 6xHis (Polyhistidine tag), KanR (kanamycin resistance gene).

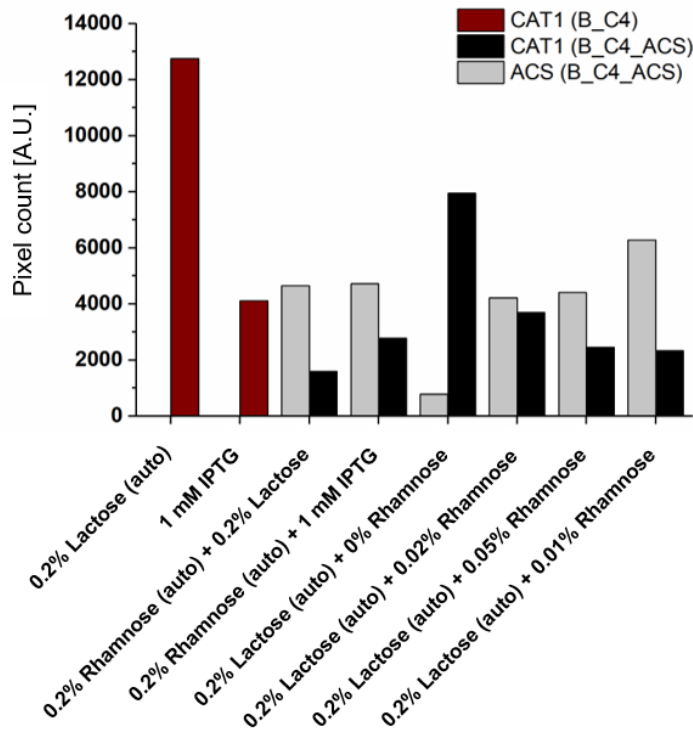


Figure S7: Absolute pixel counts as output from ImageJ describing band intensities of the SDS gel. The signals describe ACS and CAT1 expression level in dependence on inducers used, chronological order of inducers and different rhamnose concentrations (0 to 0.1%). The CAT1 expression of recombinant strain B_C4 (red columns) and B_C4_ACS (black columns) is shown, as well as the ACS expression level in B_C4_ACS (grey columns). The recombinant *E. coli* strains were cultivated in a respective autoinduction medium (containing rhamnose or lactose) and were supplemented with or without an additional inducer. The bioconversion was performed in 100 mM KPi buffer containing 500 mM glucose and 20 mM cortisone

2.4 Putkaradze et al. (2020)

Highly regio- and stereoselective hydroxylation of vitamin D2 by CYP109E1.

Natalia Putkaradze, **Lisa König**, Lars Kattner, Michael C. Hutter, Rita Bernhardt

Biochemical and Biophysical Research Communications. 2020;524(2):295-300.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.091>

Reprinted with the permission of Elsevier.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Highly regio- and stereoselective hydroxylation of vitamin D2 by CYP109E1

Natalia Putkaradze^a, Lisa König^a, Lars Kattner^b, Michael C. Hutter^c, Rita Bernhardt^{a,*}^a Institute of Biochemistry, Saarland University, D-66123, Saarbruecken, Germany^b Endotherm Life Science Molecules, D-66123, Saarbruecken, Germany^c Center for Bioinformatics, Saarland University, D-66123, Saarbruecken, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2019

Accepted 15 January 2020

Available online 25 January 2020

Keywords:

Cytochrome P450

CYP109

Vitamin D

Hydroxylase

24,25-diOH VD2

ABSTRACT

Vitamin D2 is a form of vitamin D derived from mushrooms and plants which is structurally modified in the body due to the action of several enzymes. The resulting metabolites represent important compounds with potential bioactive properties. However, they are poorly studied and their availability is mostly limited. In order to identify new enzymes capable of producing vitamin D2 metabolites, we investigated a bacterial P450 monooxygenase, CYP109E1, which was previously shown to be a vitamin D3 hydroxylase. It was found that CYP109E1 catalyzes a vitamin D2 two-step hydroxylation at positions C24 and C25 resulting in the generation of 24(R),25-diOH VD2. Interestingly, the enzyme showed high selectivity towards vitamin D2, whereas it showed an unselective product pattern for the structurally similar vitamin D3. Our docking results for vitamin D2 and D3 revealed favorable hydroxylation positions for both substrates and suggested an explanation for the high selectivity of CYP109E1 towards vitamin D2. In addition, we established a whole-cell biocatalyst expressing CYP109E1 in *Bacillus megaterium* to produce 24(R),25-diOH VD2 and a production yield of 12.3 ± 1.2 mg/L was obtained after 48 h. To the best of our knowledge, this is the first report on the generation of 24(R),25-diOH VD2 by a microbial biocatalyst allowing a low-cost and eco-friendly production of this pharmaceutically interesting and expensive metabolite from the relatively cheap substrate, VD2.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The term vitamin D (VD) refers to two structurally and functionally related secosteroids, vitamin D2 (VD2, ergocalciferol) and D3 (VD3, cholecalciferol). VD2 is a derivative of ergosterol in fungi and yeast whereas VD3 is photosynthesized from 7-dehydrocholesterol in the skin due to the action of solar ultraviolet B radiation [1]. Both forms are hormone precursors lacking biological activity on their own. They are activated and further modified by cytochrome P450 monooxygenases (P450s) [2,3]. The most potent form of VD, 1,25-diOH VD3, is known to be crucial for maintaining calcium homeostasis in the body but can also regulate cell proliferation and differentiation [2]. Apart from this, a high number of VD metabolites have been isolated. However, their physiological functions are mostly unknown due to poor

availability of these compounds. Due to a very high clinical importance of VD metabolites, many previous studies aimed to chemically synthesize these compounds for functional studies as well as to characterize the enzymes involved in VD metabolism in humans (reviewed by Sakaki et al. [2] and Kattner and Volmer [4]). It is known that several membrane-bound P450 isoforms (CYP2R1, CYP27A1, CYP27B1, and CYP24A1) contribute to VD metabolism carrying out the crucial oxidation steps, including 25-, 24- and 1-hydroxylations [3]. Moreover, a few P450s from bacterial origin have been identified to be capable of metabolizing VD and its derivatives such as CYP105A1 from *Streptomyces griseolus*, CYP107 from *Pseudonocardia autotrophica* and CYP109E1 from *Bacillus megaterium* [5–7]. These microbial enzymes are particularly interesting as biocatalysts since they enable the production of VD metabolites in an easy and environment-friendly manner, in contrast to classical chemical synthesis. So far these bacterial P450 systems have been mostly investigated for their activity towards VD3 and there is only very little known about VD2 metabolizing P450s. Although VD2 is considered to be less potent than VD3, it is metabolized in the human body and shows significant effects on

* Corresponding author. Institute of Biochemistry, Saarland University, Campus, B 2.2, D-66123, Saarbruecken, Germany.

E-mail address: ritabern@mx.uni-saarland.de (R. Bernhardt).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.091>

0006-291X/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

the overall VD status in mammals when taken via certain food and food supplements [8–11]. Consequently, physiological VD2 metabolites are important compounds for further functional studies although such studies are scarce due to the lack of efficient production systems for these metabolites.

In this study, we aimed to investigate the activity of the bacterial P450, CYP109E1, towards VD2 in order to explore a new biocatalyst capable of producing VD2 metabolites. CYP109E1 has been extensively studied by our group and was identified as versatile monooxygenase acting on chemically different compounds, among others on cholesterol and VD3 [7,12,13]. The wild-type CYP109E1 showed, however, an unselective product pattern for VD3 hydroxylation [7]. Owing to the fact that VD2 differs from VD3 exclusively at the hydrocarbon side chain, we supposed that pronounced differences might occur in the metabolism of VD2 in comparison to VD3 and examined the activity of CYP109E1 for VD2 hydroxylation. Our experiments revealed that CYP109E1 acts as a highly regio- and stereoselective VD2 hydroxylase and is able to synthesize one of the physiological VD2 metabolites, 24(R),25-diOH VD2, via two-step hydroxylation. A CYP109E1 expressing system in *B. megaterium* was established that was able to produce 24(R),25-diOH VD2 in an inexpensive and sustainable way.

2. Materials and methods

2.1. Strains and chemicals

For purification, CYP109E1 was expressed in *Escherichia coli* C43 (DE3) cells (Lucigen, Middleton, WI, USA) harboring the plasmid pET17b.CYP109E1 [7]. *E. coli* strains JM109 and BL21 were used for the expression of bovine redox proteins. Whole-cell conversions of VD2 were performed using *B. megaterium* MS941 strain harboring the plasmid pSMF2.1.CYP109E1. VD2, 25-OH VD2, 24(R),25-diOH VD2, 24(S),25-diOH VD2 were provided by Endotherm (Saarbruecken, Germany). All other reagents and chemicals were from standard sources and of highest purity available.

2.2. Protein expression and purification

The heterologous expression and purification of CYP109E1 was performed as described previously [12]. The bovine adrenodoxin reductase (AdR) and the truncated bovine adrenodoxin (Adx_{4–108}) were expressed and purified as reported by Sagara et al. [14] and Uhlmann et al. [15].

2.3. In vitro conversion

The *in vitro* turnover of VD2 was performed with a reconstituted system, containing CYP109E1 (1 μ M), bovine AdR and Adx_{4–108} in a molar ratio of 1:2:20. For the continuous electron supply, a NADPH regeneration system was used consisting of 1 U glucose-6-phosphate-dehydrogenase, 5 mM glucose-6-phosphate and 1 mM MgCl₂. Either VD2, dissolved in 45% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin/water or 25-OH VD2, dissolved in ethanol, were added to the reaction mixture with a final concentration of 80 μ M. The reactions were carried out in 250 μ L total reaction volume with 50 mM potassium phosphate buffer (with 10% glycerol, pH 7.4) at 30 °C and 750 rpm. The reactions were quenched after 6 and 90 min and extracted with ethyl acetate.

2.4. Whole-cell conversion

B. megaterium cells were grown over night at 37 °C in 30 mL LB medium supplemented with 10 μ g/mL tetracycline. The main cultures were prepared by inoculating of 50 mL of an enriched

medium (24 g/L yeast extract, 12 g/L soytone, 0.5% glycerol (v/v), 12.5 g/L K₂HPO₄, 2.3 g/L KH₂PO₄, 10 μ g/mL tetracycline) with 1% of the overnight culture (v/v) and were grown under shaking (160 rpm) at 37 °C until the OD_{578nm} of 0.5 was reached. Then, the expression of CYP109E1 was induced by addition of 5 g/L xylose and the culture was further incubated at 30 °C and 150 rpm. After 22 h of incubation, the cells were harvested by centrifugation at 4500 x g for 15 min followed by a washing step with 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 2% glycerol (v/v). Whole-cell conversion of 160 μ M VD2 (dissolved in 45% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and 4% *Quillaja* saponin solution) was carried out in a 25 mL reaction volume (90 \pm 10 g wet cells in 1 L potassium phosphate buffer) in a rotary shaker at 30 °C and 150 rpm. Samples were taken at different time points, extracted with a triple volume of ethyl acetate, dried under vacuum and stored at – 20 °C until HPLC analysis. For the production of the final product in mg quantities for NMR analysis, the culture volume was upscaled to 1 L and extracted with ethyl acetate.

2.5. RP-HPLC analysis

For the reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis the samples were dissolved in 200 μ L acetonitrile. The measurements were carried out on a Jasco system (Pu-980 HPLC pump, AS-950 sampler, UV-975 UV/Vis detector, LG-980-02 gradient unit (Gross-Umstadt, Germany)) equipped with an EC 125/4 NUCLEODUR 100-5 C18 column from Macherey Nagel (Dueren, Germany). The column temperature was adjusted to 40 °C and the flow rate was set at 1 mL/min. A linear gradient of 65.8% aqueous acetonitrile to 100% pure acetonitrile for 19 min followed by 100% acetonitrile for 12 min was used. The UV detection of VD2 and its metabolites was accomplished at 265 nm. The production of 25-OH VD2 and 24(R),25-diOH VD2 was quantified using the peak areas (mV) of the metabolites on HPLC chromatograms and the respective calibration curves.

2.6. Isolation of VD2 metabolite and NMR characterization

For the HPLC separation of the final product P2 from the cell extract, the samples (10 mg) were dissolved in 0.5 mL chloroform:methanol mixture (99:1). The separation measurements were carried out on a Varian system (PrepStar SD-1, 320 UV/Vis detector Model) equipped with a Dynamax-60 Å preparative column (Si-83-121-C) from Rainin Instruments (MA, USA). The column temperature was at RT and the flow rate was set at 17 mL/min. The UV detection of VD2 and its metabolites was accomplished at 254 nm. NMR spectra were recorded in D₆-Acetone with a Bruker DRX 500 spectrometer. The structure of P2 was assigned by ¹H/¹³C NMR.

2.6.1. P2 (24(R),25-diOH VD2):

¹H NMR (D₆-Acetone, 500 MHz): δ 0.59 (s, 3xH-18), 1.04 (d, J = 6.5 Hz, 3xH-21), 1.14 (d, J = 2.5 Hz, 3xH-26 + 3xH-27), 1.23 (s, 3xH-28), 1.29–2.24 (m, 16H), 2.41 (m, H), 2.54 (m, H), 2.86 (m, H), 3.19 (s, OH), 3.38 (s, OH), 3.69 (d, J = 4.5 Hz, OH), 3.79 (m, H-3), 4.74 (brs, H-19), 5.03 (brs, H-19), 5.55 (dd, J = 15.5 and 8.5 Hz, H-22), 5.69 (d, J = 15.5 Hz, H-23), 6.06 (d, J = 11.0 Hz, H-6), 6.23 (d, J = 11.0 Hz, H-7).

¹³C NMR (D₆-Acetone, 125 MHz): δ 12.58 (CH₃, C-18), 21.23 (CH₃, C-21), 22.91, 23.26, 24.16, 25.36, 25.50, 28.52, 33.19 (CH₂, C-1), 36.60 (CH₂, C-2), 41.07 (CH, C-12), 41.20 (CH₂, C-20), 46.41 (C, C-13), 47.13 (CH₂, C-4), 57.04 (CH, C-17), 57.28 (CH, C-14), 69.61 (CH, C-3), 74.71 (C, C-25), 77.00 (C, C-24), 112.19 (CH₂, C-19), 118.77 (CH, C-7), 122.15 (CH, C-6), 125.76 (CH, C-22), 133.32 (C, C-5), 135.41 (CH, C-23), 137.48, (C, C-8), 141.62 (C, C-10).

2.7. Computational methods

The crystal structure of CYP109E1 in complex with testosterone (PDB code 5L94) was chosen as receptor [16]. Chain A was prepared using AutoDockTools (version 1.5.6r3) [17]. Protonation states of the histidine residues were assigned manually by visual inspection of the hydrogen-bonding network. Remaining hydrogen atoms and Kollman charges were added by the program. Atomic charges for the heme group were taken from previous docking studies [18]. The molecular structures of the ligands were generated in the same way as described for these studies. Further preparation steps for docking were carried out with AutoDockTools. In order to comprise the entire binding pocket, the rectangular grid box had an extension of $52 \times 50 \times 72$ point with a default grid spacing of 0.375 Å centered above the heme. The actual docking was carried out by AutoDock (version 4.2), applying the Lamarckian genetic algorithm for a total of 250 docking runs [17]. Otherwise default parameter settings were used. Resulting conformations of VD2 and VD3 were inspected manually using VMD (version 1.9.1) [19].

3. Results and discussion

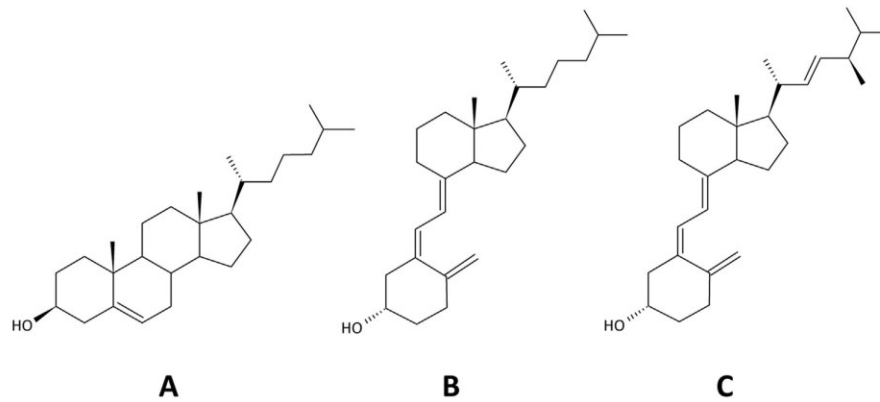
The VD metabolism represents a challenging and exciting research area for more than 40 years since VD is an important prohormone showing high impact on human health. It is a fat-soluble vitamin, occurs in form of VD2 and VD3 in nature and plays a key role in maintaining calcium homeostasis [20,21]. The VD forms undergo several enzymatic oxidations in the human body and are transformed into different molecules, such as side-chain modified VD derivatives. One of these compounds, 25-OH VD3, is known to be the major circulating VD metabolite under normal conditions, whereas several other metabolites, such as 24,25-diOH VD2 and 25,26-diOH VD2, exist to a lesser extent in the plasma [20,22]. Although the majority of the side-chain modified metabolites are believed to be less potent than the most active form, 1,25-diOH VD3, they occur in a considerable amount but their physiological roles are not fully discovered yet [8,10]. One issue regarding their functional investigation could be the scarce availability of VD metabolites, which can be overcome by chemical or enzymatic synthesis of these compounds. Given that chemical methods are challenging and harmful for the environment, exploring biocatalytic alternatives for the production of these physiological metabolites is highly desirable and of great biotechnological importance. P450s are a superfamily of biocatalysts which are able to act on VD and its metabolites and to produce complex derivatives under mild reaction conditions. Besides the mammalian P450s, there are a small number of microbial P450 enzymes that were characterized as VD hydroxylases [5–7]. One of those, CYP109E1, was intensively studied in our laboratory and its crystal structure was solved in a substrate-free as well as in substrate-bound form with the steroidal substrate, testosterone [16]. Besides being able to convert VD3 and testosterone, this enzyme was found to efficiently act on cholesterol, another steroidal compound with a hydrocarbon side chain [13]. Interestingly, the enzyme showed low selectivity for VD3 converting this compound into several (4 main and 3 minor) products [7], whereas much higher selectivity was observed for cholesterol conversion resulting in the generation of only two main products [13]. It was found that CYP109E1 prefers hydroxylation at the side-chain positions 24(S) and 25 for both substrates. Such similarities were not surprising since cholesterol is a precursor of VD3 and they do not differ from each other in the structure of the side-chain (Scheme 1). In this context, it was interesting to examine the activity of CYP109E1 towards another steroidal compound possessing a hydrocarbon side chain with another chemical

structure than that of VD3 and cholesterol. Therefore, we have focused on VD2, since, in contrast to VD3, it has a methyl group at C24 and a double bond between C22 and C23 (Scheme 1). Position 24 in VD2 is highly reactive since it is both a tertiary carbon and an allylic position.

The *in vitro* conversion of VD2 by a reconstituted CYP109E1 system over time showed that the substrate was at first converted into product P1, which was the main product after 6 min of reaction. P1 was then further metabolized into P2 (Fig. 1). Thus, the enzyme was capable of converting VD2 into one main product, P2, via an intermediate P1 which is in contrast to the conversion of VD3, where 7 products are generated [7].

In order to produce mg amounts of P2 for its structural determination, we have further investigated the CYP109E1-mediated conversion of VD2 *in vivo* using *B. megaterium* MS941. This strain was applied in our previous studies to establish effective whole-cell biocatalysts for the production of important steroidal compounds, such as 15-hydroxycyproterone acetate, cortisone and 25-OH VD3 [7,23,24]. The CYP109E1 whole-cell biocatalyst was successfully applied in this study for the conversion of VD2 and accomplished the production of P2 via the intermediate P1, similar to the *in vitro* transformation (Fig. 1B and C). Thus, the *in vivo* system was identified to be useful for the production of VD2 metabolites of CYP109E1 and was subsequently used to generate sufficient amounts of P2 for its structure determination. The P2 product was purified from the cell extracts via preparative HPLC and was analyzed by NMR. The ^1H and ^{13}C NMR identified P2 as dihydroxylated VD2 metabolite with hydroxyl groups at C24 and C25 (see NMR Data). To confirm the stereochemistry of the C24 hydroxyl, we compared P2 with authentic standards of 24(R),25-diOH VD2 and 24(S),25-diOH via RP-HPLC. In addition, we compared the intermediate product P1 with the authentic standard of 25-OH VD2. The retention times of the peaks strongly suggested that P1 is 25-OH VD2 and the final product is 24(R),25-diOH VD2 (Fig. 2 A and B, Scheme 2), which is one of the metabolites of VD2 detected in animal plasma [10]. It is known, that 24(R),25-diOH VD2 can be produced either from 24-OH VD2 or 25-OH VD2 whereby the latter one being the favored precursor [25]. We have checked the catalytic activity of CYP109E1 towards 25-OH VD2 and observed the formation of 24(R),25-diOH VD2 *in vitro* (data not shown). Unfortunately, 24-OH VD2 was not commercially available for an *in vitro* activity assay with CYP109E1.

To shed light on the experimentally observed selectivity of CYP109E1 towards VD2 and differences to the conversion of VD3, molecular docking calculations were performed using the crystal structure of CYP109E1. The obtained conformations of VD2 suggest that in the first step VD2 can be hydroxylated in both positions (24(R) and 25), whereby position 24(R) is conformationally favored (Fig. 3A). However, upon the formation of 24(R)-OH VD2, no further reaction is expected, because no appropriate conformation that would allow hydroxylation at position 25 was observed. On the other hand, viewed from the point of the most frequently adapted docking conformations, the subsequent hydroxylation of 25-OH VD2 to 24(R),25-diOH VD2 is favored supporting the experimentally observed results. In contrast, when looking at the docked conformations for VD3, the most often adopted conformation of the substrate, which was also energetically most favorable, showed the positions 22 and 23 nearer to the heme iron than the corresponding position 24 (Fig. 3B). It was further found that hydroxylation at all three conceivable positions (24(R), 24(S), and 25) may occur although these positions were energetically less favorable. This fully supports the observed production of several metabolites of VD3 by CYP109E1. Thus, the obtained docking conformations explain the selectivity of the enzyme towards VD2 and VD3 hydroxylation.



Scheme 1. Chemical structures of cholesterol (A), VD3 (B) and VD2 (C).

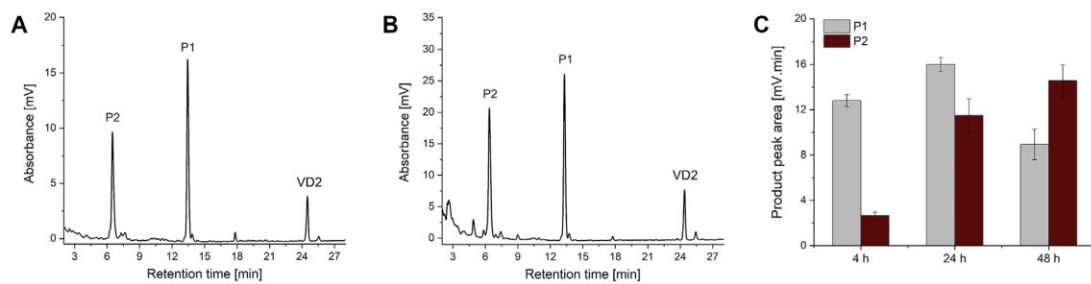


Fig. 1. Biotransformation of VD2 by CYP109E1: HPLC product pattern of the *in vitro* (A) and whole-cell conversion (B), and observed HPLC product peaks of P1 and P2 after 4, 24 and 48 h whole-cell conversion (C). The data represent mean values of three independent experiments.

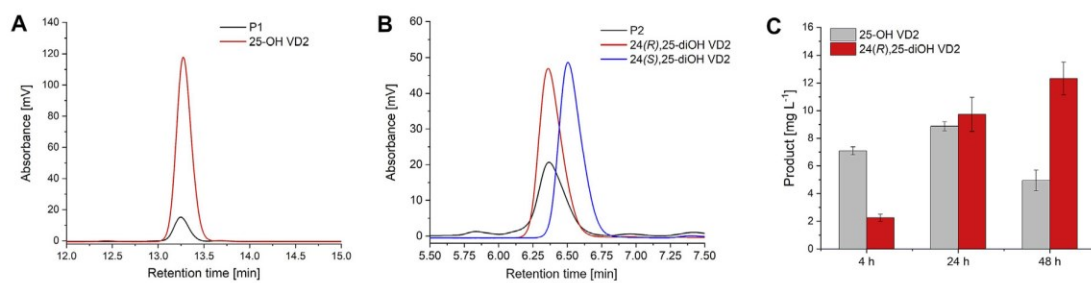
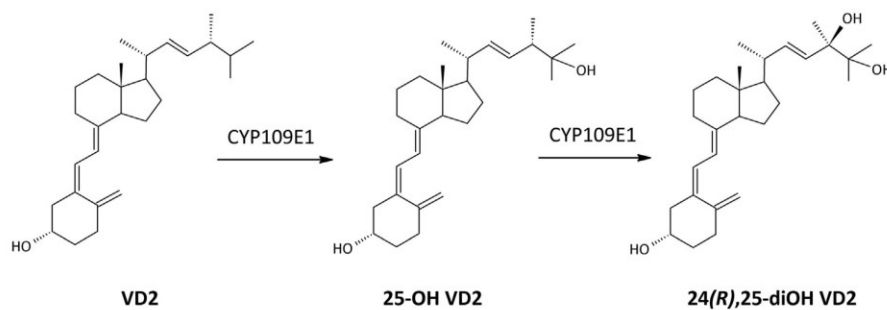


Fig. 2. Comparison of HPLC retention times of: product P1 and the authentic standard of 25-OH VD2 (A), product P2 and the authentic standards of 24(R),25-diOH VD2 and 24(S),25-diOH VD2 (B) and production yield of VD2 metabolites by the CYP109E1-containing whole-cell system after 4, 24 and 48 h (C). The data represent mean values of three independent experiments.



Scheme 2. Proposed reaction pathway of VD2 by CYP109E1.

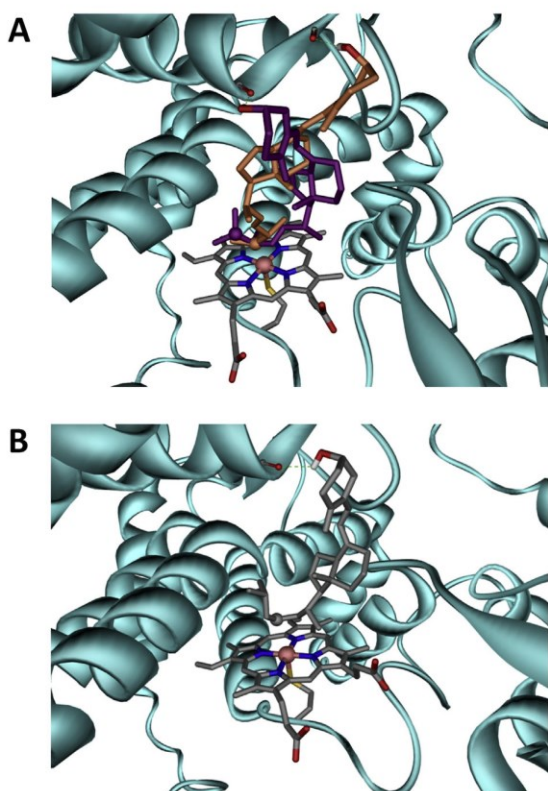


Fig. 3. A) The obtained docking conformations showing the hydroxylation positions of vitamin D2 in position 25 (orange) and position 24 (purple). The respective distance to the heme iron (depicted as large sphere) are both 3.1 Å, respectively. Position 25 in both conformers is shown as sphere. Hydrogen-bonds to backbone carbonyl oxygens are indicated as dashed green lines. B) The most often adapted and best scored docking position of vitamin D3 shows position 23 (denoted as sphere) closest to the heme iron (3.0 Å), whereas the expected hydroxylation positions 24 and 25 are more distant (>4 Å). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Given that VD metabolites are important and high-priced compounds, we have further investigated the CYP109E1-mediated conversion *in vivo* using *B. megaterium* MS941. We determined the production of 25-OH VD2 as well as 24(R),25-diOH VD2 by this whole-cell biocatalyst within 48 h. As depicted in Fig. 2C, comparable amounts of hydroxy- and dihydroxy-VD2 metabolites were detected after 24 h of reaction, whereas a productivity of 12.3 ± 1.2 mg/L was achieved for 24(R)25-diOH VD2 after 48 h. Taking into account that the established whole-cell system can be further optimized for the production of 24(R)25-diOH VD2, it is a valuable tool and starting point for a sustainable production of this interesting metabolite.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of competing interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors thank Birgit Heider-Lips for the purification of AdR and Adx₄₋₁₀₈ and Dr. Josef Zapp for the NMR measurement.

References

- [1] M.F. Holick, Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 362–371, <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.3.362>.
- [2] T. Sakaki, N. Kagawa, K. Yamamoto, K. Inouye, Metabolism of vitamin D3 by cytochromes P450, *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 10 (2005) 119–134, <https://doi.org/10.2741/1514>.
- [3] I. Schuster, Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system, *Biochim. Biophys. Acta* 1814 (2011) 186–199, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.022>.
- [4] L. Kattner, D.A. Volmer, Synthesis of low abundant vitamin D metabolites and assaying their distribution in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as a new tool for diagnosis and risk prediction of vitamin D related diseases, in: S. Gowder (Ed.), *A Critical Evaluation of Vitamin D - Basic Overview*, Intech publishers, Rijeka, 2017, pp. 103–127.
- [5] N. Sawada, T. Sakaki, S. Yoneda, T. Kusudo, R. Shinkyo, M. Ohta, K. Inouye, Conversion of vitamin D3 to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 by *Streptomyces griseolus* cytochrome P450SU-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 (2004) 156–164, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.140>.
- [6] Y. Fujii, H. Kabumoto, K. Nishimura, T. Fujii, S. Yanai, K. Takeda, N. Tamura, A. Arisawa, T. Tamura, Purification, characterization, and directed evolution study of a vitamin D3 hydroxylase from *Pseudonocardia autotrophica*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385 (2009) 170–175, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.033>.
- [7] A. Abdulmughni, I.K. Jóźwik, N. Putkaradze, E. Brill, J. Zapp, A.-M.W.H. Thunnissen, F. Hannemann, R. Bernhardt, Characterization of cytochrome P450 CYP109E1 from *Bacillus megaterium* as a novel vitamin D3 hydroxylase, *J. Biotechnol.* 243 (2017) 38–47, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.023>.
- [8] D. Hartwell, C. Hassager, C. Christiansen, Effect of vitamin D2 and vitamin D3 on the serum concentrations of 1,25(OH)2D2, and 1,25(OH)2D3 in normal subjects, *Eur. J. Endocrinol.* 115 (1987) 378–384, <https://doi.org/10.1530/acta.0.1150378>.
- [9] B.W. Hollis, W.B. Pittard, Evaluation of the total fetomaternal vitamin D relationships at term: evidence for racial differences, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59 (1984) 652–657, <https://doi.org/10.1210/jcem-59-4-652>.
- [10] R.L. Horst, T.A. Reinhardt, S.G. Reddy, Vitamin D metabolism, in: D. Feldman, J.W. Pike, F.H. Glorieux (Eds.), *Vitamin D*, Elsevier Academic Press, London, 2005, pp. 15–36.
- [11] L.A. Houghton, R. Vieth, The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement, *Am. J. Clin. Nutr.* 84 (2006) 694–697, <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.4.694>.
- [12] N. Putkaradze, M. Litzenburger, A. Abdulmughni, M. Milhim, E. Brill, F. Hannemann, R. Bernhardt, CYP109E1 is a novel versatile statin and terpene oxidase from *Bacillus megaterium*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 8379–8393, <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8552-6>.
- [13] N. Putkaradze, M. Litzenburger, M.C. Hutter, R. Bernhardt, CYP109E1 from *Bacillus megaterium* acts as a 24- and 25-hydroxylase for cholesterol, *Chem-biochem* 20 (2019) 655–658, <https://doi.org/10.1002/cbic.201800595>.
- [14] Y. Sagara, A. Wada, Y. Takata, M.R. Waterman, K. Sekimizu, T. Horiuchi, Direct expression of adrenodoxin reductase in *Escherichia coli* and the functional characterization, *Biol. Pharm. Bull.* 16 (1993) 627–630, <https://doi.org/10.1248/bpb.16.627>.
- [15] H. Uhlmann, V. Beckert, D. Schwarz, R. Bernhardt, Expression of bovine adrenodoxin in *E. coli* and site-directed mutagenesis of/2 FE-25/cluster ligands, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188 (1992) 1131–1138, [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(92\)91349-u](https://doi.org/10.1016/0006-291x(92)91349-u).
- [16] I.K. Jóźwik, F.M. Kiss, L. Gricman, A. Abdulmughni, E. Brill, J. Zapp, J. Pleiss, R. Bernhardt, A.-M.W.H. Thunnissen, Structural basis of steroid binding and oxidation by the cytochrome P450 CYP109E1 from *Bacillus megaterium*, *FEBS J.* 283 (2016) 4128–4148, <https://doi.org/10.1111/febs.13911>.
- [17] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, Autodock 4 and AutoDockTools 4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791, <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- [18] N. Putkaradze, F.M. Kiss, D. Schmitz, J. Zapp, M.C. Hutter, R. Bernhardt, Biotransformation of prednisone and dexamethasone by cytochrome P450 based systems – identification of new potential drug candidates, *J. Biotechnol.* 242 (2017) 101–110, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.011>.
- [19] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD - visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33–38, [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- [20] H.F. DeLuca, The vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism, *Nutr. Rev.* 37 (1979) 161–193, <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1979.tb06660.x>.
- [21] R.C. Tuckey, C.Y.S. Cheng, A.T. Slominski, The serum vitamin D metabolome: what we know and what is still to discover, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 186

- (2019) 4–21, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.09.003>.
- [22] R.L. Horst, E.T. Littlelike, J.L. Riley, J.L. Napoli, Quantitation of vitamin D and its metabolites and their plasma concentrations in five species of animals, *Anal. Biochem.* 116 (1981) 189–203, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90344-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90344-4).
- [23] F.M. Kiss, M.T. Lundemo, J. Zapp, J.M. Woodley, R. Bernhardt, Process development for the production of 15 β -hydroxycypoterone acetate using *Bacillus megaterium* expressing CYP106A2 as whole-cell biocatalyst, *Microb. Cell Factories* 14 (2015) 28, <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0210-z>.
- [24] L. Koenig, P. Hartz, R. Bernhardt, F. Hannemann, High-yield C11-oxidation of hydrocortisone by establishment of an efficient whole-cell system in *Bacillus megaterium*, *Metab. Eng.* 55 (2019) 59–67, <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.06.005>.
- [25] N.J. Koszewski, T.A. Reinhardt, J.L. Napoli, D.C. Beitz, R.L. Horst, 24,26-Dihydroxyvitamin D₂: a unique physiological metabolite of vitamin D₂, *Biochemistry* 27 (1988) 5785–5790, <https://doi.org/10.1021/bi00415a058>.

3. Zusammenfassung und Diskussion

Die folgenden Kapitel befassen sich mit der übergreifenden Zusammenfassung und Diskussion der durchgeführten Forschungsprojekte (Kapitel 2). Hierbei erfolgt eine Aufteilung in drei Unterpunkte: Der erste Teil (**Kapitel 3.1**) befasst sich mit der isolierten Betrachtung der jeweiligen, vorgestellten Ganzzellsysteme. Hierbei stehen die unterschiedlichen Reaktionsarten und die Eigenschaften der beteiligten Enzymklassen im Vordergrund. Darüber hinaus erfolgt eine Bewertung der jeweiligen Produktivität im Ganzzellsystem, sowie der potenzielle Einsatz für industrielle Zwecke. Der zweite Teil (**Kapitel 3.2**) bezieht sich auf die ganzheitliche Betrachtung aller dargestellten Ganzzellsysteme. Hierbei liegt der Fokus auf der Identifikation und Diskussion der molekularbiologischen, biochemischen und biotechnologischen Faktoren, die isoliert oder kombiniert bestimmend für die Effizienz der durchgeführten Biokatalysen sind. Der abschließende Teil (**Kapitel 3.3**) befasst sich mit der ökologischen Bewertung des Ganzzellsystems zur Oxidation von Hydrocortison (Kapitel 2.1) und diskutiert Möglichkeiten zur Steigerung derselben. Hierbei wird die ökologische Effizienz mittels SHE-Analyse einem vergleichbaren chemischen Prozess gegenübergestellt. Diese Bewertung dient als Exempel zur Veranschaulichung der ökologischen Nachhaltigkeit und Effizienz von Ganzzellsystemen im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren der pharmazeutischen Industrie.

3.1 Potenzial von Ganzzellkatalysen in der Herstellung steroidaler Pharmazeutika

In den vergangenen Jahrzehnten wurden erhebliche Fortschritte bei der Entwicklung diverser biotechnologischer Prozesse zur Produktion steroidaler Pharmazeutika erzielt. Dennoch besteht weiterhin ein großer Bedarf an der Entwicklung von umweltfreundlicheren und gleichzeitig ökonomisch rentablen Verfahren. Biotechnologische Prozesse erfordern gegenüber chemischen Verfahren zumeist weniger extreme Reaktionsbedingungen (pH, Temperatur, Druck), was sich positiv auf den Energieverbrauch und Prozessablauf auswirkt. Insbesondere Ganzzellsysteme und die assoziierten katalytisch aktiven Enzyme weisen eine höhere Regio- und Stereoselektivität gegenüber chemischen Katalysatoren auf, welche daher oftmals eine Reduzierung der komplexen Syntheseschritte ermöglichen. So ist es durch ein Zusammenspiel verfahrenstechnischer, chemischer und molekularbiologischer Techniken möglich, biotechnologische Prozesse zu etablieren, die sowohl ökologisch als auch ökonomisch eine gesteigerte Effizienz im Vergleich zu chemischen Verfahren aufweisen.

3.1.1 Biotechnologische Modifikation von Glucocorticoiden

In Kapitel 2.2 erfolgten Optimierungsschritte zur biotechnologischen **C21-Hydroxylierung von Medran**, welche einen limitierenden Teilschritt bei der Herstellung des synthetischen Glucocorticoids Methylprednisolon darstellt (siehe Kapitel 1, Abb. 2B). Die Biokatalyse erfolgte in einem *E. coli* Ganzzellsystem, welches durch Modifikation der Kultivierungsbedingungen, der Aminosäuresequenz des beteiligten Enzyms und des P450 Redoxsystems eine Steigerung der Premedrolproduktion um 100% im Vergleich zum Startsystem ermöglichte [36]. Dies entspricht einer finalen Produktkonzentration von $0,69 \text{ g L}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$ (siehe Kapitel 2.2, Abb. 6). Zur Produktion dieser

Verbindung ist die Hydroxylierung der nicht-aktivierten C21-H-Bindung des Medrans erforderlich, welche mittels chemischer Verfahren ausschließlich durch hohe Energieeinwirkung und Verwendung von toxischen, halogenhaltigen Reagenzien erfolgen kann. Im Gegensatz dazu ermöglichte der Einsatz des P450 CYP21A2 die Spaltung von molekularem Sauerstoff unter milden Bedingungen und dessen Integration als Hydroxylgruppe im Substrat. Das optimierte Ganzzellsystem zeigte zudem eine hohe Regio- und Stereoselektivität, was eine effizientere Katalyse ermöglichte und folglich die Anzahl der Produktreinigungsschritte reduziert [82]. Es kann sowohl zur Premedrolsynthese, als auch zur effizienten C21-Hydroxylierung weiterer Steroide eingesetzt werden, wie etwa Progesteron, Deltamedran, Medroxyprogesteron und 5 α -Dihydroprogesteron oder 17 α -Hydroxyprogesteron. Diese Stoffe können zu 11-Deoxycorticosteron, 6 α -Methylprednisolon, 11-Deoxycortisol, 21-OH-Medroxyprogesteron und 21-OH-(5 α -Dihydroprogesteron) umgesetzt werden [35]. Zur weiteren Steigerung der Premedrolproduktion erwies sich die Integration einer Schutzgruppe an der C21-Hydroxygruppe als effektive Strategie (Kapitel 2.3). Obwohl Schutzgruppen zumeist in chemischen Synthesen zum Einsatz kommen, konnte die Veresterung der C21-Hydroxygruppe in Premedrol mit Essigsäure durch CAT1 im biotechnologischen Prozess einer Produktinhibierung vorbeugen (Kapitel 2.3, Abb. 8B). Die Generierung einer Mischkultur zum Zweck einer zeitgleichen C21-Acetylierung des anfallenden Premedrols aus Kapitel 2.2 bewirkte eine Verdopplung der Premedrolbildung verglichen mit der entsprechenden Monokultur (siehe Kapitel 2.3, Abb. 8B) auf 1,51 g L⁻¹. Unter milden Bedingungen ist die C21-Hydroxygruppe zwar chemisch stabil, allerdings erhöht die unmittelbare Acetylierung die Hydrophobizität des Premedrols, was dessen Neigung zur Präzipitation im wässrigen Medium erhöht. Dies ermöglicht eine gesteigerte Löslichkeit des Medrans und folglich, dessen Zugänglichkeit zu cytosolischen Proteinen im Ganzzellsystem [20,163]. In nachfolgenden Schritten könnte eine Entfernung des unlöslichen Produktes über Filtration oder Adsorption an Minerale oder Polymere wie Aktivkohle, Zeolithe, Polystyrol oder Cellulose durchgeführt werden [164]. Neben der Löslichkeit einer Substanz im Umsatzmedium kann auch dessen Toxizität, sowie die Interaktion mit weiteren Enzymen im Ganzzellsystem herabgesetzt werden und somit in höheren Ausbeuten und höherer Selektivität resultieren [165]. Das vorgestellte System eignet sich somit als ökologische Strategie zur biotechnologischen Produktentfernung während Fermentationsprozessen (ISPR, *in-situ*-product-removal) und zeigt großes Potenzial, um für effizientere Steroidhydroxylierungen in Ganzzellsystemen eingesetzt zu werden. Darüber hinaus ist das CAT1-basierte Ganzzellsystem auch isoliert betrachtet ein effizientes System zur **C21-Acetylierung von Glucocorticoiden**. Die Biokatalyse von Cortison durch das optimierte Ganzzellsystem resultierte in einer maximalen Ausbeute von 6,12 g L⁻¹ d⁻¹ Cortisonacetat (siehe Kapitel 2.3, Abb. 4). Bereits durch Mosa *et al.* konnte die Einsatzfähigkeit eines CAT1-basierten Ganzzellsystems zur selektiven C21-Acetylierung unterschiedlicher Glucocorticoide wie Hydrocortison, Corticosteron, 11-Deoxycorticosteron, Prednisolon, 11-Deoxycortisol und Aldosteron demonstriert werden [154]. Die hohe Regioselektivität ist durch die primäre, frei zugängliche C21-Hydroxygruppe begründet. Zusätzlich wird die Wahrscheinlichkeit eines nukleophilen Angriffs durch AcetylCoA während der CAT1-vermittelten Katalyse durch die benachbarte C20-Carbonylgruppe erhöht [162]. Diese Art der Steroidmodifikation ist zur Optimierung von bereits bestehenden Prozessen, sowie auch isoliert betrachtet, industriell von großer Bedeutung: Die Veresterung von Hydroxysteroiden mit kurzkettigen Fettsäuren ermöglicht die

Produktion von sogenannten Resorptionsestern und Depotsteroiden, welche ebenfalls medizinisch angewendet werden [166–168].

Als weiterer biotechnologischer Ansatz zur GC-Modifikation wurde in der Publikation Kapitel 2.1 die selektive **C11-Oxidation am Beispiel von Hydrocortison** demonstriert. Die rekombinante Produktion der ADH aus *L. brevis* und der modifizierten 11 β HSD1 aus *C. porcellus* erfolgte im *B. megaterium* Ganzzellsystem. Hierdurch konnte eine biokatalytische Synthese von Cortison etabliert werden, welche durch gezielte Optimierung in einer industriell relevanten Produktkonzentration von 14 g L⁻¹ d⁻¹ (Kapitel 2.1, Abb. 11) und -selektivität von 98% (Kapitel 2.1, Abb. 10) resultierte. Die Ganzzellkatalyse wurde in dieser Publikation (Kapitel 2.1) das erste Mal mit Produktkonzentrationen im Grammbereich beschrieben und weist eine 1000-fache Steigerung zu einem vergleichbaren Referenzsystem auf [91]. Neben der nennenswerten Wertsteigerung des Hydrocortisons um den Faktor 2,5 (Merck), eröffnet die Anwendung dieses Systems eine effiziente und ökologisch nachhaltige Möglichkeit, ausgehend von der günstig erwerbenden Verbindung Hydrocortison die Kosten für Cortison als Startmaterial zur nachfolgenden Synthese weiterer Verbindungen zu senken. Beispielsweise kann durch eine nachfolgende Dehydrogenierung des Cortisons die Produktion von Prednison erfolgen [10,169], ein synthetisches Glucocorticoid mit größerer GR-Affinität und -Selektivität im Vergleich zu Hydrocortison. Eine anschließende Acetylierung von Cortison oder des strukturähnlichen Prednisons (siehe Kapitel 2.3) ermöglicht die Produktion der jeweiligen Resorptionsester Cortisonacetat oder Prednisonacetat [170]. Darüber hinaus weist 11 β HSD1 ein breites Substratspektrum auf. Dies ermöglicht den zukünftigen Einsatz als Ganzzellsystem zur biotechnologischen Interkonversion weiterer Verbindungen wie Prednison/Prednisolon [128], einigen 7-Hydroxy/7-Ketosterolen [129,130] sowie zur Epimerisierung von 7 α - und 7 β -Hydroxysteroiden [131–133].

Die optimierte Gensequenz der *C. porcellus* 11 β HSD1 diente in einem weiteren System zur Katalyse des letzten Teilschritts einer Kaskadenreaktion (Abb. 7A). Das Ziel des folgend dargestellten *E. coli* Ganzzellsystems war die **Zweischrittsynthese von Cortison mit 11-Deoxycortisol als Ausgangsverbindung**. Zu diesem Zweck wurde das bereits etablierte *E. coli* C43(DE3) Ganzzellsystem zur Hydrocortisonsynthese mittels CYP11B1 genutzt, welches die C11-Hydroxylierung von 11-Deoxycortisol zur Produktion von Hydrocortison katalysiert (Abb. 7A) [26]. Um eine anschließende C11-Oxidation von Hydrocortison zu erreichen, wurde der Vektor pGro12 durch pREP4–groELS zur Chaperonexpression substituiert. Letzterer wurde durch das optimierte 11 β HSD1 Gen aus Kapitel 2.1 erweitert, dessen Expression unter Kontrolle eines T7-Promotors reguliert ist (pREP_HSD; siehe Abb. 7B). Dies ermöglichte die rekombinante Coexpression der Proteine hCYP11B1, *hAdx*, *hAdR*, *cp11 β HSD1* und den Chaperonen GroEL und GroES im *E. coli* C43(DE3) Ganzzellsystem. Die Ganzzellkatalyse von 11-Deoxycortisol resultierte in einer erfolgreichen Produktion von Hydrocortison und Cortison (Abb. 7C) und repräsentiert somit ein nutzbares Modellsystem für eine mehrstufige Synthese von Glucocorticoiden.

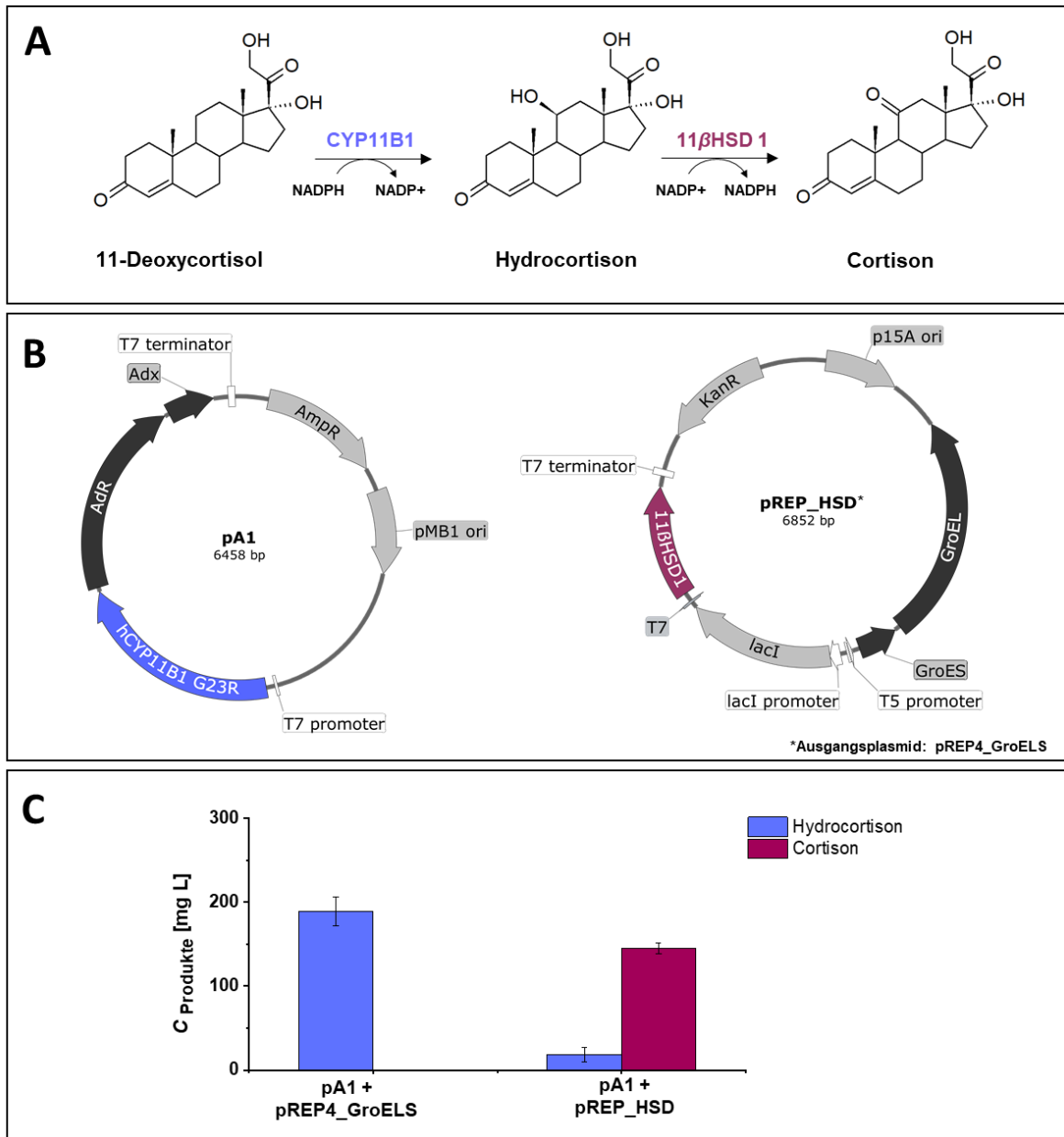


Abbildung 7: *E. coli* C43(DE) basiertes Ganzzellsystem zur Produktion von Cortison **A:** Zwischenschrittssynthese von Cortison mit 11-Deoxycortisol aus Ausgangsverbindung. Das humane CYP11B1 dient zur Hydroxylierung von 11-Deoxycortisol zur Hydrocortisonproduktion, welches im nachfolgenden Schritt mittels *Cavia porcellus* 11 β HSD1 zu Cortison oxidiert wird. **B:** Plasmidkarten; pA1 zur Coexpression von hCYP11A1 (blau) und Redoxproteinen (schwarz) gemäß Schiffer *et al.*, 2015. pREP_HSD enthält codierende Sequenzen für 11 β HSD1 (lila) und die Chaperone GroEL und GroES (schwarz). Zur Erstellung diente das Plasmid pREP4_GroELS [171] als Ausgangsplasmid. **C:** 11-Deoxycortisol Umsatz im *E. coli* Ganzzellsystem mit den Produkten Hydrocortison (blau) und Cortison (lila) nach 24 h. Die Produktkonzentrationen entsprechen den Mittelwerten aus drei Experimenten. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

3.1.2 Biotechnologische Modifikation von Secosteroiden

Nach der Metabolisierung von VD₂ werden neben der Hauptspeicherform 25(OH)VD₂ weitere Metaboliten im Plasma beobachtet. Dies schließt neben der aktivsten Form 1,25(OH)₂VD₂ auch weitere Metaboliten wie 24,25(OH)₂VD₂ mit ein, deren physiologische Rolle jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt ist [172,173]. Aufgrund einer geringen Produktausbeute mittels chemischer Synthese sind diese Substanzen nicht oder nur eingeschränkt verfügbar. Die Entwicklung von kostengünstigen und

umweltschonenden Verfahren für deren Synthese ist daher von großem Interesse. Für die Etablierung biokatalytischer Synthesewege eignet sich das grampositive Bakterium *B. megaterium* zur Produktion von VD Metaboliten. Im Gegensatz zu *E. coli* produziert dieser Organismus wirtseigene P450 mit Monooxygenaseaktivität gegenüber einigen steroidal Verbindungen [98]. Interessanterweise zeigten zwei Vertreter der CYP109-Familie, nämlich CYP109A2 und CYP109E1, katalytische Aktivität gegenüber VD₃-Verbindungen. Dabei synthetisierte CYP109A2 vorwiegend 25(OH)VD₃, wohingegen durch die Aktivität von CYP109E1 zusätzlich 24(OH)VD₃ und 24(S),25(OH)₂VD₃ detektiert wurde. In Kapitel 2.4 wurde demonstriert, dass CYP109E1 neben VD₃ auch das strukturähnliche VD₂ in die hydroxylierten Derivate 25(OH)VD₂ und 24(R),25(OH)₂VD₂ umsetzen kann. Hierbei wies CYP109E1 eine höhere Regioselektivität (ausschließlich zwei Produkte) und eine veränderte Stereoselektivität (von 24(S)- zu 24(R)-Hydroxylierung) auf. Darüber hinaus lässt das Produktmuster mit VD₂ als Substrat eine festgelegte Reihenfolge der Hydroxylierungspositionen vermuten. Die anfänglich steigende Produktion von 25(OH)VD₂, die anschließende Abnahme nach 24 h und eine zeitgleiche Zunahme des 24(R),25(OH)₂VD₂-Produktes, deutet auf die primäre 25-Hydroxylierung mit sekundärer 24(R)-Hydroxylierung hin. Diese Hypothese wurde mittels Docking-Analysen unterstützt, da aufgrund der Konformation des 24(R)(OH)VD₂ eine sekundäre 25-Hydroxylierung energetisch unwahrscheinlich ist. Diese Hydroxylierungsabfolge wurde ebenfalls durch Koszewski *et al.* als bevorzugter physiologischer Syntheseweg von VD₂ beschrieben [173]. Um die Verfügbarkeit von hochwertigen hydroxylierten VD₂-Metaboliten zu erhöhen, stellt das *B. megaterium* Ganzzellsystem einen wichtigen Startpunkt in der selektiven, biotechnologischen Synthese von VD₂-Metaboliten dar. Unter Verwendung der relativ günstigen Ausgangsverbindung VD₂ war es somit möglich, nach 48 h Reaktionszeit eine Produktkonzentration von 12 mg L⁻¹ des Derivates 24(R),25(OH)VD₂ zu detektieren.

Zusammenfassend ermöglichen die in dieser Arbeit vorgestellten Ganzzellsysteme effizientere und umweltfreundlichere Alternativen zu entsprechenden chemischen Synthesen. Die Durchführung erfolgte unter milden Bedingungen und einem reduzierten Einsatz umweltbelastender Substanzen. Die Anwendung der dargestellten Prozesse ermöglichen eine verbesserte Verfügbarkeit von Wirkstoffen der Gluco- und Secosteroidklasse (siehe Tab. 1). Hierbei ist zu beachten, dass zur industriellen Herstellung von Feinchemikalien eine finale Ausbeute von mindestens 1 g L⁻¹ bis zum Zielwert von 20 g L⁻¹ und/oder einer volumetrischen Produktivität von 0,001 bis 2 g L⁻¹ h⁻¹ angestrebt ist [7,174,175]. In Tab. 1 sind die entsprechenden Ganzzellsysteme, sowie deren Produktivität und Umsatzdauer dargestellt. Daraus geht hervor, dass im Rahmen dieser Arbeit die minimalen industriellen Anforderungen durch Optimierung der Glucocorticoidproduktion erfüllt werden konnten (Tab. 1). Zusätzlich konnte ein Startsystem zur biotechnologischen Synthese von VD₂ Derivaten etabliert werden. Für den Einsatz in industriellen Prozessen besteht dennoch weiterhin Optimierungspotenzial zur Steigerung der jeweiligen Produktkonzentrationen, welches im folgenden Kapitel 3.2 genauer ausgeführt wird.

Tabelle 1: Übersicht der bakteriellen Ganzzellsysteme aus dieser Arbeit

Substrat	Produkt	Enzym (Herkunft)	Umsatzdauer [h]	Ausbeute [g L ⁻¹]	Volumetrische Produktivität [g L ⁻¹ h ⁻¹]	Referenz
Medran	Premedrol	CYP21A2 (<i>Bos taurus</i>)	24	0,32	0,0133	[36]
Medran	Premedrol	CYP21A2 (<i>Bos taurus</i>)	24	0,69	0,0288	König <i>et al.</i> , 2019b
Medran	Premedrol	CYP21A2 (<i>Bos taurus</i>)	120	1,51	0,0126	König <i>et al.</i> , 2020
Premedrol	Premedrolacetat	CAT1 (<i>E. coli</i>)	120	1,35	0,0113	König <i>et al.</i> , 2020
Cortison	Cortisonacetat	CAT1 (<i>E. coli</i>)	24	6,12	0,2550	König <i>et al.</i> , 2020
11-Deoxycortisol	Cortison	CYP11B1 (<i>Bos taurus</i>), 11 β HSD1 (<i>C. porcellus</i>)	24	0,14	0,0058	diese Arbeit
Hydrocortison	Cortison	CYP106A1 (<i>B. megaterium</i>)	24	0,014	0,0006	[91]
Hydrocortison	Cortison	11 β HSD1 (<i>C. porcellus</i>)	24	14	0,5830	König <i>et al.</i> , 2019a
Vitamin D ₂	24,25(OH) ₂ VD ₂	CYP109E1 (<i>B. megaterium</i>)	48	0,012	0,0003	Putkaradze <i>et al.</i> , 2020

3.2 Strategien zur Optimierung von Ganzzellsystemen

Biotechnologische Methoden bieten großes Potenzial zur Produktion pharmazeutisch relevanter Wirkstoffe. Durch die richtige Wahl und Modifikation der produzierten Enzyme können mehrstufige chemische Prozesse auf wenige Reaktionsschritte reduziert werden. Der Einsatz von Ganzzellsystemen bildet zum einen eine schützende Umgebung des relevanten Enzyms und der Erhaltung physiologischer Bedingungen. Zum anderen ermöglicht es die Versorgung mit zelleigenen Cofaktoren und deren Regeneration, was den Bedarf der externen Zugabe der teuren Komponenten deutlich verringert oder sogar eliminiert. Ein weiterer entscheidender Aspekt für eine effiziente Katalyse ist eine hohe Produktselektivität. Im Gegensatz zu chemischen Synthesen besteht eine geringere Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Racematen, welche zur Produktion von weniger wirksamen Arzneimitteln führen können. Zusätzlich kommt es durch zahlreiche Modifikationsmöglichkeiten der biologischen Systeme seltener zur Bildung unbekannter und umweltschädlicher Nebenprodukte, was den Bedarf arbeits-, energie- und zeitaufwendige Isolierungsverfahren verringert. Somit ergeben sich durch den Einsatz von Ganzzellsystemen erhebliche ökologische und ökonomische Vorteile gegenüber herkömmlichen chemischen Verfahren. Da hierbei jedoch lebende Systeme zum Einsatz kommen, tragen komplexe biologische Faktoren maßgeblich zur Einschränkung der Effizienz des Systems bei. Diese können jedoch im Rahmen der Prozessoptimierung als Angriffspunkte dienen, um das System den jeweiligen industriellen Bedürfnissen anzupassen. In dieser Arbeit konnten bestehende Limitierungen der biokatalytischen Glucocorticoidsynthese durch die gezielte Optimierung bestimmter Parameter verringert oder beseitigt werden. Folglich erwirkten diese Maßnahmen eine erhebliche Steigerung der jeweiligen Steroidproduktion.

Die Effizienz der rekombinanten Genexpression ist unter anderem durch die Aktivität der eingesetzten **Promotoren** im Ganzzellsystem regulierbar, welche zum Zweck einer optimalen Proteinproduktion an die individuellen Anforderungen der rekombinanten Proteine angepasst werden müssen. Für den

Wirtsorganismus *E. coli* sind zahlreiche regulierbare, sowie konstitutive Promotoren für verschiedene Anwendungsbereiche etabliert, was eine simultane Produktion von mehreren rekombinanten Proteinen mit unterschiedlichen Anforderungen ermöglicht [176]. Neben dem meistgenutzten, induzierbaren T7-Expressionssystem [177] kommen oft weitere zucker-induzierbare Promotoren wie P_{ara} [178] oder P_{rhaB} [179,180] zum Einsatz. Aufgrund der vollständigen Entschlüsselung des *E. coli* Genoms wurden bislang insgesamt nahezu 4000 Promotoren für die rekombinante Proteinexpression identifiziert und teilweise charakterisiert [Quelle: <https://biocyc.org/>]. Hingegen sind nutzbare Promotoren für *B. megaterium* bislang hauptsächlich auf das P_{xyl} System und vereinzelt weitere induzierbare Promotoren wie P_{sac} , P_{T7} , P_{gdhA} beschränkt [181–187]. Die limitierte Anzahl zuckerinduzierbarer Promotoren begrenzt den flexiblen Einsatz des *B. megaterium* Expressionssystems. Daher identifizierten Hartz *et al.* [188] kürzlich weitere induzierbare sowie Wachstumsphasen-abhängige Promotoren durch die Analyse des *B. megaterium* Genexpressionsprofils. Zur C11-Oxidation des Hydrocortisons (Kapitel 2.1) wurde jeweils ein Vertreter der neuidentifizierten, induzierbaren und wachstumsabhängigen Promotoren zur effizienten Expression der LbADH und cp11 β HSD1 eingesetzt und dem P_{xyl} -Promotorsystem gegenübergestellt. Der induzierbare Promotor P_{ara} bewirkte eine Steigerung der Cortisonproduktion um den Faktor 1,3 auf $8 \text{ g L}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$ (Kapitel 2.1, Abb. 11). Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu Hartz *et al.*, wobei eine geringere Produktion durch Einsatz von P_{ara} und folglich geringere Aktivität des Reporterproteins β -Galaktosidase ermittelt wurde. Diese Diskrepanz ist vermutlich auf abweichende Induktorkonzentrationen zurückzuführen. Durch die Anpassung der Arabinosekonzentration von $0,5$ auf 2 mg mL^{-1} konnte eine Erhöhung der Cortisonproduktion um 65% (Kapitel 2.1, Abb. 7) erreicht werden, wohingegen eine Steigerung der Xylosekonzentration keine Veränderung der Produktausbeute aufwies (Daten nicht gezeigt). Trotz der erhöhten Produktivität des Ganzzellsystems ist der industrielle Einsatz von L-Arabinose zur Induktion im Vergleich zu D-Xylose derzeit wirtschaftlich nicht rentabel, da die Nutzung von L-Arabinose in angemessener Konzentration 25-fach erhöhte Kosten im Vergleich zu D-Xylose erzeugen würde (Sigma-Aldrich, Stand Mai 2020). Als Vertreter der wachstumsphaseninduzierten Promotoren wurde P_{0706} eingesetzt, welcher in frühen exponentiellen Phasen des *B. megaterium* Wachstums aktiviert wird [188]. Hierdurch erfolgte eine Steigerung der Cortisonausbeute um den Faktor 2,2 im Vergleich zu P_{xyl} , was in einer Produktkonzentration von $13,5 \text{ g L}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$ resultierte (Kapitel 2.1, Abb. 11). Die P_{0706} -Aktivität widerspricht ebenfalls der von Hartz *et al.* ermittelten Tendenz gegenüber P_{xyl} , welche mittels *lacZ*-Expression und Progesteronausbeute ermittelt wurde. Zum einen besteht hierbei eine starke Abhängigkeit der wachstumsphaseninduzierten Promotoren von individuellen Medienkomponenten und Kultivierungsbedingungen. Zum anderen führen erhöhte Promotorstärken und der Zeitpunkt der Induktion je nach Komplexität und Löslichkeit der Proteine oft zu Fehlfaltungen und Bildung von inaktiven Proteinaggregaten. Das weist darauf hin, dass die neuen Promotoren bezüglich ihrer Anwendbarkeit für jedes System individuell getestet und optimiert werden müssen, um optimale Ergebnisse zu erhalten. Die Anwendung des wachstumsphasenabhängigen Promotors P_{0706} zeigt neben der erhöhten Produktbildung eine mögliche Senkung der Prozesskosten durch eine induktorunabhängige Expression der rekombinanten Proteine. Allerdings ist dieser Promotor störanfällig für minimale Abweichungen der Medienzusammensetzung, was die Kontrolle des Fermentationsprozesses einschränkt. Für weitere Optimierungen des Ganzzellsystems in Kapitel 2.1

zeigt der alternative Promotor P₄₇₅₆ aufgrund des ähnlichen Aktivitätsprofils zu P₀₇₀₆ und der höheren Expressionsstärke großes Potenzial [188]. Eine Modifikation der Promotoren P₀₇₀₆ und P_{ara} gemäß Stammen *et al.* könnte eine zusätzliche Steigerung der Promotoraktivität bewirken [189]. Dieser Effekt konnte in Kapitel 2.3 anhand von Modifikationen der T7-Promotorsequenz demonstriert werden (siehe Tabelle 2; C4), welche in einer 70%igen Steigerung der CAT1-katalysierten Steroidacetylierung resultierte (Kapitel 2.3, Abb. 4). Die Mutation der drei terminalen Basen AGG zu CAA bewirkt vermutlich eine langsamere aber länger anhaltende Proteinproduktion, was in einer höheren Endpunkt-Proteinkonzentration resultiert [190]. Im Falle der CAT1-Expression durch C4 sollte diese Hypothese mittels SDS-PAGE überprüft werden.

Tabelle 2: Sequenzen der genutzten T7-Promotoren und Derivate. Modifikationen der Promotorsequenzen sind fett markiert

Promotorbezeichnung	Sequenz	erwartete Promotorstärke	Referenz
T7	TAATACGACTCACTATAGG	1	[177]
T7*	TAATACGACTCTCTATAGG	0,13	[191]
C4	TAATACGACTCACTAT CAA	1,5	[190]

Demgegenüber wurde eine Mutagenese der Promotorsequenz auch zur Reduktion der Promotoraktivität durchgeführt (Kapitel 2.2). Eine gezielte Punktmutation A(-6)T des P_{T7} wurde zuvor mit verminderter Proteinproduktion um 87% beschrieben, weshalb diese Modifikation zur Modulierung der Cytb₅ Produktion erfolgte (siehe Tabelle 2, T7*) [191]. Diese Maßnahme verfolgte das Ziel, die zellinterne Cytb₅ Produktion zu verringern (Kapitel 2.2, Abb. 2), um die Proteinmaschinerie nicht zu Ungunsten der P450- und CPR-Expression zu belasten. Ob dadurch optimale P450/CPR/Cytb₅ Verhältnisse gemäß Kapitel 2.2, Abb. 3 erreicht wurden, ist bisher jedoch unklar. Daher wäre die Kontrolle der resultierenden Proteinkonzentrationen und einhergehende Abhängigkeit von der Promotorstärke mittels SDS-PAGE sinnvoll. Darüber hinaus könnte der Einsatz eines regulierbaren Promotors wie P_{rhaB} eine Feinjustierung der Cytb₅ Konzentration ermöglichen, um die Einstellung eines optimalen P450/CPR/Cytb₅ Verhältnisses im Ganzzellsystem und die Erhöhung der Premedrolproduktion zu erreichen.

Neben der effizienten Produktion durch geeignete Promotoren ist die **Löslichkeit der rekombinanten Proteine** im Ganzzellsystem von großer Bedeutung. Hydrophobe Bereiche, lokalisiert auf der Oberfläche eukaryotischer Proteine, dienen in ihrer natürlichen Umgebung zur Ausbildung von Lipid/Protein- [192] oder Protein/Protein-Interaktionen [193]. Bei heterologer Produktion dieser Proteine in prokaryotischen Expressionssystemen kommt es aufgrund fehlender Membranmatrix dagegen zu unerwünschten Wechselwirkungen und einer damit einhergehenden Bildung von inaktiven Aggregaten [194]. Folglich ermöglichte die Entfernung des hydrophoben, N-terminalen Membranankers der 11 β HSD1 (Kapitel 2.1) eine erfolgreiche Biokatalyse von Cortison im rekombinanten *B. megaterium* Ganzzellsystem (Kapitel 2.1, Abb. 4). Im Gegensatz dazu war das Volllängenprotein nicht in der Lage, Hydrocortison umzusetzen (Daten nicht gezeigt). Eine Steigerung der Löslichkeit durch die Entfernung des Membranankers wurde bereits durch Walker *et al.*, demonstriert, wobei die katalytische Aktivität des humanen Enzyms unverändert blieb [141]. Elleby *et al.* hingegen zeigten, dass diese Modifikation im *C. porcellus* 11 β HSD1 die Bildung von unlöslichen Aggregaten im *E. coli*-Expressionssystem nicht

gänzlich verhinderte [195]. Auf dieser Grundlage erfolgten in dieser Arbeit weitere Modifikationen der hydrophoben Proteinoberfläche durch eine Punktmutation im C-terminalen Bereich (F277R) und die Entfernung von vier C-terminalen Aminosäuren. Die dadurch herabgesetzte Hydrophobizität der Proteinoberfläche führt mutmaßlich zu einer verringerten Bildung von Aggregaten durch intermolekulare Interaktionen, was die Umsatzrate von Hydrocortison um den Faktor 2,4 steigerte (Kapitel 2.1, Abb. 4) [144,196]. Für eine zusätzliche Erhöhung der Löslichkeit könnten R277 oder weitere C-terminale hydrophobe und positiv geladene Reste durch negativ geladene Reste substituiert werden. Aufgrund stärkerer Wasserbindungseigenschaften kann dadurch eine erhöhte Löslichkeit des Proteins erwartet werden [197,198]. Lawson *et al.* zeigten durch die Mutante F277E im *C. porcellus* Protein neben einer erhöhten Löslichkeit eine ladungsbedingte Abstoßung der Monomere und somit eine stabilere Monodispersität des tetrameren Proteins durch Expression im *E. coli* Ganzzellsystem. Die Kristallisation und 3D-Analyse des modifizierten Proteins zeigte, dass die Mutation F278E in einer Konformationsänderung resultiert, während jeweils ein Monomer im Dimerkomplex eine veränderte Ausrichtung des Y123 aufwies, was vermutlich die Wahrscheinlichkeit für die erfolgreiche Bindung des glucocorticoiden Substrats erhöht [139,143]. Analog dazu wäre durch die Modifikation F277R in Kapitel 2.1 ebenfalls eine Konformationsänderung denkbar, welche durch *in silico* Analysen oder Kristallisation und Röntgenstrukturanalysen detektiert werden könnte.

Eine Steigerung der Proteinlöslichkeit zeigte in Kapitel 2.2 ebenfalls große Auswirkungen auf die Umsatzeffizienz, welches hierbei die Medranhydroxylierung durch das bovine, mikrosomale CYP21A2 betrifft. Die Elektronenübertragung erfolgt im natürlichen System durch das membrangebundene Redoxprotein NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (bCPR) [199], welches bereits im entsprechenden Ganzzellsystem angewendet wurde [36]. Zur Erhöhung der Löslichkeit, wurde der N-terminale Membrananker (bestehend aus 27 N-terminalen Aminosäuren) entfernt, was in einer gesteigerten Premedrolausbeute um den Faktor 2,2, im Vergleich zur Vollängen bCPR resultierte [36]. Eine erhöhte Löslichkeit von Redoxproteinen im rekombinanten bakteriellen System ist vorteilhaft, da es die Wahrscheinlichkeit produktiver Kollisionen zwischen den jeweiligen löslichen Proteinen erhöht, sofern die ursprüngliche Aktivität erhalten bleibt [200]. Auch im Vergleich zu Umsätzen unter Verwendung des *S. pombe* Redoxsystems arh1/etp^{fd} zeigte der Einsatz der verkürzten bCPR einen gesteigerten Umsatz um 19% (Kapitel 2.2, Abb. 1). Da es sich bei der bCPR um ein natürliches Fusionsprotein handelt, enthält es bereits die notwendigen, prosthetischen Gruppen zur **Elektronenübertragung** von NADPH auf das P450. Aus diesem Grund müssen, verglichen mit 3-Komponenten Systemen wie etwa P450-arh1-etp^{fd}, kürzere Distanzen für den Transfer überbrückt werden, was eine effizientere Übertragung der zwei notwendigen Elektronen ermöglichen kann (siehe Katalytischer Zyklus, Kapitel 1.3.1.1, Abb. 4) [201,202]. Beim Elektronen-Transfer über das P450-arh1-etp^{fd}-System wird die Anwesenheit der drei Proteine im entsprechenden Verhältnis vorausgesetzt, was sich im P450-CPR-System auf zwei Proteine beschränkt. Um ein optimales Proteinverhältnis von 1:4 (P450:CPR) dieses Systems zu gewährleisten (siehe Kapitel 2.2, Abb. S1), wäre eine Fusion des P450 mit der CPR zur Weiterentwicklung und Optimierung des Systems denkbar. Durch die verringerten Distanzen der einzelnen Domänen zur Elektronenübertragung wäre die Interaktionsrate der Redoxpartner mit P450 stark erhöht [200,203]. Eine Fusion der Proteine würde außerdem eine vorzeitige Dissoziation der CPR verhindern, was ebenso zu einer effizienteren

Elektronenübertragung beitragen könnte [204]. Als weiterer unterstützender Faktor zur Elektronenübertragung zeigte die Coexistenz von *Cytb₅* *in vitro* und *in vivo* einen positiven Effekt auf die Medranumsetzung. Diese bewirkte in Ganzzellumsätzen eine 1,4-fach erhöhte Premedrolausbeute im Fed-Batch Verfahren. Durch die Anwendung unterschiedlicher *Cytb₅* Konzentrationen wurde beobachtet (Kapitel 2.2, Abb. 3), dass bereits geringe Mengen des Proteins ausreichend sind, um die Umsatzgeschwindigkeit signifikant zu erhöhen. Protein-Verhältnisse die 1:4:4 P450/P450red/*Cytb₅* überstiegen, induzierten jedoch einen Rückgang der Umsatzgeschwindigkeit. Ähnliches konnte bereits bei *in vitro* Umsätzen mit Progesteron durch Wang und Pallan beobachtet werden, wobei *Cytb₅* im Überschuss (P450/P450red/*Cytb₅* 1:300:300) einen inhibierenden Effekt auf die CYP21A2 Aktivität zeigte [205]. Dies ist vermutlich auf kompetitive Bindung von CPR und *Cytb₅* aufgrund überlappender Bindestellen des P450 zurückzuführen, was in einer blockierten Elektronenübertragung des ersten Elektrons resultiert [206–208]. Dahingegen kann die positive Wirkung geeigneter Konzentrationen von *Cytb₅* auf die P450 vermittelte C21-Hydroxylierung auf unterschiedliche Gründe zurückgeführt werden. Da bereits verschiedene Effekte des *Cytb₅* auf P450 katalysierte Reaktionen beobachtet wurden, abhängig von CYP Isoform [209], Substrat [209], Proteinverhältnissen [80,209,210], pH [211] und Ionenstärke [212], sind die folgenden Theorien in Bezug auf die CYP21A2-katalysierte Reaktion möglich: (i) Die geschwindigkeitsbestimmende Übertragung des zweiten Elektrons kann durch *Cytb₅* erfolgen oder beschleunigt werden [211,213–216] was die Wahrscheinlichkeit einer Entkopplung des ersten Elektrons und folgender Freisetzung von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) verringert [79,217–219]. Somit kann einer herabgesetzten Stabilität und irreversiblen Schädigung des P450 entgegengewirkt werden. (ii) Zum anderen kann der CPR-P450 Komplex durch eine Ladungsverschiebung von P450 auf *Cytb₅* stabilisiert werden. Hierbei dient *Cytb₅* als Akzeptor des ersten Elektrons, welches zuvor auf das P450 übertragen wurde. Folglich verhindert dies die unmittelbare Dissoziation der CPR nach der Übertragung des ersten Elektrons [77,212]. Das Fe(II)-P450 Zentrum ist somit bereit, unmittelbar das zweite Elektron aufzunehmen und erst anschließend die Interaktion mit CPR zu beenden [219]. (iii) *Cytb₅* wirkt allosterisch auf das P450. Es wird vermutet, dass die Bindung des *Cytb₅* eine Konformationsänderung in P450 induziert, was dessen Redoxänderung begünstigt [217,220–222]. Um dessen Rolle in der CYP21A2-vermittelten Medranhydroxylierung zu ermitteln, wäre die Überprüfung der Kopplungseffizienz aufschlussreich, welche durch die Relation zwischen NADPH-Verbrauch und Produktbildung ermittelt wird. Gegebenenfalls wäre auch die Bestimmung der ROS-Bildung durch rekombinante Reportersysteme möglich [223]. Desweiteren wäre die Bestimmung der Produktbildungsgeschwindigkeit unter Anwesenheit des Apo-*Cytb₅* hilfreich, um dessen redox-unabhängigen Einfluss zu ermitteln. Ist der Effekt von *Cytb₅* auf CYP21A2 ausschließlich auf eine stabilisierende Wirkung über Elektronenverschiebung zurückzuführen, wäre die Fusion zu einem 3-Proteinkomplex durch die Integration eines flexiblen Linkers eine Möglichkeit, um die Interaktion der Proteine zu erhöhen.

Neben der optimalen Funktionalität der Redoxproteine ist die **Verfügbarkeit der erforderlichen Cofaktoren** essentiell, um die Effizienz des biotechnologischen Prozesses zu maximieren. Aus diesem Grund erfolgt in Biokatalysen im Labormaßstab häufig die externe Zugabe von Cofaktoren, was jedoch für industrielle Zwecke aus ökonomischer Sicht nicht geeignet ist. Der Einsatz zellinterner Cofaktor-Regenerationssysteme erfordert hingegen keine weitere Zugabe der teuren Verbindungen. Durch die

Aktivierung des *LbADH* basierten Regenerationssystems in Kapitel 2.1 konnte die Verfügbarkeit von NADP⁺ (Kapitel 2.1, Abb. S2) und die resultierende Produktausbeute auf mehr als das Doppelte gesteigert werden (Kapitel 2.1 Abb. 11). Mittels NADP⁺-Quantifizierung konnte eine Anreicherung des Cofaktors nach 24 h durch Zugabe von Aceton beobachtet werden, was auf eine hoch effiziente Regeneration durch *LbADH* hinweist (Kapitel 2.1, Abb. S2). Bei zusätzlicher Hydrocortison-Zugabe hingegen, war ein NADP⁺ Spiegel unter Kontrollniveau zu verzeichnen, was auf einen hohen NADP⁺-Verbrauch durch 11 β HSD1 hinweist, welcher die NADP⁺-Bildung durch *LbADH* übersteigt. Der Grund für den langsamen Anstieg der NADP⁺-Konzentration könnten weitere NADP⁺-konsumierende Stoffwechselwege und die geringere Effizienz der *LbADH*-Reaktion sein. Erstere dienen in Mikroorganismen zur Erhaltung des Redoxgrundzustands in Form eines geringen NADP⁺/NADPH Verhältnisses, welches in *Bacillus subtilis* 0,54 beträgt, wohingegen ein entgegengesetztes Verhältnis der alternativen Redoxäquivalente NAD⁺/NADH von 2,5 zu verzeichnen ist [224]. Die Modifikation der beteiligten Proteine zur Veränderung der Cofaktorspezifität könnte demzufolge in höheren Produkt-Ausbeuten resultieren. Dies könnte durch eine Sättigungsmutagenese von R66 in 11 β HSD1 realisiert werden, da diesem Aminosäurerest NADP(H)-Spezifität zugeschrieben wird [139]. Simultan könnte eine Mutagenese der *LbADH* zur Erhöhung der NAD(H)-Spezifität durchgeführt werden. Hierbei zeigte die Mutante R38P 4-fach erhöhte Aktivität gegenüber NAD(H) im Vergleich zum Wildtyp [225]. Alternativ kann auch ein kompletter Austausch der *LbADH* durch bispezifische ADH-Sequenzen erfolgen, wie beispielsweise die Variante RADH-G37D [226] aus *L. brevis* oder *LsADH* [227] aus *L. sanfancisensis*. Diese Strategie bietet drei entscheidende Vorteile: (i) Der zeitgleiche NADP⁺ und NADPH Verbrauch während der Ketonreduktion könnte zusätzlich die gewünschte FabG-Inhibierung aufrechterhalten (Kapitel 2.1, Abb. 12). (ii) Die ADH-vermittelte NAD⁺-Regeneration würde durch wirtseigene NADH-abhängige Stoffwechselreaktionen unterstützt werden. (iii) Eine veränderte Cofaktor-Spezifität kann zu einer verbesserten Verfügbarkeit der Cofaktoren im *B. megaterium* Ganzzellsystem führen, aufgrund der doppelten Größe des NAD⁺/NADH-Pools im Vergleich zu dem für NADP⁺/NADPH [228].

Analog dazu könnte die Cofaktor-Spezifität ebenfalls im Redoxprotein bCPR₋₂₇ in Kapitel 2.2 zu NADH verändert werden, um die Cofaktorverfügbarkeit und Hydroxylierungseffizienz im *E. coli* Ganzzellsystem zu steigern. Dies könnte durch Generierung der Mutante W676A realisiert werden, da diese Position als selektivitätsbestimmend im humanen Protein identifiziert und zuvor bereits zur Entwicklung eines NADH-abhängigen P450-Redoxsystems genutzt werden konnte [229].

In Kapitel 2.3 wurden Strategien zur erhöhten Verfügbarkeit des Cofaktors AcetylCoA zur Steroidacetylierung mittels CAT1 untersucht. Das Ziel war eine intrinsische Aktivierung der Glykolyse und folglich eine Erhöhung des AcetylCoA Spiegels. Dies sollte durch eine Erhöhung der Glucosekonzentration im Umsatzmedium induziert werden, was jedoch zu verringerten Produktausbeuten führte (Kapitel 2.3, Abb. S5). Vermutlich ist dies auf osmotischen Stress zurückzuführen, welcher in einer Inhibierung des Hexosetransports resultiert [230]. Alternativ wurde ein zusätzliches Vektorsystem zur Modifikation des Acetatstoffwechsels generiert. Die Überproduktion der AcetylCoA-Synthetase (ACS) erfolgte unter Kontrolle eines Rhamnose-induzierbaren Promotors, welcher eine gesteigerte AcetylCoA-Regeneration supplementierter Acetatverbindungen katalysiert. Mittels SDS-PAGE konnte die Expression der ACS (Kapitel 2.3, Abb. 5B), sowie dessen Funktionalität

anhand steigender Tendenz zur Cortisonacetatbildung unter NaOAc Zugabe (Abb. 8) bestätigt werden. Allerdings führte die Coexpression der ACS schon auf geringstem Level zu einem leichten Einbruch der CAT1-Produktion mit proportional steigender Tendenz, welche sich entsprechend nachteilig auf die Cortisonacetatbildung auswirkte (Kapitel 2.3, Abb. 5B, C). Eine Konzentrationserhöhung der externen Acetatquelle, NaOAc, mündete tendenziell in steigenden Cortisonacetatkonzentrationen, erreichten jedoch lediglich Werte unterhalb des Ausgangslevels der Kontrollreaktion ohne vorhergehende ACS-Coexpression (Abb. 8).

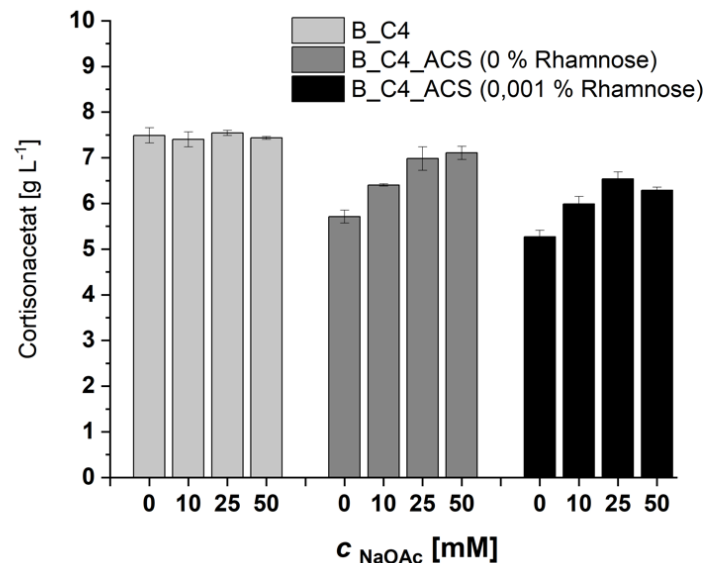


Abbildung 8: Produktion von Cortisonacetat im *E. coli* Ganzzellsystem in Abhängigkeit von der Rhamnose- und NaOAc-Zugabe. Als Kontrollreaktion diente der Stamm B_C4 ohne ACS-Expression (hellgraue Balken). Die ACS-Expression in Stamm B_C4_ACS (enthält Plasmide zur CAT1 und ACS Coexpression) wurde ohne Zugabe (dunkelgraue Balken, Basalexpression) und durch die Zugabe von 0,001% (m/v) Rhamnose (schwarze Balken) gestartet. Die Ganzzellumsätze von 20 mM Cortison erfolgte unter Zugabe von unterschiedlichen NaOAc Konzentrationen. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten von drei Umsatzreaktionen. Entsprechende Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Abk.: NaOAc: Natriumacetat, ACS: AcetylCoA-Synthetase.

Um dieses Problem zu umgehen, könnte eine verzögerte Induktion der ACS-Expression erfolgen, sofern die CAT1-Synthese vollständig abgeschlossen ist. Aufgrund geringer Basaltranskriptionslevel (Kapitel 2.3, Abb. 5B) empfiehlt sich die Substitution des Rhamnose-induzierbaren Promotors durch einen wachstumsabhängigen Promoter, welcher ausschließlich in der späten exponentiellen Phase oder stationären Phase aktiviert wird. Diese Möglichkeit könnte eine verzögerte und induktorfrem Aktivierung der ACS-Genexpression ermöglichen und letztendlich zu einer Erhöhung der Protein- und Produktbildung führen.

Neben der Produktion von Zielproteinen, findet während der Inkubation im Expressionsmedium die Generierung wirtseigener Proteine im Ganzzellsystem statt, welche gegebenenfalls Aktivität gegenüber den umzusetzenden Substanzen aufweisen. Solch eine Aktivität ist in Kapitel 2.1 zu beobachten, demonstriert durch die **Bildung eines Nebenprodukts** (P) (Kapitel 2.1, Abb. 3), wobei es sich um das hydroxylierte Cortisonabbauprodukt 20 β -Dihydrocortison handelt. Dieses wird durch die Hydroxysteroid Dehydrogenase FabG (FabG, 20 β HSD, 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase

codiert durch *fabg*) synthetisiert, welche bereits durch Putkaradze *et al.* und Gerber *et al.* identifiziert und charakterisiert wurde [92,113]. FabG katalysiert eine NADPH-abhängige Reaktion als Teil der Fettsäuresynthese [231,232] und kann aufgrund seiner essentiellen Funktion in *B. megaterium* nicht deletiert werden [113,233]. Modifikationen der Umsatzbedingungen führten jedoch zu einer Inhibierung der Nebenproduktbildung: eine Erhöhung der Temperatur auf 37°C im *B. megaterium* Ganzzellsystem zeigte eine signifikante Inhibierung der Nebenproduktbildung nach 120 min (Kapitel 2.1 Abb. 3A), wohingegen nach einer weiteren Steigerung auf 42°C bereits nach 60 min ein deutlicher Einbruch der Nebenproduktbildung zu beobachten ist (Abb. 9A, B). Durch Gegenüberstellung der Proteinsequenzen des FabG aus *E. coli* und *B. megaterium* zeigt sich, dass sich in der *B. megaterium* Sequenz an Position 233 ein Glutaminrest (Q) befindet, wohingegen *E. coli* Glutaminsäure (E) aufweist. Wie durch Lai and Cronan beschrieben, resultiert eine Substitution zu Lysin in *E. coli* (E233K) in einer erhöhten Temperatursensibilität gegenüber dem Wildtypenzym [234]. Eine Modifikation der Enzymsequenz (insb. Doppelmutation E233K/A154T) könnte zur Erhöhung der Temperatursensibilität beitragen, um die Nebenproduktbildung schon bei geringeren Temperaturen, wie 37°C zu inhibieren und die Produktselektivität weiterer *B. megaterium* Ganzzellsysteme zu steigern [234]. Eine weitere Möglichkeit stellt der Austausch der FabG Sequenz in *B. megaterium* durch die *E. coli* FabG-Sequenz dar, was der Erhaltung der essentiellen Funktion des Proteins dienen könnte, ohne jedoch eine derartige Aktivität gegenüber Steroiden aufzuweisen (Daten nicht gezeigt). Desweiteren zeigte die Zugabe des Lösemittels Aceton eine Inhibierung der Nebenproduktsynthese (Kapitel 2.1, Abb. 3B). Die Zugabe des Lösemittels aktiviert die NADP⁺-Regeneration mittels rekombinanter *LbADH*, welches Aceton als Substrat zur Reduktion zu Propanol unter NADPH Verbrauch nutzt. Folglich verhindert die Senkung des cytosolischen NADPH-Spiegels die NADPH-abhängige Katalyse durch FabG zur Bildung des unerwünschten Nebenproduktes (siehe Kapitel 2.1, Abb. 12). Hierbei zeigte bereits eine einmalige Acetonzugabe (vor oder zum Startzeitpunkt der Synthese) eine nahezu vollständige Inhibierung der Nebenproduktbildung, welche unabhängig vom Zeitpunkt der Acetonzugabe (vor, bei Start der Reaktion oder beides; Abb. 9C) erfolgte. Im Vergleich dazu erzielte eine zweifache Zugabe des Lösemittels einen negativen Effekt auf die 11 β HSD1-Aktivität, was vermutlich auf der Empfindlichkeit des Proteins gegenüber dem organischen Lösemittel beruht. Dieses weist die Eigenschaft auf, Proteine bei steigenden Konzentrationen zu denaturieren [235].

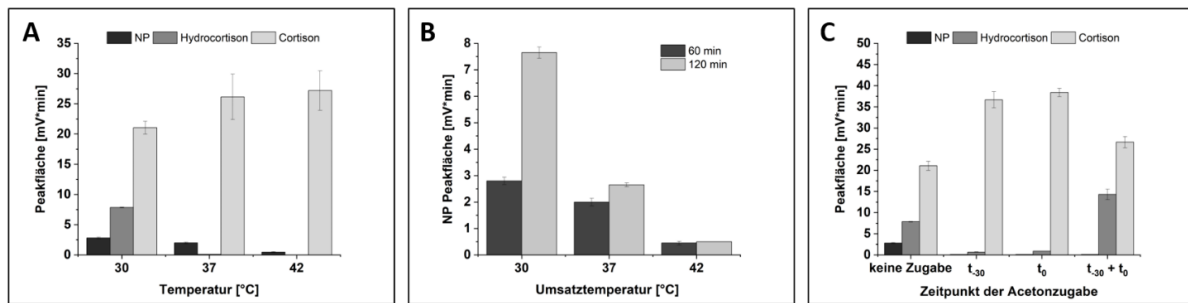


Abbildung 9: 11 β HSD-Aktivität und Nebenproduktbildung in Abhängigkeit von unterschiedlichen Reaktionsparametern. Umgesetzt wurden 100 μ M Hydrocortison (dunkelgraue Balken) zu hydrophilem Nebenprodukt (NP; schwarze Balken) und Cortison (hellgraue Balken). Der Gehalt der Substanzen wurde mittels RP-HPLC analysiert und die in Größe der jeweiligen Peakfläche in $mV \cdot \text{min}$ dargestellt. Die Balken entsprechen Mittelwerten aus drei Umsatzreaktionen. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. **A:** Substrat- und Produktgehalt in Abhängigkeit von einer steigenden Reaktionstemperatur nach 60 min. **B:** Nebenproduktbildung in Abhängigkeit von der Umsatztemperatur und Reaktionsdauer nach 30 min Reaktionsdauer. **C:** Substrat- und Produktgehalt in Abhängigkeit von der Acetonzugabe. Die Zugabe erfolgte 30 min vor (t_{-30}), während (t_0) oder zu beiden Zeitpunkten ($t_{-30} + t_0$). Der Hydrocortisonumsatz ohne Zugabe von Aceton dient als Kontrollreaktion (keine Zugabe).

Beide genannten Strategien inhibierten FabG, was zur signifikanten Optimierung der ökonomisch und ökologisch nachhaltigen Synthese von Cortison oder weiterer Biokatalysen im *B. megaterium* Ganzzellsystem beiträgt. Neben der Rolle als Substrat erfolgt der Einsatz organischer Lösemittel in biotechnologischen Verfahren vorwiegend, um die **Löslichkeit hydrophober Substanzen** zu erhöhen. Dazu zählen hydrophobe Substanzen wie Steroide, deren Löslichkeit in wässrigen Medien durch Lösungsmittel signifikant erhöht werden kann und deren Zugänglichkeit zu Zielproteinen ermöglicht. Hierzu zeigte das organische Lösemittel DMSO den größten Effekt (Kapitel 2.1, 2.2, 2.3). Insbesondere in Kapitel 2.1 war es damit möglich, hochkonzentrierte Hydrocortison-Stammlösungen herzustellen und durch Einsatz von 25% (v/v) DMSO im Umsatzmedium eine 5-fache Cortisonproduktion im Vergleich zu Ethanol (5 % v/v) zu erzielen (Kapitel 2.1 Abb. 5). Neben der verbesserten Löslichkeit des hydrophoben Substrates erhöht DMSO auch die **Permeabilität von hydrophoben Zellmembranen**, da die Anordnung der Lipide in der Doppelschicht durch die Interaktion mit hydrophoben Acylketten der Phospholipide maßgeblich verändert oder gar zerstört werden kann [236,237]. Die erleichterte Diffusion der kleinen DMSO-Moleküle über die geschwächte Lipidbarriere in das bakterielle Cytosol ermöglicht die Interaktion mit weiteren Zellbestandteilen [238], was insbesondere in Kapitel 2.1 von großer Bedeutung ist. *B. megaterium* bildet bei Nährstoffknappheit vermehrt PHB (Poly(3-Hydroxybuttersäure))-Körper im Cytosol, welche von einer Phospholipid-Einzelschicht umgeben sind und als Energiespeicher fungieren [239–241]. Zusätzlich erfolgt neben der Anreicherung von PHB im Inneren der Einschlusskörper eine Aufnahme überschüssiger hydrophober Substanzen. Dies wurde unter anderem für Cholesterol beobachtet [25], was ebenfalls auf einen Einschluss des strukturell ähnlichen Derivates Hydrocortison schließen lässt. Vermutlich setzt DMSO in erhöhten cytosolischen Konzentrationen die Stabilität und Permeabilität der Phospholipid-Einzelschicht herab, was in einer Freisetzung von Hydrocortison ins Cytosol resultiert und folglich eine gesteigerte Interaktion mit den löslichen 11 β HSD1 Proteinen induziert. Um diese Theorie zu bestätigen, könnten fluoreszenzmikroskopische Analysen mit Nilrot zur Visualisierung der PHB-Körper unter Anwesenheit von DMSO durchgeführt werden [25,242]. Alternativ dazu könnte der modifizierte Stamm GHH3 als Zellumgebung dienen [25]. Dieser Stamm ist nicht fähig zur Expression des Gens für die PHB-

Polymerase Untereinheit *phaC* was folglich in einer fehlenden Ausbildung der PHB-Körper resultiert. Möglicherweise könnte dies zu einer Reduktion der benötigten DMSO-Konzentration führen, da hierbei kein Einschluss der Steroidverbindungen in den PHB-Körpern erfolgen kann.

Die sukzessive Erhöhung der DMSO Konzentration auf insg. 4,8% ist möglicherweise ebenfalls in den vorgestellten *E. coli*-basierten Ganzzellsystemen (Kapitel 2.2 und 2.3) ein wichtiger Faktor zur Prozessoptimierung, aufgrund der verbesserten Aufnahme der hydrophoben Verbindungen durch Zellmembranpermeabilisierung [237,243]. Darüber hinaus zeigt DMSO antioxidative Eigenschaften gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was eine irreversible Schädigung der prosthetischen Hämgruppe und eine einhergehende Herabsetzung der P450-Enzymaktivität verhindern kann [244–246].

Zur gezielten Permeabilisierung in Kapitel 2.2 und 2.3 diente Polymyxin B, ein Polypeptid-Antibiotikum, welches als Folge einer Einlagerung in die Zellmembran gramnegativer Bakterien und Bildung von LPS-Polymyxin B-Komplexen die Anordnung der Phospholipide stört [247]. In Kapitel 2.3, wurde die Phospholipid-Konzentration als Folge der Zelldichteanpassung in der Mischkultur erhöht. Eine nachfolgende Steigerung der Polymyxin B-Konzentration ermöglichte eine Produktionssteigerung von Predmedrol um weitere 33% (Kapitel 2.3, Abb. 8B). Aufgrund ökonomischer Aspekte ist Polymyxin B allerdings nicht für einen Einsatz in industriellen Verfahren geeignet. Dennoch unterstreicht diese Beobachtung die Wichtigkeit der Plasmamembranpermeabilität für einen ausreichenden Substrat-/Produktaustausch. Für den Zweck der Membranpermeabilisierung im Rahmen einer industriellen Prozessoptimierung wäre die Untersuchung höherer DMSO-Konzentrationen oder die Verwendung alternativer Lösemittel und Detergenzien wie TritonX-100, Aceton, Toluol, EDTA, Tween 80 oder Cyclodextrine möglich [248,249].

Ist der Substratzugang über die bakterielle Membran gewährleistet, kann die **Konformation des Substrateintrittskanals** eine weitere Hürde zum aktiven Zentrum des katalysierenden Proteins darstellen. Abhängig von Größe, Hydrophobizität oder Ladung der Aminosäurereste in diesem Bereich kann der Substrateintritt oder die Produktfreisetzung im Protein beeinflusst werden. Durch Zhao *et al.* wurden unterschiedliche Reste im bCYP21A2 Eintrittskanal beschrieben, die nahen Kontakt zu 17OHP (17-Hydroxyprogesteron) innerhalb der Distanz von 4 Å aufweisen [250]. Bei genauer Analyse des Proteinmodells repräsentierte der voluminöse, hydrophobe Aminosäurerest M210 eine potenzielle Barriere zum Substrateintritt. Im Vergleich zu den natürlichen Substraten Progesteron oder 17OHP, enthalten Medran und Predmedrol eine zusätzliche hydrophobe Methylgruppe, welche eine stärkere Wechselwirkung zum hydrophoben Methionin ausbilden kann. Nach dem Austausch durch kleinere Reste zeigte ausschließlich Valin eine erhöhte Predmedrolbildung von 30% nach 24 h (Kapitel 2.2, Abb. 5). Durch *in silico* Analyse des Proteins und Erstellung eines modifizierten Modells konnte zwar eine sterische Hinderung des Substrateintritts durch Methionin mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, allerdings könnten resultierende Konformationsänderungen einen indirekten Einfluss auf den Substrat-/Produktaustausch haben. Um dies zu untersuchen, könnte eine Strukturaufklärung durch Proteinkristallisation mit anschließender Röntgenstrukturanalyse erfolgen. Darüber hinaus kann die Modifikation Grund für eine erhöhte Stabilität oder Expression des Proteins sein. Zur genauen Analyse der Expressionslevel wäre die Bestimmung der Proteinkonzentration im

Vergleich zum WT über SDS-PAGE oder Antikörper-Nachweis möglich. Darüber hinaus könnten spektroskopische Methoden, wie etwa Zirkulardichroismus Spektroskopie Aufschluss über mögliche Konformationsänderungen, sowie die Proteinestabilität geben. Die Mutagenese M210V, sowie eine Coexpression von Cytb₅, resultierten als einzelne Maßnahmen im Fed-Batch-Verfahren in einer Steigerung um jeweils 22 bzw. 41% der Produktivität. Die Kombination beider Strategien wiesen mit 46% allerdings nahezu keine zusätzliche Produkterhöhung auf. Daher wurde vermutet, dass weitere Faktoren wie **Produkt- oder Substratinhibition** zur Limitierung der CYP21A2-Produktivität beitragen. Diese Theorie konnte durch Zugabe steigender Premedrolkonzentrationen bestätigt werden. Die Zugabe von mehr als 2 mM bewirkte eine ausgeprägte Produktinhibition der CYP21A2-katalysierten Reaktion (Siehe Kapitel 3, Supplementary Data Abb. S1). Dieser Effekt ist vermutlich auf eine kompetitive Bindung des Premedrols an CYP21A2 zurückzuführen [251]. Zusätzlich führt die Bildung des löslicheren Premedrols zu einer Anreicherung im Medium und daher einer verringerten Löslichkeit von Medran, was dessen Zugänglichkeit zu CYP21A2 herabsetzt. Aus diesem Grund wurde in Kapitel 2.3 eine simultane Acetylierung des Produktes Premedrol durchgeführt, welche durch die Cokultivierung von CAT1-produzierenden Zellen ermöglicht wurde. Diese Strategie resultierte in einer Verdoppelung der Produktbildung der entsprechenden Monokultur (Kapitel 2.3, Abb. 8 A, B). Für eine weitere Steigerung der Reaktionseffizienz und Anwendung in industriellen Prozessen wäre die Anwendung eines ISPR Verfahrens zur Entfernung des modifizierten Produktes denkbar. Die Trennung könnte durch einfache Filtration oder Sedimentation erfolgen, da die Löslichkeit des acetylierten Produktes durch dessen erhöhte Hydrophobizität im wässrigen Medium herabgesetzt ist. Diese könnte durch Senkung der Temperatur zusätzlich verringert werden. Ferner ist die Abtrennung des Steroidacetats durch Adsorption an hydrophobe Materialien [164] oder Extraktion durch eine zweite hydrophobe Phase möglich [165], was eine Durchführung weiterer Umsatzzyklen ermöglichen könnte. Eine anschließende Hydrolyse der acetylierten Verbindung kann ebenfalls durch Fermentation mit verschiedenen Mikroorganismen wie *Nocardioides simplex* [252] oder *B. megaterium* (Daten nicht gezeigt) erfolgen.

Die CAT-katalysierte Reaktion zeigte, ähnlich zu der CYP21A2-vermittelten Reaktion, eine Premedrol-vermittelte Inhibition für Konzentrationen über 2 mM (Abb. 10A). Dies ist ein möglicher Grund für die Abhängigkeit der Medranumsetzung von den Zelldichtenverhältnissen in Kapitel 2.3. Vermutlich führt eine zu schnelle Anhäufung des Premedrols durch CYP21A2 im Medium zu einer kompetitiven Hemmung des CAT1. Die Anwesenheit ausreichend hoher Konzentrationen des Substrates kann die Bildung eines inaktiven Enzym-Substrat-Komplexes induzieren, indem mehrere Substratmoleküle schwach an verschiedenen funktionellen Gruppen des aktiven Zentrums assoziiert sind. Dahingegen weist ein aktiver Komplex lediglich ein Substratmolekül auf, welches gebunden an mehrere funktionellen Gruppen des aktiven Zentrums vorliegt [253,254]. Im Gegensatz dazu konnte eine Cortison-vermittelte Substratinhibition der CAT1-katalysierten Reaktion erst bei erhöhten Konzentrationen (> 10 mM) beobachtet werden (Abb. 10B). Premedrol weist im Gegensatz zu Cortison eine hydrophilere Hydroxylgruppe in Position C11 und eine zusätzliche Methylgruppe in Position C6 auf. Daher ist die Wahrscheinlichkeit einer hydrophilen und/oder hydrophoben Interaktion der funktionellen Gruppen mit denen des aktiven Zentrums von CAT1 erhöht. Dies kann zum einen die Affinität zum aktiven Zentrum beeinflussen, was die Bildung von inaktiven Komplexen bei steigenden

Premedrolkonzentrationen begünstigen kann. Darüber hinaus kann dieser Faktor ebenfalls in einer gesteigerten Bindungsaffinität des acetylierten Produktes und somit in einem gehinderten Substrat-Produkt-Austausch im aktiven Zentrum des Enzyms resultieren. Da der inhibierende Effekt beider dargestellter *E. coli* Ganzzellsysteme in Kapitel 2.2 (dargestellt in Kapitel 2.3 Fig. S1) und 2.3 (Abb. 10A) ab Substratkonzentrationen von 2 mM Premedrol zu beobachten war, wäre auch eine toxische Wirkung des Premedrols auf den *E. coli* Metabolismus denkbar. Um die Akkumulation hoher Premedrolkonzentrationen im Medium zu vermeiden, wäre daher eine kontinuierliche Titration von Medran und umgehende Modifikation von Premedrol in der Mischkultur, wie in Kapitel 2.3 dargestellt, vorteilhaft zum Erhalt der CYP21A2- und CAT1-Proteinaktivität. Desweiteren zeigte die CYP21A2-katalysierte Reaktion in Kapitel 2.2 zusätzlich eine Inhibierung der Proteinaktivität durch Anwesenheit hoher Konzentrationen des Substrats Medran (4,8 mM), welche durch eine sukzessive Substratzugabe reduziert werden konnte (bis zu 66%) (Kapitel 2.2, Abb. 6). Eine mögliche Hypothese zur Erklärung dieses Phänomens beschreibt zwei benachbarte oder entfernte Bindestellen in P450, wobei es sich um eine produktive und eine nicht-produktive Bindestelle mit absteigender Bindungsaffinität zum Substrat handelt. Bei hohen Substratkonzentrationen erfolgt eine Besetzung der nicht-produktiven Seite, was zu sterischen, elektrischen oder allosterischen Wechselwirkungen führt und folglich die Aktivität des Enzyms herabsetzt [255].

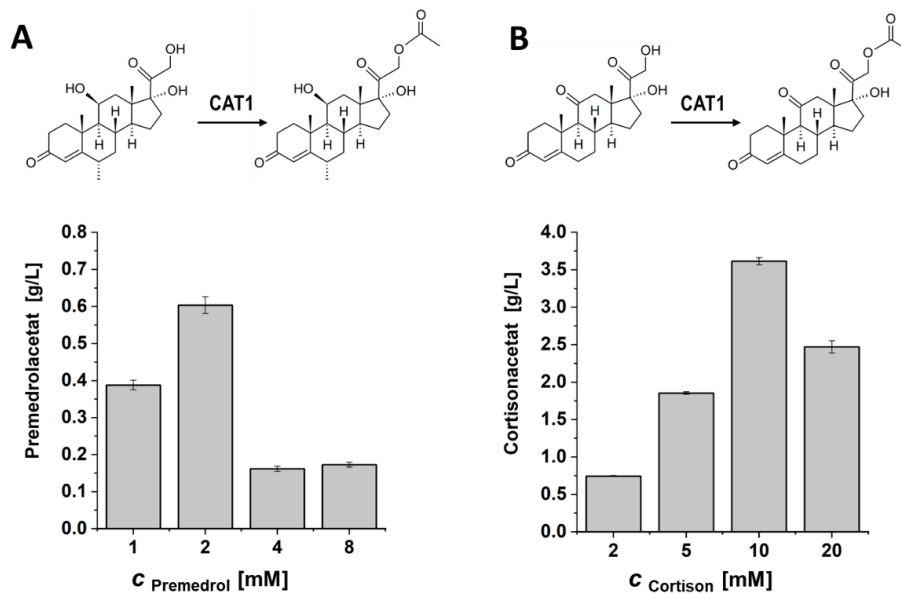


Abbildung 10: CAT1-Aktivität zur Steroidacetylierung in Abhängigkeit von der Premedrol- (A) und Cortisonkonzentration (B) nach 24 h Umsatzdauer. Die Analyse der Produkte erfolgte via RP-HPLC. Gezeigt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Umsatzreaktionen. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

3.3 Ökologische Bewertung der biotechnologischen Cortisonsynthese

Die chemische Herstellung pharmazeutischer Substanzen erfordert einen hohen Verbrauch an Rohstoffen, Lösemitteln, Energie und verursacht eine erhöhte Abfallproduktion. Um dies zugunsten des Umweltschutzes zu vermeiden, besteht ein zunehmender Bedarf an ökologisch nachhaltigen Syntheseverfahren. Durch die Anwendung von (semi-)biotechnologischen Verfahren können ökologische Standards einfacher erreicht und Reaktionen effizienter durchgeführt werden, wie etwa durch eine Reduktion der Syntheschritte unter milden Reaktionsbedingungen. Die Etablierung und Optimierung der biotechnologischen C11-Oxidation von Hydrocortison in Kapitel 2.1 erfolgte mit dem Ziel, das damit verbundene Belastungspotenzial für die Umwelt zu minimieren, zu bewerten und anschließend einem vergleichbaren chemischen Prozess gegenüberzustellen. Hierbei werden die finale Produktkonzentration, Umsatzeffizienz aber auch assoziierte Sicherheitsfaktoren für Mensch und Umwelt mitberücksichtigt und fließen in die Bewertung ein. Zum einen konnte die Produktkonzentration und Ausbeute durch die Optimierungen gesteigert werden, zum anderen wurde die Bildung unerwünschter Nebenprodukte durch die Wahl des Expressions- und Umsatzmediums verhindert. Hierdurch entfällt eine aufwändige Isolierung der Produkte und die Identifikation und fachgerechte Entsorgung unbekannter Stoffe. Der Wechsel von einem Arabinose- oder Xylose-induzierbaren Promotor zu einem konstitutiven Promotorsystem bewirkte eine Verringerung der Menge erforderlicher Reagenzien und eine erhebliche Steigerung der Produktivität um jeweils 70% und 110%. Desweiteren führte der Ersatz von Kaliumphosphatpuffer durch bereits genutztes Medium für die Umsatzreaktion zu einer Verringerung der Prozessschritte, da die Zellen nicht von Vollmedium getrennt und anschließend in ein Puffersystem überführt werden müssen. Wie in Kapitel 2.1 dargestellt, erfordert die Verwendung des Expressionsmediums für die Umsatzreaktion im Labormaßstab zwar einen Arbeitsschritt zur Konzentrierung der Zellen um ein Feuchtzellgewicht von 180 g L⁻¹ zu erreichen, könnte aber durch die Verwendung eines Bioreaktors mit gleichmäßiger Durchmischung und Sauerstoffdurchsatz eliminiert werden. Zusätzlich ermöglicht die Durchführung des Umsatzes einen verringerten Bedarf an phosphathaltigen Komponenten, was letztendlich im Hinblick auf die Entsorgung zu verringertem Abfallvolumen und geringerer Eutrophierung von Gewässern führt. Zwar kommt im finalen Ganzzellsystem das leicht entzündliche Lösungsmittel Aceton (2,5% v/v) zum Einsatz, welches einen niedrigen Flammpunkt bei -20 °C aufweist, jedoch maßgeblich zu einer erhöhten Produktkonzentration beiträgt und zudem eine selektive Synthese ohne Nebenprodukte ermöglicht (Kapitel 2.1, Abb. 3B). Eine denkbare Optimierung zur Verringerung des sicherheitsbezogenen Risikopotenzials könnte hier durch Verwendung von länger-kettigen Ketonen mit erhöhtem Flammpunkt erfolgen. Voraussetzung hierfür wäre eine ähnliche Effizienz der *LbADH*-Aktivierung und *FabG*-Inhibierung (Verweis auf 2.1), jedoch ohne inhibierenden Effekt auf *11βHSD1*. Ferner können für eine simultane NADP⁺ Regeneration alternative Regenerationssysteme zum Einsatz kommen, welche ohne die Zugabe von Lösemitteln aktiv sind. Beispielsweise zeigen hier NAD(P)H-Oxidasen großes Potenzial, da sie lediglich Sauerstoff zu Wasser, unter NADPH Verbrauch, reduzieren [256].

Durch die geringe Löslichkeit des Substrats Hydrocortison wurde DMSO als Lösemittel gewählt. Dieses wird in hoher Konzentration eingesetzt, kann allerdings durch den hohen Flammpunkt bei 88°C zu den eher schwerentflammaren Substanzen eingeordnet werden, was das Sicherheitsrisiko gering hält. Es weist zudem eine verhältnismäßig geringe Ökotoxizität im Vergleich zu ähnlichen Lösemitteln wie DMF

und THF auf. Dennoch kann diese Komponente durch Recyclingsysteme, basierend auf Elektrodialyse zur Entfernung anorganischer Salze [257] und anschließender fraktionierter Destillation [258], oder durch einen kontinuierlichen Gefrierprozess [259], wieder aufbereitet werden. Durch die Nachschaltung eines dieser Prozesse könnten die mit DMSO kontaminierten Abfälle reduziert werden, was das Lösemittel zum großen Teil aus der ökologischen Bewertung ausschließen würde. Zudem ermöglichen solche Verfahren das Rückführen von DMSO in den Produktionsprozess, was zusätzliche ökonomische Vorteile mit sich bringen würde. Durch den AK Heinzle (Technische Biochemie, Universität des Saarlandes) wurde dieser Prozess einer Bewertung der Risikopotentiale unterzogen und einem vergleichbaren chemischen Prozess gegenübergestellt. Als Grundlage diente eine patentierte Einzelschrittsynthese (Patentschrift CN 103304615 B). Da kein gleichartiger Prozess mit Cortisol als Substrat ermittelt werden konnte, diente hierzu die Synthese durch 17-(2-Iodoacetyl)-Cortison (CAS-Nr. 5758-63-4) als Ausgangsverbindung, um die Kenngrößen eines chemischen Prozesses exemplarisch festlegen zu können. Bei diesem wurde das Substrat in einem Methanol/Wasser Gemisch (1:1) gelöst, welches mit einer methanolischen KOH Lösung in Anwesenheit der Katalysatorkomponente Tetramethyl-ammoniumhydroxid titriert wurde. Die finale Produktausbeute betrug 81% bei einer Produktkonzentration von 81 g L^{-1} Cortison. Anhand dieser Informationen war es möglich, die Ökobilanzen des chemischen und biotechnologischen Prozesses gemäß Heinzle *et al.* zu ermitteln, und vergleichbar darzustellen [260]. Desweiteren war es möglich, die resultierenden Produktmengen und prozessbedingte Risikopotentiale ins Verhältnis zu setzen (Kosten/Nutzen). Hierzu werden die Massen der eingesetzten Substanzen ermittelt (Massenindices) (Abb. 11A, C) und je nach Risikopotential gewichtet. Letzteres erfolgt durch eine Aufschlüsselung nach unterschiedlichen, jeweils für Input und Output-spezifischen, relevanten SHE (Safety, Health, Environment)-Kriterien (wie z.B. Rohstoffgewinnung oder Komplexität der Substratsynthese für Input und Eutrophierungs- oder Erderwärmungspotenzial für Output), welche in Gesamtumweltbewertungskennzahlen (SHE-Indices) ausgegeben werden (Abb. B,D). Durch Summierung dieser Kennzahlen können unterschiedliche Prozesse in frühen Phasen, (wenn genaue, z.B. gerätespezifische Daten unbekannt sind) verglichen werden¹.

¹ Die SHE-Risikobewertung (Kapitel 3.2) erfolgte ausschließlich durch Prof. Dr. Elmar Heinzle und Dr. Christian Weyler auf Grundlage von Heinzle et al. 2006 und dient zur Veranschaulichung des ökologischen Einflusses des optimierten Prozesses und der Verdeutlichung ihrer möglichen industriellen Anwendbarkeit.

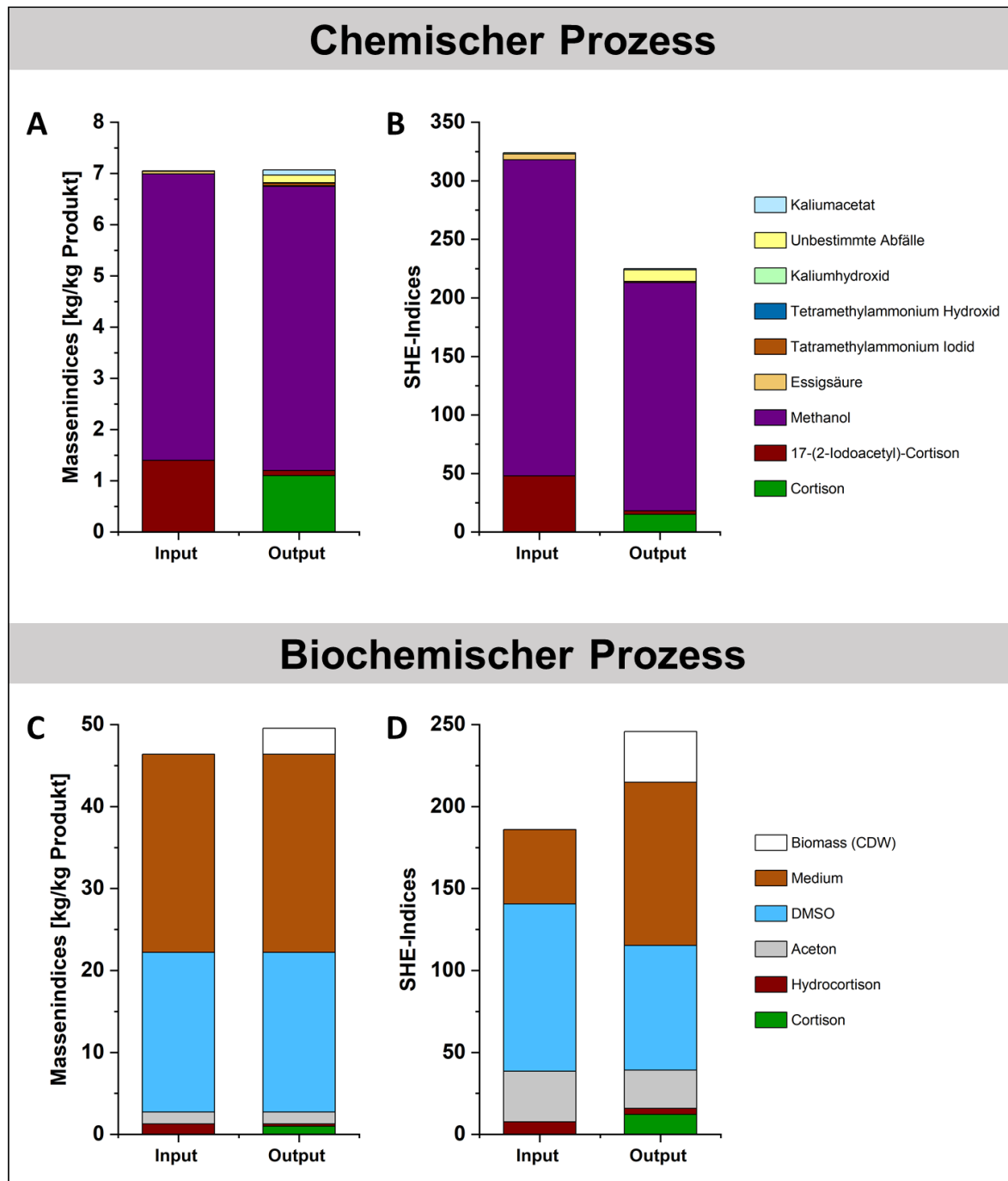


Abbildung 11: Ökoeffizienzanalyse des chemischen und etablierten biochemischen Prozesses. Die Analyse erfolgte mittels Berechnung der Massenindices (**A,C**) und SHE-(Safety, Health, Environment) Indices (**B,D**) der einzelnen Komponenten gemäß Heinzle *et al.* [260]. Zur Gegenüberstellung diente eine vergleichbare chemische Cortisonsynthese [261]. Abbildung wurde modifiziert nach Heinzle und Weyler (unveröffentlichte Daten).

Im Hinblick auf die errechneten SHE-Indices ergeben sich für den biotechnologischen Prozess bei der Bewertung nach SHE-Kriterien geringere Input- (-45,5%) und vergleichbare Output-Werte (+8,9 %) (Abb. 11D) gegenüber dem chemischen Prozess (Abb. 11B). Hierbei ist zu beachten, dass es sich bei dem chemischen Prozess zwar nicht um das gleiche Edukt handelt, dennoch resultiert der Prozess in dem gewünschten Produkt. Die Patentierung im Jahr 2015 deutet auf die hohe Aktualität des Prozesses und seiner vermutlichen, industriellen Anwendung hin [260]. Zusammenfassend kann das

B. megaterium Ganzzellsystem aus ökologischer Sicht als biotechnologischer Prozess mit chemischen Synthesen gleichgestellt werden. Zwar beschreibt der Prozess in Kapitel 2.1 lediglich einen biotechnologischen Reaktionsschritt im Labormaßstab, zeigt jedoch großes Potenzial, auch in industriellen Prozessen Anwendung zu finden. Durch die genannten Punkte kann der Prozess zusätzlich optimiert werden und stellt daher eine realistische industrielle Anwendungsmöglichkeit für eine ökologisch nachhaltige Cortisonsynthese dar.

4. Perspektiven

4.1 Industrielle Modifikation von Glucocorticoiden

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das große Potenzial von bakteriellen Ganzzellsystemen zur umweltfreundlichen Produktion pharmazeutisch relevanter, steroidal Verbindungen demonstriert werden. Durch die genannten Strategien konnten eine Vielzahl an Limitierungen der vorgestellten Ganzzellsysteme identifiziert und durch deren Vermeidung Produktbildung und -selektivität gesteigert werden. Aufgrund begrenzter, kontinuierlicher Kontrolle unterschiedlicher Parameter (O_2 -Durchsatz, pH-Wert, Zelldichte, Homogenität der Zellkultur etc.) unter Laborbedingungen könnte durch die Verwendung von automatisierten Bioreaktoren eine optimierte Produktion mit industrienahen Bedingungen erprobt werden. Die vorgestellten Untersuchungen in Kapitel 2.3 lieferten konkrete Hinweise auf eine bestehende Substratinhibierung, welche mittels sukzessiver Supplementierung minimiert werden konnte. Dahingegen könnte diese durch automatisierte und kontinuierliche Titration der Verbindungen nahezu komplett eliminiert werden. Zum Zweck einer industriellen Glucocorticoidsynthese besteht neben einer Hochskalierung des Kulturvolumens die Möglichkeit zur Durchführung einer kontinuierlichen Fermentation. Eine simultane Entfernung von hydrophoben Produkten durch ISPR-Methoden ermöglicht das Durchlaufen mehrerer Syntheszyklen, was die Produktausbeute pro Zeiteinheit signifikant erhöhen könnte. Allerdings sind Langzeit-Fermentationen zumeist durch Faktoren wie eine eingeschränkte genetische Stabilität und Verlust der transformierten Plasmide im rekombinanten Wirt beeinträchtigt. Dies kann in einer abweichenden Kopienanzahl individueller Zellen und Schwankungen der Zielprotein- und Produktkonzentration in der Fermentationskultur resultieren. Diese Aspekte könnten durch die chromosomale Integration der rekombinanten Gene mittels homologer Rekombination oder CRISPR/Cas [262] umgangen werden, was eine Erhaltung der genetischen Stabilität ohne erforderlichen Selektionsdruck ermöglicht. Neben der Konstruktion eines genetisch stabilen *B. megaterium* Stammes zur Cortisonsynthese könnte diese Herangehensweise ebenfalls für die Predmedrolproduktion im *E. coli* Ganzzellsystem genutzt werden. Da bei Letzterem insbesondere das Verhältnis der Proteine P450/CPR/Cyt_b₅ (Kapitel 2.2 Abb. 3) eine entscheidende Rolle für eine optimale Interaktion spielt, kann die Expression der chromosomal integrierten Gene sowohl durch unterschiedlich starke Promotoren, als auch durch eine variierende Kopienanzahl reguliert werden [26]. Dies trifft auch auf eine nachfolgende Acetylierung des Predmedrols zu (siehe Kapitel 2.3, Abb. 8A), welche durch die stabile Expression eine Aufrechterhaltung des optimalen P450/CAT1-Verhältnisses erzielen könnte. So könnte durch die zusätzliche chromosomale Integration der CAT1 Sequenz die vorgestellte Zweischristsynthese zur Predmedrolacetatbildung auf ein Ganzzellsystem beschränkt werden und folglich den Bedarf des teuren Permeabilisators Polymyxin B senken. Da die isolierten Systeme CYP21A2+Cyt_b₅ und CYP21A2_M210V (siehe Kapitel 2.2, Abb. 6) eine erhöhte Predmedrolproduktion im Fed-Batch-Modus aufweisen, besteht der Hinweis, dass der positive Effekt durch Kombination beider Optimierungen lediglich durch die bestehende Produktinhibierung verhindert wurde. Für weitere Untersuchungen sollte das Hydroxylierungspotenzial des Ganzzellsystems CYP21A2_M210V+Cyt_b₅ in der Mischkultur mit CAT1-exprimierenden Zellen getestet werden. Als Teilschritt eines ISPR-Verfahrens mittels Löslichkeits- oder Hydrophobizitätsänderungen zeigt die Steroidacetylierung durch CAT1 großes Potenzial. Nach der

Isolierung des stark hydrophoben Steroidesters kann eine Hydrolyse des Steroidacetats durch weitere mikrobielle Fermentationssysteme erfolgen. Je nach Zielverbindung kann dieses ebenso als Ausgangsverbindung für weitere Synthesen oder selbst als steroidaler Wirkstoff eingesetzt werden, wobei letzteres keine weiteren, aufwendigen Reinigungsschritte erfordern würde. Beispielsweise ist die erweiterte Anwendung des CAT1-Systems zur Optimierung des *B. megaterium* Ganzzellsystems (Kapitel 2.1) ebenfalls möglich. CAT1 zeigt zwar Acetylierungsaktivität gegenüber Cortison und seinem Substrat Hydrocortison, allerdings ist das Enzym 11 β HSD1 zusätzlich in der Lage auch Hydrocortisonacetat in Position C11 zu oxidieren. Durch eine erste Voruntersuchung in *B. megaterium* konnte jedoch bislang nur ein geringer Umsatz verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist sehr wahrscheinlich auf eine hohe Aktivität wirtseigener Esterasen zurückzuführen. Diese begrenzen sich auf vier potenzielle Carboxylesterasen (siehe Tabelle 3). Hierbei wird die stärkste Aktivität für die codierte Esterase des ORF BMD_2256 aufgrund der hohen Homologie zum sog. „Say1“ Motif vermutet, welches als Sterylacetylhydrolase in *S. cerevisiae* beschrieben ist [263]. Für eine zufriedenstellende heterologe CAT1-Expression und Acetylierungsaktivität sollten die individuellen Esteraseaktivitäten gegenüber Steroidestern geprüft werden und Gene der verantwortlichen Esterasen chromosomal deletiert werden. Darüber hinaus bietet die Anwendung der verantwortlichen Esterase aufgrund ihrer hohen Steroid-Hydrolyseaktivität die Möglichkeit zum Einsatz für weitere Ganzzelltransformationen. Beispielsweise kann dieses als effektives Werkzeug zur selektiven Regeneration von Premedrol in Kapitel 2.3 eingesetzt werden.

Tabelle 3: Potentielle ORF im *B. megaterium* DSM912 Genom codierend für Esterasen, fähig zur Hydrolyse von Steroidestern

Genbezeichnung in <i>B. megaterium</i> DSM912	charakterisierte Enzymklasse
BMD_2256	Carboxylesterase
BMD_0488	Protein der Phospholipase/Carboxylesterase Familie
BMD_2999	Protein der Phospholipase/Carboxylesterase Familie
BMD_5032	Carboxylesterase

Quelle: Datenbank „MegaBac v9“ der TU Braunschweig

Ohne simultane Produktentfernung konnte im Rahmen der Cortison-Ganzzellsynthese in *B. megaterium* dennoch eine industriell relevante Produktkonzentration von 14 g L⁻¹ erreicht werden. Durch Betrachtung konzentrationsabhängiger Hydrocortisonumsätze wird das Potenzial zur weiteren Steigerung der Produktkonzentration ersichtlich (Abb. 12). Durch den Einsatz der maximal möglichen Stammkonzentration von Hydrocortison in DMSO (400 mM) ergibt sich durch Anwendung linearer Regression eine theoretische, maximale Produktkonzentration von 28,8 g L⁻¹ was einer Erhöhung um den Faktor von 1,8 entspricht. Zur weiteren Steigerung der Produktion besteht die Möglichkeit, ungelöstes Hydrocortison zur Fermentationskultur hinzuzugeben (siehe Abb. 12, grün).

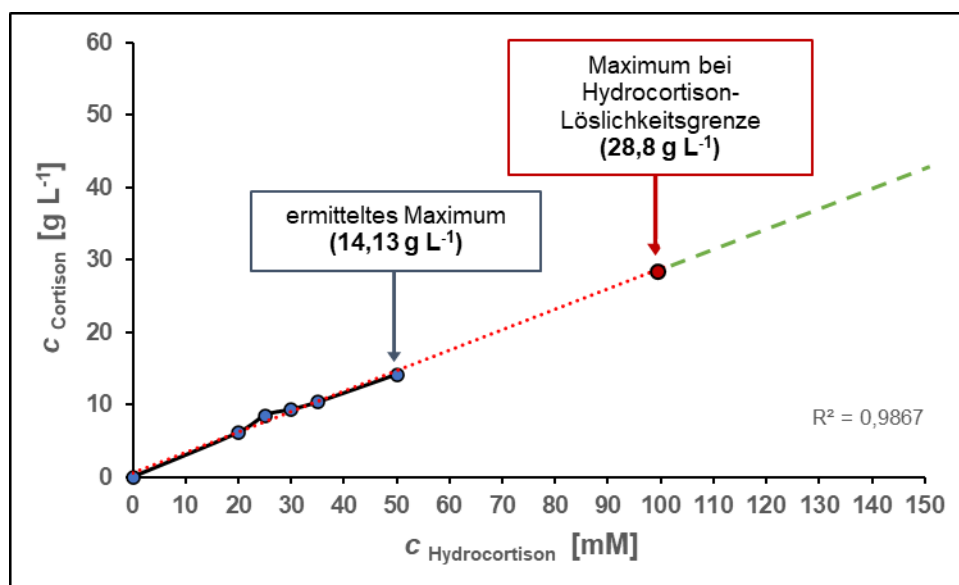


Abbildung 12: Ermittelte und prognostizierte Cortisonproduktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte der resultierenden Cortisonkonzentration (blau) nach 24 h des Umsatzes in M9CA Medium in Abhängigkeit von der eingesetzten Hydrocortisonkonzentration. Das experimentell ermittelte Produktmaximum unter Einsatz von 50 mM Hydrocortison liegt bei $14,13 \text{ g L}^{-1}$ Cortison. Die prognostizierte Cortisonproduktion (rote gestrichelte Linie) erfolgte mittels linearer Regression und zeigt ein theoretisches Maximum der Cortisonkonzentration bei $28,8 \text{ g L}^{-1}$ unter Einsatz der maximalen Arbeitskonzentration von 100 mM Hydrocortison bei gleichbleibender DMSO Konzentration im Umsatzmedium. Gesteigerte Hydrocortisonkonzentrationen durch Zugabe des Feststoffes sind in grün dargestellt. Die maximale Standardabweichung beträgt $\pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$.

Zum einen ermöglichte der Einsatz dieses Systems die biotechnologische Wertsteigerung der Verbindung Hydrocortison und die Herstellung von Cortison als günstiges Startmaterial für die Produktion weiterer Verbindungen wie Cortisonacetat oder Prednison. Zum anderen zeigte dieses System Anwendbarkeit zur Etablierung einer Zweischriffsynthese in einem *E. coli* Ganzzellsystem (siehe Kapitel 3.1.1). Dieses könnte zur Produktion weiterer Verbindungen wie $11\beta\text{OH}$ -Androstendion und $11\beta\text{OH}$ -Testosteron [264] mit anschließender Oxidation zu den korrespondierenden 11Keto -Verbindungen [265] eingesetzt werden. 11OH - und 11Keto -Testosteron stellen biologisch hochwirksame Androgene dar, die zur Aktivierung des Androgenrezeptors in derselben Intensität wie Testosteron und Dihydrotestosteron imstande sind. Die Androstendionderivate können als Marker von adrenalen oder gonadalen Erkrankungen eingesetzt werden [266].

4.2 Optimierung des *B. megaterium* Ganzzellsystems zur Vitamin D₂ - Hydroxylierung

Die erfolgreiche Hydroxylierung von VD₂ mittels CYP109E1 im *B. megaterium* Ganzzellsystem konnte in Kapitel 2.4 zum ersten Mal gezeigt werden. Dieses System demonstriert eine erfolgreiche Modellsynthese zur biotechnologischen Produktion 24,25-dihydroxylierter VD₂ Metaboliten, welche, analog zum Hauptmetaboliten $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_2$ eine Aktivierung des VD-Rezeptors aufweisen. Trotz erfolgreicher Produktion und hoher Selektivität der hydroxylierten Verbindungen besteht aufgrund geringer Ausbeute verbleibender Optimierungsbedarf des Systems. Durch Anwendung von Strategien, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, könnte die Produktivität und Selektivität des Ganzzellsystems erhöht werden. Beispielsweise könnte die Untersuchung alternativer Promotoren zu einer Steigerung der Proteinkonzentration führen. Zusätzlich könnten Chaperone mögliche Fehlfaltungen und Proteinaggregationen verhindern, die aufgrund der Überproduktion und der hohen Komplexität des

P450-Proteins erwartet werden können. Zur Erhöhung der Substratlöslichkeit und -aufnahme wurden in Kapitel 2.4 bereits HP- β -CD und Saponine eingesetzt. Analog zu Kapitel 2.1 könnte sich ein Ersatz der Löslichkeitsvermittler durch DMSO oder dessen zusätzliche Zugabe ebenfalls positiv auf die Produktbildung auswirken. Da VD₂ eine homologe Struktur und ähnliche Hydrophobizität zu Cholesterol aufweist, ist deren Einschluss in den Kern der PHB-Körper wahrscheinlich [25]. Aufgrund des cytosolischen Charakters von CYP109E1 könnte der Einschluss von VD₂ durch die PHB-Phospholipideinzelschicht eine entscheidende Barriere zur Protein-Ligand-Interaktion darstellen. Durch die Zugabe von DMSO könnte diese Barriere geschwächt werden und die Katalyse der Metaboliten durch das P450 erhöhen. Durch den Einsatz von CYP109E1 konnten Unterschiede in der Produktselektivität bei Nutzung des Substrates VD₂ im Vergleich zu VD₃ beobachtet werden. Letztere konnte bereits mittels ortsspezifischer Mutagenese des CYP109E1 beeinflusst werden. So konnten die Ausbeuten der einfach hydroxylierten Produkte 24(OH)VD₃ und 25(OH)VD₃ durch die jeweiligen Mutationen I241A und I85A selektiv gesteigert werden [60]. Möglicherweise ließe sich diese Strategie für die Katalyse von VD₂ je nach gewünschter Zielverbindung übertragen.

5. Literaturverzeichnis

1. Schüler J. Die Biotechnologie-Industrie. Ein Einführungs-, Übersichts- und Nachschlagewerk. Vol. 53, *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2013. 1689–1699 p.
2. Flaschel E, Sell D. Charme und Chancen der Weißen Biotechnologie. *Chemie Ing Tech*. 2005 Sep;77(9):1298–312.
3. Rudolph J. Die chemische Industrie als Innovationsmotor für den Klimaschutz. *Chemie Ing Tech*. 2006 Apr;78(4):381–8.
4. Lin R, Amrute AP, Pérez-Ramírez J. Halogen-Mediated Conversion of Hydrocarbons to Commodities. *Chem Rev*. 2017;117(5):4182–247.
5. Anastas PT, Warner JCF. *Green Chemistry: Theory and Practice*. 30th ed. New York: Oxford University Press; 1998. 148 p.
6. Ciriminna R, Pagliaro M. Green Chemistry in the Fine Chemicals and Pharmaceutical Industries. *Org Process Res Dev*. 2013;17(12):1479–84.
7. Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolt M, Witholt B. Industrial Biocatalysis and Tomorrow. *Nature*. 2001;409(January):258–68.
8. De Carvalho CCCR. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. *Biotechnol Adv*. 2011;29(1):75–83.
9. Wu S, Li Z. Whole-Cell Cascade Biotransformations for One-Pot Multistep Organic Synthesis. *ChemCatChem*. 2018 May 24;10(10):2164–78.
10. Sedlacek L, Smith LL. Biotransformations of steroids. *Crit Rev Biotechnol*. 1988;7(3):187–236.
11. Fernandes P, Cruz A, Angelova B, Pinheiro H., Cabral JM. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb Technol*. 2003 May;32(6):688–705.
12. Raffy S, Teissié J. Control of Lipid Membrane Stability by Cholesterol Content. *Biophys J*. 1999 Apr;76(4):2072–80.
13. Wüstner D. Intracellular Cholesterol Transport. In: *Cellular Lipid Metabolism*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 157–90.
14. Hellal-Levy C, Couette B, Fagart J, Souque A, Gomez-Sanchez C, Rafestin-Oblin ME. Specific hydroxylations determine selective corticosteroid recognition by human glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *FEBS Lett*. 1999;464(1–2):9–13.
15. McMaster A, Ray DW. Drug Insight: Selective agonists and antagonists of the glucocorticoid receptor. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008;4(2):91–101.
16. Thiele K, Buttgereit F, Huscher D, Zink A. Current use of glucocorticoids in patients with rheumatoid arthritis in Germany. *Arthritis Care Res*. 2005;53(5):740–7.

17. Løvås K, Husebye ES. Replacement therapy in Addison's disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2003 Dec 2;4(12):2145–9.
18. Barnes PJ. Mechanisms of Action of Glucocorticoids in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Aug;154(2):21–7.
19. Bureik M, Bernhardt R. Steroid Hydroxylation: Microbial Steroid Biotransformations Using Cytochrome P450 Enzymes. *Mod Biooxidation Enzym React Appl*. 2007;155–76.
20. Sahm H, Antranikian G, Stahmann K-P, Takors R. Industrielle Mikrobiologie [Internet]. Sahm H, Antranikian G, Stahmann K-P, Takors R, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. 316 p.
21. Peterson DH, Murray HC. Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11. *J Am Chem Soc*. 1952;74(7):1871–2.
22. Pellissier H, Santelli M. Chemical and biochemical hydroxylations of steroids. A review. *Org Prep Proced Int*. 2001 Feb 18;33(1):1–58.
23. Szczebara FM, Chandelier C, Villeret C, Masurel A, Bourot S, Duport C, Blanchard S, Groisillier A, Testet E, Costaglioli P, Cauet G, Degryse E, Balbuena D, Winter J, Achstetter T, Spagnoli R, Pompon D, Dumas B. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat Biotechnol*. 2003;21(2):143–9.
24. Gerber A, Hannemann F, Bleif S, Kleser M, Bernhardt R. Whole-cell system for cytochrome P450 monooxygenases biocatalysis. W02014/202627. 2014;
25. Gerber A, Kleser M, Biedendieck R, Bernhardt R, Hannemann F. Functionalized PHB granules provide the basis for the efficient side-chain cleavage of cholesterol and analogs in recombinant *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Fact*. 2015;14(1):1–13.
26. Schiffer L, Anderko S, Hobler A, Hannemann F, Kagawa N, Bernhardt R. A recombinant CYP11B1 dependent *Escherichia coli* biocatalyst for selective cortisol production and optimization towards a preparative scale. *Microb Cell Fact*. 2015;14(1):1–12.
27. Zehentgruber D, Drăgan C-A, Bureik M, Lütz S. Challenges of steroid biotransformation with human cytochrome P450 monooxygenase CYP21 using resting cells of recombinant *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biotechnol*. 2010 Apr 15;146(4):179–85.
28. Evans R. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* (80-). 1988 May 13;240(4854):889–95.
29. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*. 1995;83(6):835–9.
30. Goulding NJ, Flower R. Glucocorticoid biology - a molecular maze and clinical challenge. In: Goulding NJ, Flower RJ, editors. *Glucocorticoids*. Basel; Boston; Berlin: Birkhäuser Basel; 2001.

- p. 204.
31. Diederich S, Scholz T, Eigendorff E, Bumke-Vogt C, Quinkler M, Exner P, Pfeiffer AFH, Oelkers W, Bähr V. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of synthetic mineralocorticoids and glucocorticoids: Receptor transactivation and prereceptor metabolism by 11 β -hydroxysteroid-dehydrogenases. *Horm Metab Res.* 2004;36(6):423–9.
 32. Gessi S, Merighi S, Andrea Borea P. Glucocorticoids Pharmacology: Past, Present and Future. *Curr Pharm Des.* 2010 Nov 1;16(32):3540–53.
 33. Schäcke H, Schottelius A, Docke W-D, Strehlke P, Jaroch S, Schmees N, Rehwinkel H, Hennekes H, Asadullah K. Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proc Natl Acad Sci.* 2004 Jan 6;101(1):227–32.
 34. Schäcke H. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* 2002;96(1):23–43.
 35. Lattemann C, Stillger T, Janocha B, Rasser H-F, Rissom S, Anderko S, Bernhardt R, Hannemann F. 21-hydroxylation of steroids. WO 2016/066738 Al. 2016;
 36. Brixius-Anderko S, Schiffer L, Hannemann F, Janocha B, Bernhardt R. A CYP21A2 based whole-cell system in *Escherichia coli* for the biotechnological production of premedrol. *Microb Cell Fact.* 2015;14(1):1–14.
 37. Samuel S, Nguyen T, Choi HA. Pharmacologic Characteristics of Corticosteroids. *J Neurocritical Care.* 2017 Dec 27;10(2):53–9.
 38. Cardwell G, Bornman J, James A, Black L. A Review of Mushrooms as a Potential Source of Dietary Vitamin D. *Nutrients.* 2018 Oct 13;10(10):1498.
 39. Jäpelt RB, Jakobsen J. Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis. *Front Plant Sci.* 2013;4(MAY):1–21.
 40. Havinga E. Vitamin D, example and challenge. *Experientia.* 1973;29(10):1181–93.
 41. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2005;289(1 58-1):8–28.
 42. Heaney RP, Armas LA, Shary JR, Bell NH, Binkley N, Hollis BW. 25-Hydroxylation of vitamin D3: relation to circulating vitamin D3 under various input conditions. *Am J Clin Nutr.* 2008 Jun 1;87(6):1738–42.
 43. Fraser DR, Kodicek E. Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite. *Nature.* 1970 Nov;228(5273):764–6.
 44. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(12):664–73.

45. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev.* 1998;78(4):1193–231.
46. Leichtmann GA, Bengoa JM, Bolt MJG, Sitrin MD. Intestinal absorption of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol in patients with both Crohn's disease and intestinal resection. *Am J Clin Nutr.* 1991;54(3):548–52.
47. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C. Daily oral 25-hydroxycholecalciferol supplementation for vitamin D deficiency in haemodialysis patients: Effects on mineral metabolism and bone markers. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(11):3670–6.
48. Seo EG, Einhorn TA, Norman AW. 24R,25-dihydroxyvitamin D₃: An essential vitamin D₃ metabolite for both normal bone integrity and healing of tibial fracture in chicks. *Endocrinology.* 1997;138(9):3864–72.
49. Armas LAG, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D₂ is much less effective than vitamin D₃ in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5387–91.
50. Holick MF, Biancuzzo RM, Chen TC, Klein EK, Young A, Bibuld D, Reitz R, Salameh W, Ameri A, Tannenbaum AD. Vitamin D₂ is as effective as vitamin D₃ in maintaining circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(3):677–81.
51. Biancuzzo RM, Clarke N, Reitz RE, Travison TG, Holick MF. Serum concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D₂ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in response to vitamin D₂ and vitamin D₃ supplementation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):973–9.
52. Badenhoop K, Führer D. Vitamin D. *Der Diabetol.* 2016 Jun 6;12(4):230–1.
53. Vollmer I, Keller M, Kroke A. Vegane Ernährung: Verwendung von Nahrungsergänzungsmitteln und angereicherten Lebensmitteln - Eine internetbasierte Erhebung. *Ernährungs-Umschau.* 2018;65(9):484–93.
54. Kametani T, Furuyama H. Synthesis of vitamin D₃ and related compounds. *Med Res Rev.* 1987;7(2):147–71.
55. Sakaki T, Sugimoto H, Hayashi K, Yasuda K, Munetsuna E, Kamakura M, Ikushiro S, Shiro Y. Bioconversion of vitamin D to its active form by bacterial or mammalian cytochrome P450. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2011;1814(1):249–56.
56. Sawada N, Sakaki T, Yoneda S, Kusudo T, Shinkyō R, Ohta M, Inouye K. Conversion of vitamin D₃ to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ by *Streptomyces griseolus* cytochrome P450SU-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320(1):156–64.
57. Kawauchi H, Sasaki J, Adachi T, Hanada K, Beppu T, Horinouchi S. Cloning and nucleotide sequence of a bacterial cytochrome P-450VD25 gene encoding vitamin D-3 25-hydroxylase. *BBA - Gene Struct Expr.* 1994;1219(1):179–83.

58. Fujii Y, Kabumoto H, Nishimura K, Fujii T, Yanai S, Takeda K, Tamura N, Arisawa A, Tamura T. Purification, characterization, and directed evolution study of a vitamin D3 hydroxylase from *Pseudonocardia autotrophica*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;385(2):170–5.
59. Abdulmughni A, Jóźwik IK, Putkaradze N, Brill E, Zapp J, Thunnissen A-MWH, Hannemann F, Bernhardt R. Characterization of cytochrome P450 CYP109E1 from *Bacillus megaterium* as a novel vitamin D3 hydroxylase. *J Biotechnol*. 2017 Feb;243:38–47.
60. Abdulmughni A, Jóźwik IK, Brill E, Hannemann F, Thunnissen AWH, Bernhardt R. Biochemical and structural characterization of CYP109A2, a vitamin D3 25-hydroxylase from *Bacillus megaterium*. *FEBS J*. 2017 Nov 16;284(22):3881–94.
61. Hayashi K, Yasuda K, Sugimoto H, Ikushiro S, Kamakura M, Kittaka A, Horst RL, Chen TC, Ohta M, Shiro Y, Sakaki T. Three-step hydroxylation of vitamin D3 by a genetically engineered CYP105A1. *FEBS J*. 2010 Oct;277(19):3999–4009.
62. Sono M, Roach MP, Coulter ED, Dawson JH. Heme-Containing Oxygenases. *Chem Rev*. 1996 Jan;96(7):2841–88.
63. Keevil T, Mason HS. Molecular oxygen in biological oxidations—An overview. *Methods Enzymol*. 1978;52(C):3–40.
64. Duport C, Spagnoli R, Degryse E, Pompon D. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nat Biotechnol*. 1998;16(2):186–9.
65. Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, Benjamin K, Fisher K, McPhee D, Leavell MD, Tai A, Main A, Eng D, Polichuk DR, Teoh KH, Reed DW, Treynor T, Lenihan J, Jiang H, Fleck M, Bajad S, Dang G, Dengrove D, Diola D, Dorin G, Ellens KW, Fickes S, Galazzo J, Gaucher SP, Geistlinger T, Henry R, Hepp M, Horning T, Iqbal T, Kizer L, Lieu B, Melis D, Moss N, Regentin R, Secrest S, Tsuruta H, Vazquez R, Westblade LF, Xu L, Yu M, Zhang Y, Zhao L, Lievens J, Covello PS, Keasling JD, Reiling KK, Renninger NS, Newman JD. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*. 2013;496(7446):528–32.
66. Nelson DR. Cytochrome P450 diversity in the tree of life. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2018 Jan;1866(1):141–54.
67. Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R, Waterman MR. The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. *DNA*. 1987 Feb;6(1):1–11.
68. Omura T, Sato R. The Carbon of Liver Microsomes. *J Biol Chem*. 1964;239(7):2370–8.
69. Omura T. Mitochondrial P450s. *Chem Biol Interact*. 2006;163(1–2):86–93.
70. Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem Rev*. 2005 Jun;105(6):2253–78.
71. Ener ME, Lee YT, Winkler JR, Gray HB, Cheruzela L. Photooxidation of cytochrome P450-BM3.

- Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(44):18783–6.
72. Hammerer L, Winkler CK, Kroutil W. Regioselective Biocatalytic Hydroxylation of Fatty Acids by Cytochrome P450s. *Catal Letters*. 2018 Mar 21;148(3):787–812.
73. Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, Bernhardt R. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2007;1770(3):330–44.
74. Grinberg A V., Hannemann F, Schiffler B, Müller J, Heinemann U, Bernhardt R. Adrenodoxin: Structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins Struct Funct Genet*. 2000;40(4):590–612.
75. Porter TD, Kasper CB. NADPH-cytochrome p-450 oxidoreductase: Flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochemistry*. 1986;25(7):1682–7.
76. Smith GCM, Tewt DG, Wolf CR. Dissection of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase into distinct functional domains (drug metabolism/electron transport/flavoproteins/nitric oxide synthase). *Biochemistry*. 1994;91(August):8710–4.
77. Schenkman JB, Jansson I. The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol Ther*. 2003;97(2):139–52.
78. Miller WL. Minireview: Regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology*. 2005;146(6):2544–50.
79. Gorsky LD, Coon MJ. Effects of conditions for reconstitution with cytochrome b5 on the formation of products in cytochrome P-450-catalyzed reactions. *Drug Metab Dispos*. 1986;14(1):89–96.
80. Gruenke LD, Konopka K, Cadieu M, Waskell L. The stoichiometry of the cytochrome P-450-catalyzed metabolism of methoxyflurane and benzphetamine in the presence and absence of cytochrome b5. *J Biol Chem*. 1995;270(42):24707–18.
81. Neunzig J, Milhim M, Schiffer L, Khatri Y, Zapp J, Sánchez-Guijo A, Hartmann MF, Wudy SA, Bernhardt R. The steroid metabolite 16(β)-OH-androstenedione generated by CYP21A2 serves as a substrate for CYP19A1. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017 Mar;167:182–91.
82. Woodward RB, Brutcher F V. cis-Hydroxylation of a Synthetic Steroid Intermediate with Iodine, Silver Acetate and Wet Acetic Acid. *J Am Chem Soc*. 1958 Jan;80(1):209–11.
83. Drăgan CA, Zearo S, Hannemann F, Bernhardt R, Bureik M. Efficient conversion of 11-deoxycortisol to cortisol (hydrocortisone) by recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res*. 2005;5(6–7):621–5.
84. Kelly D, Kelly S. Rewiring yeast for drug synthesis. *Nat Biotechnol*. 2003 Feb;21(2):133–4.
85. Biedendieck R, Malten M, Barg H, Bunk B, Martens J-H, Deery E, Leech H, Warren MJ, Jahn D. Metabolic engineering of cobalamin (vitamin B 12) production in *Bacillus megaterium*. *Microb*

- Biotechnol. 2010 Jan;3(1):24–37.
86. Silva RG, Souza VR, Nucci ER, Pinotti LM, Cruz AJG, Giordano RC, Giordano RLC. Using a medium of free amino acids to produce penicillin G acylase in fed-batch cultivations of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Brazilian J Chem Eng.* 2006 Mar;23(1):37–43.
 87. Vihinen M, Mantsiila P. Microbial Amylolytic Enzyme. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1989 Jan 26;24(4):329–418.
 88. Hebeda RE, Styrlund CR, Teague WM. Benefits of *Bacillus megaterium* Amylase in Dextrose Production. *Starch - Stärke.* 1988;40(1):33–6.
 89. Bunk B, Schulz A, Stammen S, Münch R, Warren MJ, Jahn D, Biedendieck R. A short story about a big magic bug. *Bioeng Bugs.* 2010 Mar 21;1(2):85–91.
 90. Vary PS. Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology.* 1994;140(5):1001–13.
 91. Kiss FM, Schmitz D, Zapp J, Dier TKF, Volmer DA, Bernhardt R. Comparison of CYP106A1 and CYP106A2 from *Bacillus megaterium* – identification of a novel 11-oxidase activity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015 Oct 24;99(20):8495–514.
 92. Putkaradze N, Kiss FM, Schmitz D, Zapp J, Hutter MC, Bernhardt R. Biotransformation of prednisone and dexamethasone by cytochrome P450 based systems – Identification of new potential drug candidates. *J Biotechnol.* 2017 Jan;242:101–10.
 93. Schmitz D, Zapp J, Bernhardt R. Steroid conversion with CYP106A2 - production of pharmaceutically interesting DHEA metabolites. *Microb Cell Fact.* 2014;13(1):1–13.
 94. Bleif S, Hannemann F, Lisurek M, Von Kries JP, Zapp J, Dietzen M, Antes I, Bernhardt R. Identification of CYP106A2 as a Regioselective Allylic Bacterial Diterpene Hydroxylase. *ChemBioChem.* 2011;12(4):576–82.
 95. Brill E, Hannemann F, Zapp J, Brüning G, Jauch J, Bernhardt R. A new cytochrome P450 system from *Bacillus megaterium* DSM319 for the hydroxylation of 11-keto- β -boswellic acid (KBA). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(4):1703–17.
 96. Kiss FM, Lundemo MT, Zapp J, Woodley JM, Bernhardt R. Process development for the production of 15 β -hydroxycyproterone acetate using *Bacillus megaterium* expressing CYP106A2 as whole-cell biocatalyst. *Microb Cell Fact.* 2015;14(1):28.
 97. Bleif S, Hannemann F, Zapp J, Hartmann D, Jauch J, Bernhardt R. A new *Bacillus megaterium* whole-cell catalyst for the hydroxylation of the pentacyclic triterpene 11-keto- β -boswellic acid (KBA) based on a recombinant cytochrome P450 system. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;93(3):1135–46.
 98. Furuya T, Shibata D, Kino K. Phylogenetic analysis of *Bacillus* P450 monooxygenases and evaluation of their activity towards steroids. *Steroids.* 2009;74(12):906–12.
 99. Putkaradze N, Litzenburger M, Abdulmughni A, Milhim M, Brill E, Hannemann F, Bernhardt R.

- CYP109E1 is a novel versatile statin and terpene oxidase from *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(23–24):8379–93.
100. Jóźwik IK, Kiss FM, Gricman Ł, Abdulmughni A, Brill E, Zapp J, Pleiss J, Bernhardt R, Thunnissen AMWH. Structural basis of steroid binding and oxidation by the cytochrome P450 CYP109E1 from *Bacillus megaterium*. *FEBS J.* 2016;283(22):4128–48.
101. Putkaradze N, Litzenburger M, Hutter MC, Bernhardt R. CYP109E1 from *Bacillus megaterium* Acts as a 24- and 25-Hydroxylase for Cholesterol. *ChemBioChem.* 2019;20(5):655–8.
102. Michael AE, Thurston LM, Rae MT. Glucocorticoid metabolism and reproduction: A tale of two enzymes. *Reproduction.* 2003;126(4):425–41.
103. Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. *Physiol Rev.* 2013;93(3):1139–206.
104. Webb RJ, Sunak N, Wren L, Michael AE. Inactivation of glucocorticoids by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes increases during the meiotic maturation of porcine oocytes. *REPRODUCTION.* 2008 Dec;136(6):725–32.
105. Kinel FA, Benagiano G, Angee I. Sustained release hormonal preparations. I. Diffusion of various steroids through polymer membranes. *Steroids.* 1968 May;11(5):673–80.
106. Oppermann U, Filling C, Hult M, Shafqat N, Wu X, Lindh M, Shafqat J, Nordling E, Kallberg Y, Persson B, Jörnvall H. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact.* 2003 Feb;143–144:247–53.
107. Kavanagh KL, Jörnvall H, Persson B, Oppermann U. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Dec 14;65(24):3895–906.
108. Kallberg Y, Oppermann U, Jörnvall H, Persson B. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). Coenzyme-based functional assignments in completed genomes. *Eur J Biochem.* 2002;269(18):4409–17.
109. Filling C, Berndt KD, Benach J, Knapp S, Prozorovski T, Nordling E, Ladenstein R, Jörnvall H, Oppermann U. Critical Residues for Structure and Catalysis in Short-chain Dehydrogenases/Reductases. *J Biol Chem.* 2002 Jul 12;277(28):25677–84.
110. Jörnvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, Gonzalez-Duarte R, Jeffery J, Ghosh D. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry.* 1995 May;34(18):6003–13.
111. Jörnvall H, Woenckhaus C, Schättle E, Jeck R. Modification of alcohol dehydrogenases with two NAD⁺-analogues containing reactive substituents on the functional side of the molecule. *FEBS Lett.* 1975;54(2):297–301.
112. Stawoska I, Dudzik A, Wasylewski M, Jemiola-Rzemińska M, Skoczowski A, Strzałka K, Szaleniec M. DFT-based prediction of reactivity of short-chain alcohol dehydrogenase. *J*

- Comput Aided Mol Des. 2017 Jun 26;31(6):587–602.
113. Gerber A, Milhim M, Hartz P, Zapp J, Bernhardt R. Genetic engineering of *Bacillus megaterium* for high-yield production of the major teleost progestogens 17 α ,20 β -di- and 17 α ,20 β ,21 α -trihydroxy-4-pregnen-3-one. *Metab Eng.* 2016 Jul;36:19–27.
 114. Bhatti HN, Khera RA. Biological transformations of steroidal compounds: A review. *Steroids.* 2012;77(12):1267–90.
 115. Donova M V. Transformation of steroids by actinobacteria: A review. *Appl Biochem Microbiol.* 2007;43(1):1–14.
 116. Donova M V., Egorova O V. Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012 Jun 6;94(6):1423–47.
 117. Choi K-P, Molnár I, Yamashita M, Murooka Y. Purification and Characterization of the 3-Ketosteroid- Δ 1-Dehydrogenase of *Arthrobacter simplex* Produced in *Streptomyces lividans*1. *J Biochem.* 1995 May;117(5):1043–9.
 118. Plesiat P, Grandguillot M, Harayama S, Vragar S, Michel-Briand Y. Cloning, sequencing, and expression of the *Pseudomonas testosteroni* gene encoding 3-oxosteroid Δ 1-dehydrogenase. *J Bacteriol.* 1991;173(22):7219–27.
 119. Itagaki E, Hatta T, Wakabayashi T, Suzuki K. Spectral properties of 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase from *Nocardia corallina*. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Protein Struct Mol.* 1990;1040(2):281–6.
 120. Morii S, Fujii C, Miyoshi T, Iwami M, Itagaki E. 3-Ketosteroid- Δ 1 -dehydrogenase of *Rhodococcus rhodochrous*: Sequencing of the genomic DNA and hyperexpression, purification, and characterization of the recombinant enzyme. *J Biochem.* 1998;124(5):1026–32.
 121. Sukhodolskaya G V., Nikolayeva VM, Khomutov SM, Donova M V. Steroid-1-dehydrogenase of *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D strain producing 9 α -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione from sitosterol. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;74(4):867–73.
 122. Leuchs S, Greiner L. Alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*: A versatile robust catalyst for enantioselective transformations. *Chem Biochem Eng Q.* 2011;25(2):267–81.
 123. Odermatt A, Arnold P, Stauffer A, Frey BM, Frey FJ. The N-terminal anchor sequences of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases determine their orientation in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem.* 1999;274(40):28762–70.
 124. Bujalska IJ, Walker E a, Hewison M, Stewart PM. A switch in dehydrogenase to reductase activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 upon differentiation of human omental adipose stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(3):1205–10.
 125. Atanasov AG, Nashev LG, Schweizer RAS, Frick C, Odermatt A. Hexose-6-phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1

- as an oxoreductase. *FEBS Lett.* 2004;571(1–3):129–33.
126. Atanasov AG, Nashev LG, Gelman L, Legeza B, Sack R, Portmann R, Odermatt A. Direct protein-protein interaction of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum lumen. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2008;1783(8):1536–43.
127. Bánhegyi G, Benedetti A, Fulceri R, Senesi S. Cooperativity between 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2004;279(26):27017–21.
128. Hult M, Jörnvall H, Oppermann UCT. Selective inhibition of human type 1 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase by synthetic steroids and xenobiotics. *FEBS Lett.* 1998;441(1):25–8.
129. Nashev LG, Chandsawangbhuwana C, Balazs Z, Atanasov AG, Dick B, Frey FJ, Baker ME, Odermatt A. Hexose-6-phosphate Dehydrogenase Modulates 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1-Dependent Metabolism of 7-keto- and 7 β -hydroxy-neurosteroids. El-Shemy H, editor. *PLoS One.* 2007 Jun 27;2(6):561.
130. Arampatzis S. Comparative enzymology of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from six species. *J Mol Endocrinol.* 2005 Aug 1;35(1):89–101.
131. Hennebert O, Le Mée S, Pernelle C, Morfin R. 5 α -Androstane-3 β ,7 α ,17 β -triol and 5 α -androstane-3 β ,7 β ,17 β -triol as substrates for the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Steroids.* 2007;72(13):855–64.
132. Hennebert O, Pernelle C, Ferroud C, Morfin R. 7 α - and 7 β -hydroxy-epiandrosterone as substrates and inhibitors for the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007 Jun;105(1–5):159–65.
133. Muller C, Pompon D, Urban P, Morfin R. Inter-conversion of 7 α - and 7 β -hydroxy-dehydroepiandrosterone by the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006 Jun;99(4–5):215–22.
134. Odermatt A, Da Cunha T, Penno CA, Chandsawangbhuwana C, Reichert C, Wolf A, Dong M, Baker ME. Hepatic reduction of the secondary bile acid 7-oxolithocholic acid is mediated by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1. *Biochem J.* 2011 Jun 15;436(3):621–9.
135. Maser E, Richter E, Friebertshäuser J. The Identification of 11 β -hydroxysteroid Dehydrogenase as Carbonyl Reductase of the Tobacco-Specific Nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Eur J Biochem.* 1996 Jun;238(2):484–9.
136. Kenneke JF, Mazur CS, Ritger SE, Sack TJ. Mechanistic Investigation of the Noncytochrome P450-Mediated Metabolism of Triadimefon to Triadimenol in Hepatic Microsomes. *Chem Res Toxicol.* 2008 Oct 20;21(10):1997–2004.
137. Hult M, Nobel CS., Abrahmsen L, Nicoll-Griffith D., Jörnvall H, Oppermann UC. Novel enzymological profiles of human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Chem Biol Interact.*

- 2001 Jan;130–132:805–14.
138. Ozols J. Lumenal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1995;270(5):2305–12.
 139. Ogg D, Elleby B, Norström C, Stefansson K, Abrahmsén L, Oppermann U, Svensson S. The crystal structure of guinea pig 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 provides a model for enzyme-lipid bilayer interactions. *J Biol Chem.* 2005;280(5):3789–94.
 140. Zhang J, Osslund TD, Plant MH, Clogston CL, Nybo RE, Xiong F, Delaney JM, Jordan SR. Crystal structure of murine 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1: An important therapeutic target for diabetes. *Biochemistry.* 2005;44(18):6948–57.
 141. Walker EA, Clark AM, Hewison M, Ride JP, Stewart PM. Functional Expression, Characterization, and Purification of the Catalytic Domain of Human 11- β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *J Biol Chem.* 2001;276(24):21343–50.
 142. Blum A, Martin HJ, Maser E. Human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is enzymatically active in its nonglycosylated form. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276(2):428–34.
 143. Lawson AJ, Walker EA, White SA, Dafforn TR, Stewart PM, Ride JP. Mutations of key hydrophobic surface residues of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 increase solubility and monodispersity in a bacterial expression system. *Protein Sci.* 2009 Jul;18(7):1552–63.
 144. Zhang D, Zhang R, Zhang J, Chen L, Zhao C, Dong W, Zhao Q, Wu Q, Zhu D. Engineering a hydroxysteroid dehydrogenase to improve its soluble expression for the asymmetric reduction of cortisone to 11 β -hydrocortisone. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(21):8879–86.
 145. Vermeulen A. Longacting steroid preparations. *Acta Clin Belg.* 1975;30(1):48–55.
 146. Nahmany M, Melman A. Chemoselectivity in reactions of esterification. *Org Biomol Chem.* 2004;2(11):1563.
 147. Dominguez O V., Seeley JR, Gorski J. Studies of the Acetylation of Steroids Using 1-Carbon-14-Acetic Anhydride. *Anal Chem.* 1963;35(9):1243–7.
 148. Hu X, Zhang Z, Zhang X, Li Z, Zhu X. Selective acylation of cholic acid derivatives with multiple methacrylate groups. *Steroids.* 2005 Jul;70(8):531–7.
 149. Riva S, Klibanov AM. Enzymochemical Regioselective Oxidation of Steroids without Oxidoreductases. *Am Chem Soc.* 1988;110(10):3291–5.
 150. Santaniello E, Ferraboschi P, Reza-Elahi S. Lipase-Catalyzed Regio- and Stereoselective Acylation of Hydroxy Groups in Steroid Side Chains. *Monatshefte fuer Chemie/Chemical Mon.* 2000 Jun 15;131(6):617–22.
 151. Hunter AC, Watts KR, Dedi C, Dodd HT. An unusual ring—A opening and other reactions in steroid transformation by the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;116:171–7.

-
152. Winter J, Shackleton CHL, Morris GN, Locascio S, Bokkenheuser VD. The 21-acetylation of corticosteroids by *Clostridium sporogenes*. *Steroids*. 1986 Nov 1;48(5–6):381–94.
 153. Mahato SB, Banerjee S, Podder S. REVIEW ARTICLE NUMBER 40 STEROID TRANSFORMATIONS BY MICROORGANISMS-III. 1989;28(1).
 154. Mosa A, Hutter MC, Zapp J, Bernhardt R, Hannemann F. Regioselective Acetylation of C21 Hydroxysteroids by the Bacterial Chloramphenicol Acetyltransferase i. *ChemBioChem*. 2015;16(11):1670–9.
 155. Shaw W V. Chloramphenicol Acetyltransferase: Enzymology and Molecular Biology. *Crit Rev Biochem*. 1983 Jan 26;14(1):1–46.
 156. Murray IA, Cann PA, Day PJ, Derrick JP, Sutcliffe MJ, Shaw W V, Leslie AG. Steroid recognition by chloramphenicol acetyltransferase: engineering and structural analysis of a high affinity fusidic acid binding site. *J mol Biol*. 1995;254(5):993–1005.
 157. Day PJ, Shaw W V. Acetyl Coenzyme A Binding by Chloramphenicol Acetyltransferase. *J Biol Chem*. 1992;219(8):5122–7.
 158. Diederich S, Eigendorff E, Burkhardt P, Quinkler M, Bumke-Vogt C, Rochel M, Seidelmann D, Esperling P, Oelkers W, Bähr V. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Types 1 and 2: An Important Pharmacokinetic Determinant for the Activity of Synthetic Mineralo- and Glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Dec 1;87(12):5695–701.
 159. Kuhn D, Kholiq MA, Heinzle E, Bühler B, Schmid A. Intensification and economic and ecological assessment of a biocatalytic oxyfunctionalization process. *Green Chem*. 2010;12(5):815.
 160. Sheldon RA. Biocatalysis and Green Chemistry. In: *Green Biocatalysis*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2016. p. 1–15.
 161. Donova M V., Egorova O V. Microbial steroid transformations: Current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;94(6):1423–47.
 162. Mosa A, Hutter MC, Zapp J, Bernhardt R, Hannemann F. Regioselective Acetylation of C21 Hydroxysteroids by the Bacterial Chloramphenicol Acetyltransferase i. *ChemBioChem*. 2015;16(11):1670–9.
 163. Jaeger KE, Liese A, Syldatk C, Lay M. Einführung in die Enzymtechnologie [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2018.
 164. Freeman A, Woodley JM, Lilly MD. In Situ Product Removal as a Tool for Bioprocessing. *Nat Biotechnol*. 1993 Sep 1;11(9):1007–12.
 165. Chacón MG, Marriott A, Kendrick EG, Styles MQ, Leak DJ. Esterification of geraniol as a strategy for increasing product titre and specificity in engineered *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2019;18(1):105.
 166. Rushworth RL, Chrisp GL, Torpy DJ. The use of medical identification jewellery in adults with

- adrenal insufficiency in Australia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019 Apr 29;cen.13985.
167. Colombo C, De Leo S, Di Stefano M, Vannucchi G, Persani L, Fugazzola L. Primary Adrenal Insufficiency During Lenvatinib or Vandetanib and Improvement of Fatigue After Cortisone Acetate Therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019 Mar 1;104(3):779–84.
168. Chatterjee N, Roy C, Das S, Ajmi W Al, Sharji NS Al, Mandhari A Al. Comparative Efficacy of Methylprednisolone Acetate and Dexamethasone Disodium Phosphate in Lumbosacral Transforaminal Epidural Steroid Injections. *Turkish J Anaesthesiol Reanim*. 2019 Sep 27;47(5):414–9.
169. Szpilfogel SA, van Hemert PA, de Winter MS. 1,2-Dehydroderivatives of Reichstein's substances U and E. *Recl des Trav Chim des Pays-Bas*. 2010 Sep 2;75(10):1227–32.
170. Zhang H, Tian Y, Wang J, Li Y, Wang H, Mao S, Liu X, Wang C, Bie S, Lu F. Construction of engineered *Arthrobacter simplex* with improved performance for cortisone acetate biotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Nov 14;97(21):9503–14.
171. Cole PA. Chaperone-assisted protein expression. *Structure*. 1996 Mar 15;4(3):239–42.
172. Horst RL, Littledike ET, Riley JL, Napoli JL. Quantitation of vitamin D and its metabolites and their plasma concentrations in five species of animals. *Anal Biochem*. 1981 Sep;116(1):189–203.
173. Koszewski NJ, Reinhardt TA, Napoli JL, Beitz DC, Horst RL. 24,26-Dihydroxyvitamin D₂: A Unique Physiological Metabolite of Vitamin D₂. *Biochemistry*. 1988;27(15):5785–90.
174. Lundemo MT, Woodley JM. Guidelines for development and implementation of biocatalytic P450 processes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(6):2465–83.
175. Straathof AJ., Panke S, Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol*. 2002 Dec 1;13(6):548–56.
176. Deuschle U, Kammerer W, Gentz R, Bujard H. Promoters of *Escherichia coli*: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures. *EMBO J*. 1986;5(11):2987–94.
177. Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*. 1986;189(1):113–30.
178. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P(BAD) promoter. *J Bacteriol*. 1995;177(14):4121–30.
179. Giacalone MJ, Gentile AM, Lovitt BT, Berkley NL, Gunderson CW, Surber MW. Toxic protein expression in *Escherichia coli* using a rhamnose-based tightly regulated and tunable promoter system. *Biotechniques*. 2006;40(3):355–64.
180. Wegerer A, Sun T, Altenbuchner J. Optimization of an *E. coli* L-rhamnose-inducible expression vector: test of various genetic module combinations. *BMC Biotechnol*. 2008;8(1):2.

181. Gamer M, Fröde D, Biedendieck R, Stammen S, Jahn D. A T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;82(6):1195–203.
182. Biedendieck R, Gamer M, Jaensch L, Meyer S, Rohde M, Deckwer W-D, Jahn D. A sucrose-inducible promoter system for the intra- and extracellular protein production in *Bacillus megaterium*. *J Biotechnol*. 2007 Dec;132(4):426–30.
183. Meinhardt F, Stahl U, Ebeling W. Highly efficient expression of homologous and heterologous genes in *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1989 Apr;30(4):343–50.
184. Bäumchen C, Roth AHFJ, Biedendieck R, Malten M, Follman M, Sahm H, Bringer-Meyer S, Jahn D. D-Mannitol production by resting state whole cell biotransformation of D-fructose by heterologous mannitol and formate dehydrogenase gene expression in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol J*. 2007;2(11):1408–16.
185. Burger S, Tatge H, Hofmann F, Genth H, Just I, Gerhard R. Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A using the *Bacillus megaterium* system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;307(3):584–8.
186. Korneli C, Bolten CJ, Godard T, Franco-Lara E, Wittmann C. Debottlenecking recombinant protein production in *Bacillus megaterium* under large-scale conditions-targeted precursor feeding designed from metabolomics. *Biotechnol Bioeng*. 2012 Jun;109(6):1538–50.
187. Knobloch D, Clemens A, Ostermann K, Rödel G. The *xylA* promoter of *Bacillus megaterium* mediates constitutive gene expression in *Escherichia coli*. *Eng Life Sci*. 2011;11(5):458–62.
188. Hartz P, Mattes C, Schad M, Bernhardt R, Hannemann F. Expanding the promoter toolbox of *Bacillus megaterium*. *J Biotechnol*. 2019 Mar;294:38–48.
189. Stammen S, Müller BK, Korneli C, Biedendieck R, Gamer M, Franco-Lara E, Jahn D. High-Yield Intra- and Extracellular Protein Production Using *Bacillus megaterium*. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Jun 15;76(12):4037–46.
190. Jones JA, Vernacchio VR, Lachance DM, Lebovich M, Fu L, Shirke AN, Schultz VL, Cress B, Linhardt RJ, Koffas MAG. ePathOptimize: A Combinatorial Approach for Transcriptional Balancing of Metabolic Pathways. *Sci Rep*. 2015 Sep 11;5(1):11301.
191. Ikeda RA, Ligman CM, Warshamana S. T7 promoter contacts essential for promoter activity in vivo. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(10):2517–24.
192. Lee AG. Lipid-protein interactions. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(3):761–6.
193. Jones S, Thornton JM. Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci*. 1996 Jan 9;93(1):13–20.
194. Villaverde A, Carrió MM. Protein aggregation in recombinant bacteria: Biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett*. 2003;25(17):1385–95.

195. Elleby B, Svensson S, Wu X, Stefansson K, Nilsson J, Hallén D, Oppermann U, Abrahmsén L. High-level production and optimization of monodispersity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2004;1700(2):199–207.
196. Lawson AJ, Walker EA, White SA, Dafforn TR, Stewart PM, Ride JP. Mutations of key hydrophobic surface residues of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 increase solubility and monodispersity in a bacterial expression system. *Protein Sci*. 2009 Jul;18(7):1552–63.
197. Collins KD, Neilson GW, Enderby JE. Ions in water: Characterizing the forces that control chemical processes and biological structure. *Biophys Chem*. 2007;128(2–3):95–104.
198. Dale GE, Broger C, Langen H, Arcy AD, Stüber D. Improving protein solubility through rationally designed amino acid replacements: Solubilization of the trimethoprim-resistant type s1 dihydrofolate reductase. *Protein Eng Des Sel*. 1994;7(7):933–9.
199. Hanukoglu I. Electron Transfer Proteins of Cytochrome P450 Systems. *Adv Mol Cell Biol*. 1996;14(C):29–56.
200. Munro AW, Girvan HM, McLean KJ. Cytochrome P450-redox partner fusion enzymes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2007;1770(3):345–59.
201. Page CC, Moser CC, Chen X, Dutton PL. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature*. 1999;402(6757):47–52.
202. Culka M, Milichovsky J, Jerabek P, Stiborova M, Martinek V. Ferrous and ferric state of cytochromes P450 in intact *Escherichia coli* cells: A possible role of cytochrome P450-flavodoxin interactions. *Neuroendocrinol Lett*. 2015;36(2015):29–37.
203. Munro AW, Leys DG, McLean KJ, Marshall KR, Ost TW., Daff S, Miles CS, Chapman SK, Lysek DA, Moser CC, Page CC, Dutton PL. P450 BM3: the very model of a modern flavocytochrome. *Trends Biochem Sci*. 2002 May;27(5):250–7.
204. Roiban GD, Reetz MT. Expanding the toolbox of organic chemists: Directed evolution of P450 monooxygenases as catalysts in regio- and stereoselective oxidative hydroxylation. *Chem Commun*. 2015;51(12):2208–24.
205. Wang C, Pallan PS, Zhang W, Lei L, Yoshimoto FK, Waterman MR, Egli M, Guengerich FP. Functional analysis of human cytochrome P450 21A2 variants involved in congenital adrenal hyperplasia. *J Biol Chem*. 2017 Jun 30;292(26):10767–78.
206. Bridges A, Gruenke L, Chang YT, Vakser IA, Loew G, Waskell L. Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem*. 1998;273(27):17036–49.
207. Zhang H, Im SC, Waskell L. Cytochrome b5 increases the rate of product formation by cytochrome P450 2B4 and competes with cytochrome P450 reductase for a binding site on cytochrome P450 2B4. *J Biol Chem*. 2007;282(41):29766–76.

208. Zhang H, Hamdane D, Im S-C, Waskell L. Cytochrome b5 Inhibits Electron Transfer from NADPH-Cytochrome P450 Reductase to Ferric Cytochrome P450 2B4. *J Biol Chem.* 2008 Feb 29;283(9):5217–25.
209. Bart AG, Scott EE. Structural and functional effects of cytochrome b 5 interactions with human cytochrome P450 enzymes. *J Biol Chem.* 2017 Dec 22;292(51):20818–33.
210. Geller DH, Auchus RJ, Miller WL. P450c17 mutations R347H and R358Q selectively disrupt 17,20-lyase activity by disrupting interactions with P450 oxidoreductase and cytochrome b5. *Mol Endocrinol.* 1999;13(1):167–75.
211. Noshiro M, Ullrich V, Omura T. Cytochrome b5 as Electron Donor for Oxy-cytochrome P-450. *Eur J Biochem.* 1981 Jun;116(3):521–6.
212. Schenkman JB, Voznesensky AI, Jansson I. Influence of Ionic Strength on the P450 Monooxygenase Reaction and Role of Cytochrome b5 in the Process. *Arch Biochem Biophys.* 1994 Oct;314(1):234–41.
213. Bonfils C, Balny C, Maurel P. Direct evidence for electron transfer from ferrous cytochrome b5 to the oxyferrous intermediate of liver microsomal cytochrome P-450 LM2. *J Biol Chem.* 1981 Sep 25;256(18):9457–65.
214. Hildebrandt A, Estabrook R. Evidence for the participation of cytochrome b5 in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Arch Biochem Biophys.* 1971;143(1):66–79.
215. Ingelman-Sundberg, M., & Johansson I. Cytochrome b5 as electron donor to rabbit liver cytochrome P-450LM2 in reconstituted phospholipid vesicles. *Biochem Biophys Res Commun.* 1980;97(2):582–589.
216. Pompon D, Coon MJ. On the mechanism of action of cytochrome P-450. Oxidation and reduction of the ferrous dioxygen complex of liver microsomal cytochrome P-450 by cytochrome b5. *J Biol Chem.* 1984 Dec 25;259(24):15377–85.
217. Imai Y, Sato R. The roles of cytochrome b5 in a reconstituted N-demethylase system containing cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977 Mar;75(2):420–6.
218. Gorsky LD, Koop DR, Coon MJ. On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of oxygen reduction. *J Biol Chem.* 1984 Jun 10;259(11):6812–7.
219. Perret A, Pompon D. Electron Shuttle between Membrane-Bound Cytochrome P450 3A4 and b 5 Rules Uncoupling Mechanisms. *Biochemistry.* 1998;37(33):11412–24.
220. Guengerich F, Ballou D, Coon M. Spectral intermediates in the reaction of oxygen with purified liver microsomal cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976;70(3):951–6.
221. Hlavica P. On the function of cytochrome b5 in the cytochrome P-450-dependent oxygenase system. *Arch Biochem Biophys.* 1984 Feb;228(2):600–8.

-
222. Loughran PA, Roman LJ, Miller RT, Masters BSS. The Kinetic and Spectral Characterization of the *E. coli*-Expressed Mammalian CYP4A7: Cytochrome b5 Effects Vary with Substrate. *Arch Biochem Biophys*. 2001 Jan;385(2):311–21.
223. Shao N, Krieger-Liszkay A, Schroda M, Beck CF. A reporter system for the individual detection of hydrogen peroxide and singlet oxygen: its use for the assay of reactive oxygen species produced in vivo. *Plant J*. 2007 Mar 21;50(3):475–87.
224. Fuhrer T, Sauer U. Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *J Bacteriol*. 2009;191(7):2112–21.
225. Machielsen R, Looger LL, Raedts J, Dijkhuizen S, Hummel W, Henneman HG, Dausmann T, van der Oost J. Cofactor engineering of *Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase by computational design. *Eng Life Sci*. 2009;9(1):38–44.
226. Schlieben NH, Niefind K, Müller J, Riebel B, Hummel W, Schomburg D. Atomic resolution structures of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* provide the structural bases of its substrate and cosubstrate specificity. *J Mol Biol*. 2005;349(4):801–13.
227. Riebel BR, Gibbs PR, Wellborn WB, Bommarius AS. Cofactor Regeneration of both NAD⁺ from NADH and NADP⁺ from NADPH:NADH Oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Adv Synth Catal*. 2003;345(67):707–12.
228. Knight M, London J, Knight M. Coenzymes in Micro-Organisms. *J Gen Microbiol*. 1966;44(1966):241–54.
229. Dohr O, Paine MJI, Friedberg T, Roberts GCK, Wolf CR. Engineering of a functional human NADH-dependent cytochrome P450 system. *Proc Natl Acad Sci*. 2001 Jan 2;98(1):81–6.
230. Roth WG, Leckie MP, Dietzler DN. Osmotic stress drastically inhibits active transport of carbohydrates by *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985;126(1):434–41.
231. Janßen HJ, Steinbüchel A. Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnol Biofuels*. 2014;7(1):7.
232. Toomey E, Wakil J. Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. XVI. Preparation and general properties of acyl-malonyl acyl carrier protein-condensing enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1966;241(5):1159–65.
233. Zhang Y, Cronan JE. Transcriptional analysis of essential genes of the *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis gene cluster by functional replacement with the analogous *Salmonella typhimurium* gene cluster. *J Bacteriol*. 1998 Jul 1;180(13):3295–303.
234. Lai C, Cronan JE. Isolation and Characterization of β -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Reductase (*fabG*) Mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Isolation and Characterization of β -Ketoacyl – Acyl Carrier Protein Reductase (*fabG*) Mutants. *J Bacteriol*. 2004;186(6):1869.

235. Khmel'nitsky YL, Mozhaev V V., Belova AB, Sergeeva M V., Martinek K. Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. *Eur J Biochem.* 1991;198(1):31–41.
236. Anchordoguy T, Carpenter J, Crowe J, Crowe L. Temperature-dependent perturbation of phospholipid bilayers by dimethylsulfoxide. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1104(1):117–22.
237. Dyrda G, Boniewska-Bernacka E, Man D, Barchiewicz K, Słota R. The effect of organic solvents on selected microorganisms and model liposome membrane. *Mol Biol Rep.* 2019;46(3):3225–32.
238. Yoshiike T, Aikawa Y, Sindhvananda J, Suto H, Nishimura K, Kawamoto T, Ogawa H. Skin barrier defect in atopic dermatitis: increased permeability of the stratum corneum using dimethyl sulfoxide and theophylline. *J Dermatol Sci.* 1993 Apr;5(2):92–6.
239. Griebel R, Smith Z, Merrick JM. Metabolism of poly(β -hydroxybutyrate). I. Purification, composition, and properties of native poly(β -hydroxybutyrate) granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry.* 1968 Oct;7(10):3676–81.
240. McCool GJ, Fernandez T, Li N, Cannon MC. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiol Lett.* 1996 Apr;138(1):41–8.
241. Jendrossek D. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *J Bacteriol.* 2009;191(10):3195–202.
242. Kranz RG, Gabbert KK, Madigan MT. Positive selection systems for discovery of novel polyester biosynthesis genes based on fatty acid detoxification. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(8):3010–3.
243. Ansel HC, Norred WP, Roth IL. Antimicrobial activity of dimethyl sulfoxide against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus megaterium*. *J Pharm Sci.* 1969;58(7):836–9.
244. Babbs CF, Gale Steiner M. Detection and quantitation of hydroxyl radical using dimethyl sulfoxide as molecular probe. *Methods Enzymol.* 1990;186(C):137–47.
245. Klein SM, Cohen G, Cederbaum AI. Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical-generating systems. *Biochemistry.* 1981 Oct 13;20(21):6006–12.
246. Sanmartín-Suárez C, Soto-Otero R, Sánchez-Sellero I, Méndez-Álvarez E. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2011 Mar;63(2):209–15.
247. Morrison DC, Jacobs DM. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry.* 1976 Oct;13(10):813–8.
248. León R, Fernandes P, Pinheiro HM, Cabral JMS. Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb Technol.* 1998;23(7–8):483–500.
249. Julsing MK, Cornelissen S, Bühler B, Schmid A. Heme-iron oxygenases: powerful industrial

- biocatalysts? *Curr Opin Chem Biol.* 2008 Apr;12(2):177–86.
250. Zhao B, Lei L, Kagawa N, Sundaramoorthy M, Banerjee S, Nagy LD, Guengerich FP, Waterman MR. Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. *J Biol Chem.* 2012;287(13):10613–22.
251. Brixius-Anderko S. Biotechnological application of steroidogenic Cytochromes P450. Kumulative Dissertation. Saarbrücken; 2016. 128 p.
252. Fokina V V., Sukhodolskaya G V., Baskunov BP, Turchin KF, Grinenko GS, Donova M V. Microbial conversion of pregna-4,9(11)-diene-17 α ,21-diol-3,20-dione acetates by *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D. *Steroids.* 2003;68(5):415–21.
253. Armstrong EF. Enzymes. By JBS Haldane, MA Monographs on Biochemistry. Edited by RHA Plimmer, D. Sc., and Sir FG Hopkins, MA, MB, D. Sc., FRS Pp. vii+ 235. London: Longmans, Green & Co. *J Soc Chem Ind.* 1930;49(44):191–920.
254. Hill GA, Robinson CW. Substrate Inhibition Kinetics : Phenol Degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Bioeng.* 1975;17(11):1599–615.
255. Lin Y, Lu P, Tang C, Mei Q, Sandig G, Rodrigues AD, Rushmore TH, Shou M. Substrate inhibition kinetics for cytochrome P450-catalyzed reactions. *Drug Metab Dispos.* 2001;29(4 I):368–74.
256. Petschacher B, Staunig N, Müller M, Schürmann M, Mink D, De Wildeman S, Gruber K, Glieder A. Cofactor specificity engineering of *Streptococcus mutans* NADH oxidase 2 for nad(p)⁺ regeneration in biocatalytic oxidations. *Comput Struct Biotechnol J.* 2014;9(14):e201402005.
257. Ravikumar YVL, Sridhar S, Satyanarayana SV. Development of an electrodialysis–distillation integrated process for separation of hazardous sodium azide to recover valuable DMSO solvent from pharmaceutical effluent. *Sep Purif Technol.* 2013 Jun;110:20–30.
258. Bloom CA, Ashe CG, Ferguson JL, Gibbons JP, Otto KW, Rodger AM. Process and apparatus for making ultra-pure DMSO. Vol. 1. U.S.; US6414194B1, 2002.
259. Allegretti JE, Brunswick E, Midler JM. Continuous freezing process for purifying dimethyl sulfoxide. U.S.; US3358037A, 1967.
260. Heinzle E, Biwer A, Eissen M, Abdul Kholiq M. Bewertung biotechnologischer Prozesse in frühen Phasen der Entwicklung hinsichtlich Risiken bezüglich Ökologie, Sicherheit und Gesundheit. *Chemie Ing Tech.* 2006 Mar;78(3):301–5.
261. Yunxian Z, Chao L, Wei Y. Preparation method of cortisone. CN103304615B. 2015;
262. Li L, Liu X, Wei K, Lu Y, Jiang W. Synthetic biology approaches for chromosomal integration of genes and pathways in industrial microbial systems. *Biotechnol Adv.* 2019;37(5):730–45.
263. Tiwari R, Köffel R, Schneiter R. An acetylation/deacetylation cycle controls the export of sterols

- and steroids from *S. cerevisiae*. *EMBO J.* 2007;26(24):5109–19.
264. Kamrath C, Wettstaedt L, Boettcher C, Hartmann MF, Wudy SA. Androgen excess is due to elevated 11-oxygenated androgens in treated children with congenital adrenal hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018 Apr;178(Sept):221–8.
265. Wang GM, Ge RS, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP. Expression of 11 β -hydroxylase in rat Leydig cells. *Endocrinology.* 2002;143(2):621–6.
266. Goldzieher JW, Beering SC. Metabolism of 11 β -Hydroxyandrostenedione, Adrenosterone and Hydrocortisone to Urinary 11-Oxy 17-Ketosteroids 1. *J Clin Endocrinol Metab.* 1969 Feb;29(2):171–8.

6. Abkürzungsverzeichnis

11 β HSD1	11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1
AdR	Adrenodoxin Reduktase
Adx	Adrenodoxin
Ara	L-Arabinose
<i>B. megaterium</i>	Bacillus megaterium
bCPR	bovine NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase
<i>C. porcellus</i>	<i>Cavia porcellus</i> (Meerschweinchen)
CAM	Chloramphenicol
CAT1	Chloramphenicol acetyl transferase 1
cp11 β HSD1	<i>Cavia porcellus</i> 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1
Cyt b_5	Cytochrom b_5
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FdR	Ferredoxin Reduktase
Fdx	Ferredoxin
GC	Glucocorticoide
gdhA	NADP-Glutamat Dehydrogenase
GR	Glucocorticoid Rezeptor
<i>L. brevis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
LbADH	<i>Lactobacillus brevis</i> Alkoholdehydrogenase
MC	Mineralocorticoide
MR	Mineralocorticoid Rezeptor
NAD(P) ⁺ /H	Nicotinamidadeninukleotid(phosphat)
NaOAc	Natriumacetat
nGC	natürliche Glucocorticoide
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
P450	Cytochrom P450
P450red	Cytochrom P450 Reduktase
PHB	Polyhydroxybuttersäure
RhaB	Rhamnulokinase
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sac	Saccharose
SDR	short-chain Dehydrogenase/Reduktase
sGC	synthetische Glucocorticoide
SHE	Safety, Health, Environment (Sicherheit, Gesundheit, Umwelt)
VD	Vitamin D
Xyl	D-Xylose

