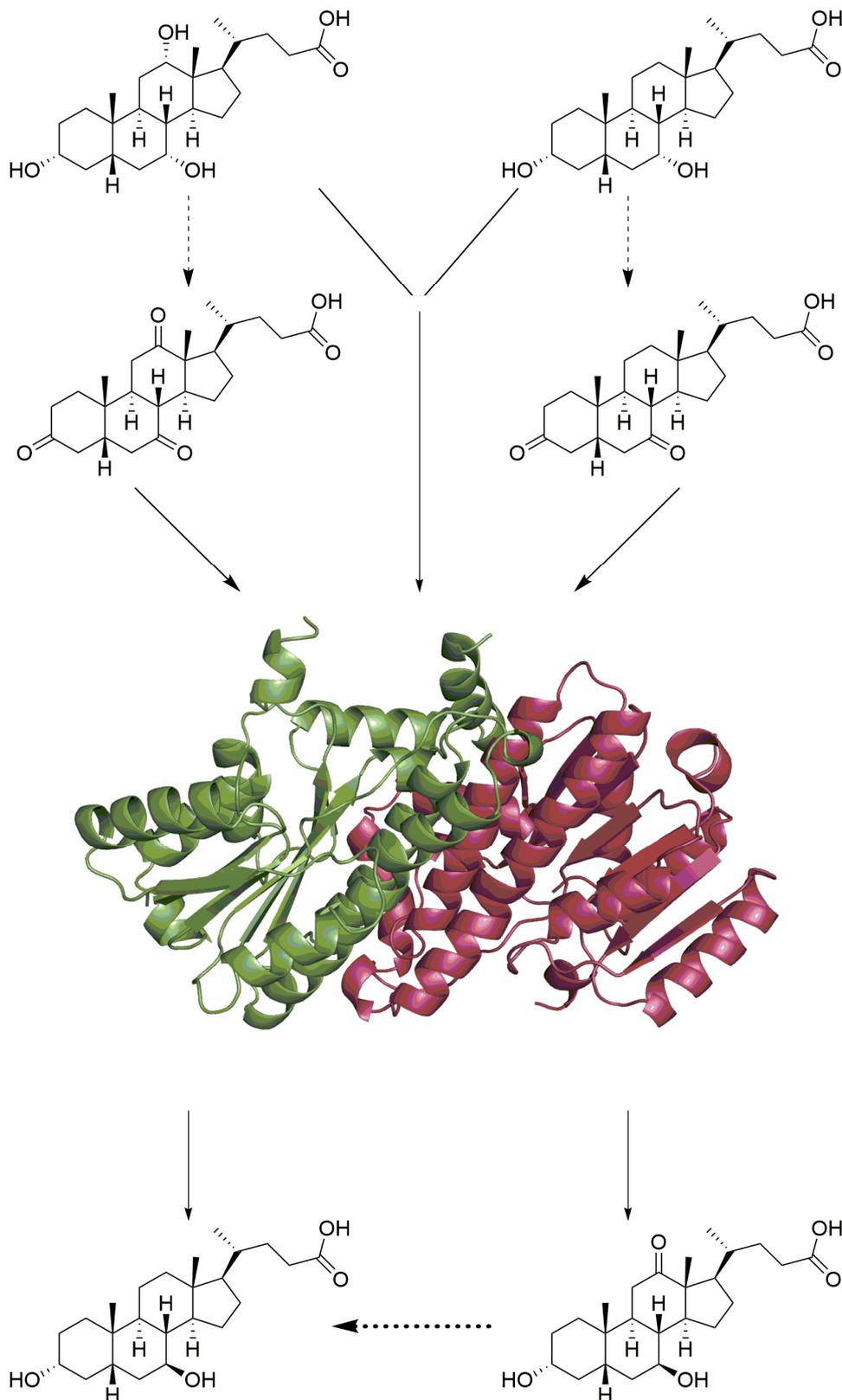


ENTWICKLUNG EINER ENZYMLATTFORM FÜR DIE BOKATALYTISCHE SYNTHESE VON GALLENSÄURE-DERIVATEN





**ENTWICKLUNG EINER ENZYMLATTFORM FÜR DIE
BIOKATALYTISCHE SYNTHESE VON GALLENÄURE-
DERIVATEN**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Karl Daniel Bakonyi
aus Köln

Köln, November 2016

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Werner Hummel
Korreferent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger

Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2010 bis September 2014 am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Prof. Dr. Werner Hummel durchgeführt.

Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) unterstützte Teile dieser Arbeit im Rahmen des Projektes „Biokatalytische Steroidreduktion“.

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Werner Hummel für die Überlassung des interessanten wissenschaftlichen Themas, die sehr guten Arbeitsbedingungen in seiner Arbeitsgruppe, sowie für sein stetiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Ebenso danke ich ihm für das Schaffen einer kreativen und freundschaftlichen Arbeitsatmosphäre.

Bei Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger möchte ich mich für die Zweitkorrektur meiner Doktorarbeit bedanken. Ausserdem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seinem Institut für Molekulare Enzymtechnologie unter hervorragenden Bedingungen durchführen zu können.

Der Firma PharmaZell GmbH, Raubling, danke ich für die Unterstützung, insbesondere Herrn Dr. Ralf Gross für die konstruktive Kooperation und das rege Interesse an meiner Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Karsten Niefind und Frau Dipl.-Biol. Dipl.-Phys. Christine Tölzer (Universität zu Köln) für die hervorragende Kooperation sowie stete Diskussionsbereitschaft im Zusammenhang der erfolgreichen Strukturaufklärung meiner Enzyme.

Dr. Filip Kovacic gilt mein Dank für wertvolle Korrektur-Hinweise zu meiner Dissertation und die immer offene Tür, um meine penetranten Fragen zu beantworten.

Frau Dipl.-Ing. (FH) Astrid Wirtz danke ich für ihre Geduld und ihre wertvolle Hilfe bei sämtlichen Fragen zur Bedienung sowie dem Arbeiten an der HPLC.

Bei den Experimenten haben zahlreiche Studenten geholfen, ein besonderer Dank geht aber an meine ehemalige Bachelor-Studentin Simone Rath.

Weiterhin möchte ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern des IMETs und bisher nicht genannten Kollegen und Freunden für ihre Unterstützung danken, die das Gelingen dieser Arbeit erst möglich gemacht hat. Danken möchte ich auch meinen ehemaligen Laborkollegen Dipl.-Biol. Till Winkler, Dr. Carsten Lanzerath, Dipl.-Ing. (FH) Thorsten Rosenbaum und M.Sc. Lukas Muschallik für die sehr unterhaltsame Zeit, das heitere Arbeitsklima sowie die unzähligen Kaffeepausen. Vor allem möchte ich mich bei Frau M.Sc. Dalia Bulut für die Unterstützung bedanken, die mir in all der Zeit wie eine kleine Schwester ans Herz gewachsen ist.

Meinen Teamkollegen (Sebastian Pepper, Stephan Behrens, Kris Stille, Benjamin Güth, Martin Stöckle und Florian Wietz) vom Niendorfer MC gilt mein Dank, die beizeiten immer wieder für erforderliche Abwechslungen sorgten.

Bei meinen Cousins Christian, Martin und Andreas Röhm bedanke ich mich für ihre fortwährende Unterstützung.

Ebenfalls danke ich meinem Bruder André Bakonyi, seiner Lebensgefährtin Marlies Meyer sowie Jorghino da Silva für die Unterstützung des regelmäßigen Sporttreibens während meiner Promotionszeit.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer nach allen Möglichkeiten unterstützt haben und für ihre Geduld, die sie mit mir hatten.

Der Inhalt der vorliegenden Arbeit wurde bereits teilweise in Form von Publikationen oder Patenten zusammengefasst:

Publikationen:

- **D. Bakonyi**, W. Hummel (2017). Cloning, expression, and biochemical characterization of a novel NADP⁺-dependent 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Clostridium difficile* and its application for the oxidation of bile acid. *Enzyme Microb. Technol.* 99, 16-24
- Eggert, T., **Bakonyi, D.**, and Hummel, W. (2014) Enzymatic routes for the synthesis of ursodeoxycholic acid. *J. Biotechnol.* 191, 11–21.
- **Bakonyi, D.**, Wirtz, A., and Hummel, W. (2012) Large-scale Enzymatic Synthesis of 12-Ketoursodeoxycholic Acid from Dehydrocholic Acid by Simultaneous Combination of 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni* and 7 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Collinsella aerofaciens*. *Z. Naturforsch., B Chem. Sci* 67b, 1037–1044.

Patente:

- Neuartiger Ganzzellbiokatalysator zur enzymatischen Herstellung von Ursodesoxycholsäure (EP-Nr.: 1685074.8)
- Novel enzyme mutants and application in a coupled, self-sufficient biotransformation of chenodeoxycholic acid to ursodeoxycholic acid (Patent in Bearbeitung)
- Chemoenzymatic syntheses of ursodeoxycholic acid outgoing from chenodeoxycholic acid (EP-Nr.: 16175318.1)
- 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Mutanten und Verfahren zur Herstellung von Ursodesoxycholsäure (PCT/EP2015/068514; WO2016023933 A1)
- 7 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Mutanten und Verfahren zur Herstellung von Ursodesoxycholsäure (PCT/EP2015/067212; WO2016016213)
- Novel 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase mutants and process for the preparation of ursodeoxycholic acid (PCT/EP2011/073141 and US application Ser. No. 13/993,235)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG	1
1. Weiße Biotechnologie	1
1.1. Biokatalyse & Pharmarelevanz	1
1.2. Oxidoreduktasen	3
1.2.1. Alkohol-Dehydrogenasen	3
1.2.2. Hydroxysteroid-Dehydrogenasen	4
1.2.2.1. 3 α -HSDH aus <i>Comamonas testosteroni</i>	6
1.2.2.2. 7 α -HSDH aus <i>E. coli</i>	7
1.2.2.3. 7 β -HSDH aus <i>Collinsella aerofaciens</i>	8
1.3. Protein Engineering	8
1.3.1. Rationales Design	9
1.3.2. Gerichtete Evolution	10
1.4. Cofaktorregenerierung	11
1.5. Steroide	14
1.5.1. Struktur	14
1.5.2. Gallensäuren	16
1.5.3. Mikrobielle Umwandlung von Gallensäuren	17
1.5.4. Gallensteine und deren Behandlung	18
1.5.5. Ursodesoxycholsäure	20
1.5.6. Chemische Synthese	20
1.5.7. Enzym-katalysierte Synthesen von Ursodesoxycholsäure	21
2. Aufgabenstellung	27
II. MATERIAL & METHODEN	31
3. Materialien	31
3.1. Allgemeines Material	31
3.1.1. Mikroorganismen und Vektoren	31
3.2. Geräte	34
4. Methoden	35
4.1. Mikrobiologische Methoden	35
4.1.1. Anzucht und Medien von Stämmen	35
4.1.2. Expression der Gene	36
4.1.3. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> im 15 L Rührkessel	37
4.1.4. Konservierung der Bakterienstämme	38
4.2. Biochemische Methoden	38
4.2.1. Gewinnung von Rohextrakt	38
4.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford	39
4.2.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
4.2.4. Coomassie-Färbung von Proteinen	40
4.2.5. Bestimmung der Enzymaktivitäten	40
4.2.6. Proteinaufreinigung	42
4.2.6.1. Mittels Histidin-Fusionsproteinen	42
4.2.6.2. Chromatographische Reinigung	43

Inhaltsverzeichnis

4.2.7.	Entsalzen und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	43
4.2.8.	Bestimmung von K_M und v_{max}	43
4.2.9.	Thermal-shift-assay (Thermofluor)	44
4.3.	Molekularbiologische Methoden	45
4.3.1.	Isolation von genomischer DNA	45
4.3.2.	Polymerasekettenreaktion	45
4.3.3.	Kolonie-Polymerasekettenreaktion	46
4.3.4.	Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese	47
4.3.5.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	47
4.3.6.	In-vitro Rekombination von DNA	47
4.3.7.	Positionsgerechte Mutagenese	48
4.3.8.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	49
4.3.9.	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	49
4.3.10.	Präparation von Plasmid DNA	49
4.3.11.	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	50
4.3.12.	Sequenzierung von Plasmid DNA	50
4.4.	Chemische Alkoholoxidation	50
4.4.1.	SWERN-Oxidation	50
4.4.2.	Natriumhypochlorit-Oxidation	51
4.5.	Enzymatische Synthesen	51
4.5.1.	Durchführung von Biotransformation mit isolierten Enzymen	51
4.5.2.	Durchführung von Biotransformation mit ganzen Zellen	52
4.6.	Analytische Methoden	53
4.6.1.	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	53
4.6.2.	Probenvorbereitung für HPLC	55
4.6.3.	Kalibrierung der HPLC	55
4.7.	Computerprogramme und online Datenbanken	56
III.	ERGEBNISSE	57
5.	Biochemische Charakterisierung der Hydroxysteroid-Dehydrogenasen	59
5.1.	7β -HSDH aus <i>C. aerofaciens</i>	59
5.1.1.	Strukturaufklärung der 7β -HSDH aus <i>C. aerofaciens</i>	62
5.1.1.1.	Kristallisation der 7β -HSDH aus <i>C. aerofaciens</i>	62
5.1.2.	Mutanten mit verbesserter Aktivität	64
5.1.2.1.	Mutagenese der Position 17	64
5.1.2.2.	Mutagenese der Position 39	65
5.1.2.3.	Sättigungsmutagenese der Position 64	67
5.1.2.4.	Kombination der Mutagenesepositionen	70
5.1.3.	Änderung der Cofaktorspezifität	73
5.2.	3α -HSDH	78
5.2.1.	Biochemische Charakterisierung des Wildtyp	78
5.2.2.	Einfluss des His-Tags	86
5.2.2.1.	Biochemische Untersuchung	86
5.2.2.2.	Thermoflourscreen	88
5.2.3.	Mutanten mit verbesserter Aktivität	90
5.2.3.1.	Mutagenese der Position 34	91
5.2.3.2.	Mutagenese der Position 68	92
5.2.3.3.	Mutagenese der Position 188	95

Inhaltsverzeichnis

5.2.3.4.	Kombination der Mutagenesepositionen	97
5.3.	7 α -HSDH aus <i>E. coli</i>	98
5.3.1.	Bestimmung von v_{\max} und K_M	98
5.3.2.	Änderung der Cofaktorspezifität	101
5.4.	7 α -HSDH aus <i>Clostridium difficile</i>	104
5.4.1.	Identifizierung einer NADP ⁺ -abhängigen 7 α -HSDH	104
5.4.2.	Klonierung, heterologe Expression und Enzymaktivität der Cd7 α -HSDH	107
5.4.3.	Testumsetzung mit Cd7 α -HSDH	108
5.4.4.	Bestimmung der kinetischen Daten K_M und v_{\max}	109
5.4.5.	Änderung der Cofaktorspezifität	111
5.4.5.1.	Bestimmung von K_M und v_{\max} der NAD ⁺ -abhängigen Mutante	113
5.4.6.	Steigerung der Aktivität	115
6.	Entwicklung der Cofaktorregenerierung	116
7.	Biotransformation von DHCA zu 12-Keto-UDCA	118
7.1.	Expression der 7 β -HSDH, 3 α -HSDH und Glucose-Dehydrogenase	118
7.2.	Synthese von 12-Keto-UDCA mit isolierten Enzymen	119
7.2.1.	Synthese mit Wildtypenzymen	120
7.2.2.	Synthese mit einer NAD ⁺ -abhängigen 7 β -HSDH	121
7.2.3.	Synthese mit den Mutanten der 3 α - und der 7 β -HSDH in Kombination	122
7.3.	Synthese von 12-Keto-UDCA mit Ganzzellbiokatalysatoren	123
7.3.1.	Vektorkonstrukte	124
7.3.2.	Ganzzellbiokatalysatoren mit Wildtypenzymen	125
7.3.3.	Charakterisierung der Ganzzellbiokatalysatoren	127
7.3.4.	Optimierung der Cofaktorkonzentration	130
7.3.5.	Large-scale Ganzzellbiotransformation von 12-Keto-UDCA	133
7.3.6.	Ganzzellbiokatalysatoren mit Mutanten	135
8.	Biotransformation von CA zu 12-Keto-UDCA	136
9.	Biotransformation von CDCA zu UDCA	138
9.1.	Synthese von UDCA aus CDCA in einem zweistufigen Reaktionsprinzip	138
9.1.1.	Zweistufige Synthese von UDCA aus CDCA mittels isolierten Enzymen	139
9.1.2.	Zweistufige Synthese von UDCA aus CDCA mittels Ganzzellbiokatalysator	141
9.1.2.1.	Vektorkonstrukte	141
9.1.2.2.	Biotransformation mit Ganzzellbiokatalysatoren	142
9.2.	Synthese von UDCA aus CDCA in einem einstufigen Reaktionsprinzip	146
9.2.1.	Einstufige Synthese von UDCA aus CDCA mittels isolierten Enzymen	148
9.2.2.	Einstufige Synthese von UDCA aus CDCA mittels Ganzzellbiokatalysator	150
9.3.	Chemoenzymatische Synthese von UDCA ausgehend von CDCA	152
9.3.1.	SWERN-Oxidation von CDCA	153
9.3.2.	Chemische Oxidation mittels Natriumbisulfat	154
9.3.3.	Kinetische Charakterisierung der Hydroxysteroid-Dehydrogenasen	155
9.3.4.	Enzymatische Synthese von UDCA ausgehend von 3,7-Diketo-UDCA	157
9.3.4.1.	Mit isolierten Enzymen	158
9.3.4.2.	Mittels Ganzzellbiokatalysatoren	158
IV.	DISKUSSION	161

Inhaltsverzeichnis

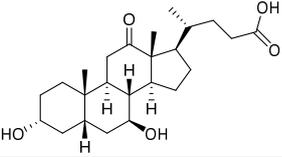
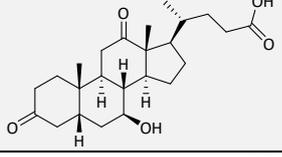
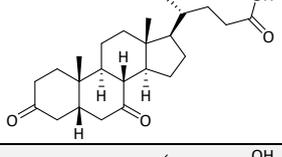
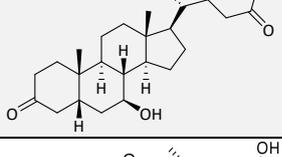
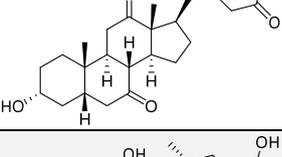
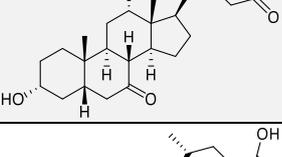
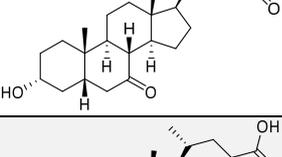
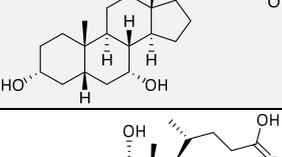
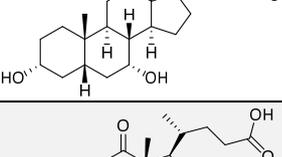
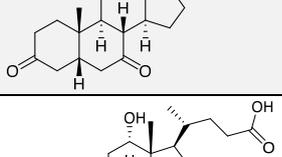
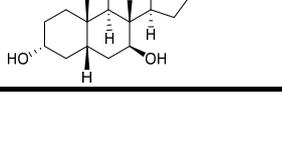
10.	Der „Enzym-Baukasten“ - Charakterisierung der Wildtypenzyme	162
10.1.	NAD ⁺ -abhängige 3 α -HSDH aus <i>C. testosteroni</i>	163
10.2.	NADP ⁺ -abhängige 7 β -HSDH aus <i>C. aerofaciens</i>	165
10.3.	NAD ⁺ -abhängige 7 α -HSDH aus <i>E. coli</i>	165
10.4.	NADP ⁺ -abhängige 7 α -HSDH aus <i>C. difficile</i>	166
11.	Inhibierung und ihre Funktion	166
12.	Änderung der Cofaktorspezifität	168
13.	Optimierung der Enzyme	171
13.1.	7 β -HSDH	171
13.2.	3 α -HSDH	175
13.3.	Einfluss des His-Tags	176
13.4.	Optimierung durch Mutagenese	178
14.	Vor- und Nachteile von Biotransformationen mit isolierten Enzymen sowie Ganzzellbiokatalysatoren	181
15.	Bewertung der entwickelten Syntheserouten	183
15.1.	Bewertung der chemoenzymatischen Syntheseroute ausgehend von Dehydrocholsäure	183
15.2.	Bewertung der enzymatischen Syntheseroute aus Cholsäure	188
15.3.	Bewertung der Syntheseroute ausgehend von CDCA	191
15.3.1.	Enzymatische Synthese	192
15.3.2.	Chemoenzymatische Synthese	197
V.	ZUSAMMENFASSUNG	201
VI.	SUMMARY	204
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	207
VIII.	ANHANG	221
16.	Oligonukleotide	221
17.	SDS-Gele	225
18.	Sequenzen der Dehydrogenasen	230
19.	Eidesstaatliche Erklärung	238

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

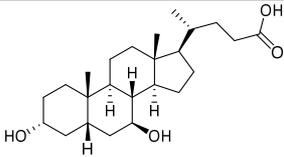
ADH	Alkohol-Dehydrogenase(n)
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
bp, bps	Basenpaare
BFM	Biofeuchtmasse
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
Cam	Chloramphenicol
Carb	Carbenicillin
Da	Dalton
DSMO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GDH	Glucose-Dehydrogenase
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography)
HSDHs	Hydroxysteroid-Dehydrogenase(n)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
K_i	Inhibierungskonstante
K_M	Michaelis-Menten konstante
k_{cat}	katalytische Produktivität
k_{cat}/K_M	katalytische Effizienz
KPi	Kaliumphosphat (inorganic)
LB	Luria-Bertani (Nähmedium)
MCS	multiple cloning sites
MeOH	Methanol
$NAD^+/NADH$	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiert/reduziert)
$NADP^+/NADPH$	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (oxidiert/reduziert)
NOX	NAD(P)H-Oxidase
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm
ori	Origin, Replikations-Startpunkt
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasenkettenreaktion
QC-PCR	QuikChange™-PCR
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit
RP	Umkehrphase
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDR	Short Chain Dehydrogenase(n)/Reduktase(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
VK	Vorkultur
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Übersicht der Gallensäuren

Trivialname	Abkürzung	IUPAC-Name	Struktur
12-Keto-ursodesoxycholsäure	12-Keto-UDCA	3 α ,7 β -Dihydroxy-12-keto-5 β - Cholansäure	
3,12-Diketo-ursodesoxycholsäure	3,12-Diketo-UDCA	7 β -Hydroxy-3,12-Diketo-5 β - Cholansäure	
3,7-Diketo-ursodesoxycholsäure	3,7-Diketo-UDCA	3,7-Diketo-5 β - Cholansäure	
3-Keto-ursodesoxycholsäure	3-Keto-UDCA	7 β -Hydroxy-3-keto-5 β - Cholansäure	
7,12-Diketo-ursodesoxycholsäure	7,12-Diketo-UDCA	3 α -Hydroxy-7,12-Diketo-5 β - Cholansäure	
7-Ketocholsäure	7-Keto-CA	3 α ,12 α -Dihydroxy-7-Keto-5 β - Cholansäure	
7-Ketolithocholsäure	7-KLCA	3 α -Hydroxy-7-keto-5 β - Cholansäure	
Chenodesoxycholsäure	CDCA	3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β - Cholansäure	
Cholsäure	CA	3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β - Cholansäure	
Dehydrocholsäure	DHCA	3,7,12-Triketo-5 β - Cholansäure	
Ursocholsäure (7-Epicholsäure)	UCA	3 α ,7 β ,12 α -Trihydroxy-5 β - Cholansäure	

Übersicht der Gallensäuren

Fortsetzung der Tabelle

Trivialname	Abkürzung	IUPAC-Name	Struktur
Ursodesoxycholsäure	UDCA	3 α ,7 β -Dihydroxy-5 β -Cholansäure	

I. Einleitung

1. Weiße Biotechnologie

Die Weiße Biotechnologie ist definitionsgemäß die „Anwendung biologischer Methoden auf industrielle Produktionsverfahren“ (Sijbesma and Schepens, 2003). Die Industrie nutzt die Weiße Biotechnologie mittels Enzymen oder Mikroorganismen, um in unterschiedlichen Bereichen wie der Chemie, der Lebens- und Futtermittelindustrie, der Zellstoff- und Papierherstellung oder auch der Herstellung von Textilien oder Reinigungsmitteln Produkte bzw. Wirkstoffe mit verbesserten Eigenschaften zu erzeugen (Lorenz and Zinke, 2005).

Die chemische Industrie in Europa, die mit Stand 2005 ca. 28 % der Nachfrage an Chemikalien der Welt deckt, hat in den letzten Jahren die industrielle Biotechnologie als Schlüsseltechnologie erkannt (Lorenz and Zinke, 2005). Man ist dabei der Ansicht, dass die Biotechnologie im industriellen Maßstab intelligente und praktikable Lösungsansätze in Bezug auf globale Probleme wie schwindende Erdöl- und Energiereserven beitragen kann. Somit ist es auch möglich, die Wirtschaft und Gesellschaft in eine nachhaltige, sichere und umweltfreundlichere Zukunft zu führen (Herrera, 2004).

1.1. Biokatalyse & Pharmarelevanz

Enzyme sind Biokatalysatoren, die bereits in geringen Mengen chemische Reaktionen um den Faktor von 10^8 bis 10^{10} beschleunigen können, teilweise werden Reaktionen durch Enzyme überhaupt erst ermöglicht. Dabei werden die Enzyme, der Definition eines Katalysators entsprechend, selbst nicht verbraucht. Die katalytische Aktivität eines Enzyms ist eine Funktion von Parametern wie Temperatur, Substratkonzentration, Inhibitoren und pH-Wert. Wie alle Katalysatoren liegt das Enzym nach der vollständig abgelaufenen Reaktion wieder in seiner Ausgangsform vor. Das Gleichgewicht einer solchen Reaktion wird durch das Enzym nicht verändert, wohl aber die Geschwindigkeit, mit der es sich einstellt. Die katalytische Wirksamkeit eines Enzyms beruht auf seiner Fähigkeit, die Aktivierungsenergie einer chemischen Reaktion zu senken, ohne dabei das thermodynamische Gleichgewicht zu beeinflussen. Enzyme spielen die zentrale Rolle im Stoffwechsel aller lebenden Organismen, praktisch jeder einzelne Stoffwechselfvorgang wird von einem speziell für diese Reaktion angepassten Enzym durchgeführt.

Wie bereits erwähnt, kann man die Biokatalysatoren aus ihrer zellulären Umgebung herauslösen und in einer Vielzahl technischer Prozesse einsetzen. Dabei werden sie sowohl in isolierter Form als auch

Einleitung

als Ganzzell-System eingesetzt. Bei der Verwendung von ganzen Zellen als Biokatalysator wird zwischen zwei verschiedenen Verfahrensweisen unterschieden: Fermentation und mikrobielle Transformation. In Prozessen, die fermentativ durchgeführt werden, befinden sich die Zellen im Wachstum und produzieren das gewünschte Produkt mittels ihres Stoffwechsels aus zumeist preisgünstigen Kohlenstoffquellen. Die mikrobielle Transformation ist ein Prozess, bei dem die Zelle ruht, also nicht wächst, wobei das Produkt hier direkt aus einem strukturähnlichen Substrat in wenigen Schritten, häufig nur in einem, gebildet wird. Mikrobielle Transformationen besitzen im Gegensatz zur Fermentation den Vorteil, dass Zellwachstum und Transformation voneinander getrennt sind. Auf diese Weise ist es möglich, dass beide Prozesse voneinander unabhängig durchgeführt und optimiert werden können. Oft können die biotechnologischen Verfahren Vorteile gegenüber der chemischen Synthese aufweisen. Die klassischen chemischen Syntheseverfahren benötigen häufig extreme Bedingungen in Hinsicht auf Druck und Temperatur, sowie den Einsatz von problematischen Katalysatoren und Reagenzien. Weiterhin sind chemische Prozesse oft mit der Produktion von ungewollten Nebenprodukten sowie umweltschädlichen Abfällen verbunden. Vorteile von Enzymen als Biokatalysatoren sind neben der hohen Stereoselektivität deren oft hohe katalytische Aktivität, Regioselektivität und Substratspezifität. Enzyme arbeiten umweltfreundlich in wässrigem Milieu unter milden Reaktionsbedingungen, häufig ohne dass dabei Nebenprodukte entstehen (Bommarius and Riebel, 2004; Bornscheuer et al., 2012; Drauz et al., 2012).

So kann beispielsweise 6-Aminopenicillansäure (6-APA), die Vorstufe semi-synthetischer Penicilline, enzymatisch bedeutend umweltschonender und kostengünstiger hergestellt werden als durch einen chemischen Schritt. 6-APA wird aus Penicillin G in einem chemischen dreistufigen Verfahren hergestellt, das viel Energie benötigt sowie Chemikalien wie beispielsweise Phosphorpentachlorid, Dichlormethan und Ammoniak. Penicillin-Amidase ist ein Enzym, das als Biokatalysator in einem 1-Schritt-Verfahren zur Produktion von 6-APA eingesetzt wird, wodurch Energie und Chemikalien eingespart werden (Biber and Heinzle, 2004).

Allerdings gibt es auch eine Limitierung beim Einsatz von Biokatalysatoren, wie z.B. unzureichende Aktivität oder Stabilität, mangelnde Selektivität oder auch die Abhängigkeit von teuren Cofaktoren. Zur Entwicklung oder Optimierung solcher biotechnologischer Prozesse werden Biokatalysatoren durch molekularbiologische Methoden hinsichtlich verschiedener Eigenschaften verbessert. So wird zum Beispiel eine starke Aktivität und Stabilität, hohe Selektivität und eine Unabhängigkeit von teuren Cofaktoren angestrebt. Verschiedene Enzymklassen, wie z. B. die Oxidoreduktasen, stehen dabei besonders im Vordergrund.

1.2. Oxidoreduktasen

1.2.1. Alkohol-Dehydrogenasen

Bei der stereospezifischen Reduktion von prochiralen Ketonen zu den korrespondierenden chiralen Alkoholen benötigen Alkohol-Dehydrogenasen (ADHs) einen Cofaktor, der den Transfer des Wasserstoffs gewährleistet. Dieser Cofaktor ist in den meisten Fällen ein Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid(-Phosphat) (NAD(P⁺)), seltener ein Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) oder Flavin-Mononucleotid (FMN) oder ein chinoider Cofaktor. ADHs gehören zur Gruppe der Oxidoreduktasen und ihre Klassifizierung der *Enzyme Commission* mit der (EC)-Nummierung 1.1.1.x deutet auf ihren Stellenwert in der Enzymologie hin. Der grundlegende Reaktionsmechanismus der ADH wurde in den 70er Jahren des vorigen Jahrhunderts anhand des „Modell-Enzyms“ aus der Pferde-Leber (HL-ADH) mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Jede Untereinheit besitzt eine Cofaktor- und eine Substrat-Bindestelle. Der Cofaktor wird dabei in einem klassischen *Rossmann fold* gebunden und durch die induzierte Konformationsänderung bildet sich eine hydrophobe Tasche, in der das Substrat mit seiner Keto- oder Hydroxylgruppe in Richtung des Zink-Ions ausgerichtet ist. Durch diese Polarisierung wird der stereospezifische Transfer des Wasserstoffs zwischen Substrat und Cofaktor ermöglicht (Eklund et al., 1976; Pettersson, 1987). Anfänglich wurden diese Strukturen bzw. Motive in Laktat-, Alkohol-, Malat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase beschrieben. Basierend auf den unterschiedlichen Sequenzmotiven, Proteinkettenlängen, mechanistischen Merkmalen und Strukturvergleichen konnte ein System von kurz-, mittel- und langkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR; MDR; LDR) etabliert werden. Weiterhin wurde die Gruppe der Aldo-Keto Reduktasen (AKR) mit in die Klassifizierung aufgenommen. In Tabelle 1 sind die Charakteristika der jeweiligen Oxidoreduktase aufgeführt.

Tabelle 1: Struktureigenschaften und Beispiele für Enzyme der wichtigsten Superfamilien der Alkohol-Dehydrogenasen. Die LDRs wurden nicht mit in die Tabelle aufgenommen, da zu wenige bekannt bzw. strukturell aufgeklärt wurden. UE = Untereinheit; SDR = short-chain Dehydrogenase/Reduktase; MDR = medium-chain Dehydrogenase/Reduktase; AKR = Aldo-Keto/Reduktase; X = jegliche proteinogene Aminosäure; HSDH = Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

	<i>SDR</i>	<i>MDR</i>	<i>AKR</i>
Aminosäuren pro UE	ca. 250	ca. 350	325
Quartärstruktur	Di- oder Tetramer	Di- oder Tetramer	Monomer
Cofaktor-Bindemotiv	<i>Rossmann fold</i>	<i>Rossmann fold</i>	kein <i>Rossmann fold</i>
Katalytisches Zentrum	(S-X ₁₂ -Y-X ₃ -K) ^{a)}		(D-X ₄ -Y-X ₂₉ -K-X ₃₃ -H) ^{b)}
Metallabhängigkeit	selten (Mg ²⁺)	häufig (Zn ²⁺)	
Beispiel-Enzym	7α-HSDH aus <i>E. coli</i>	(S)-ADH aus <i>Rhodococcus erythropolis</i>	3α-HSDH aus <i>Rattus</i>

a) = nach (Tanabe et al., 1998)

b) = nach (Pawlowski et al., 1991)

Einleitung

1.2.2. Hydroxysteroid-Dehydrogenasen

Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDHs) gehören zur Gruppe der Alkohol-Dehydrogenasen und benötigen ebenfalls Nicotinamid-Cofaktoren. Da sie eine Untergruppe der Oxidoreduktasen bilden, ist ihre EC-Klassifizierung derjenigen der ADHs ähnlich und lautet: EC 1.1.1.X. Ein charakteristisches Merkmal der HSDHs ist unter anderem das Glycin-Motiv ((A)G-X-X-X-G-X-G) im *Rossmann fold* (Filling et al., 2002; Jörnvall et al., 1999, 1981). Des Weiteren befindet sich 18 bis 20 Aminosäuren (AS) downstream des Glycin-Motivs die AS, die für die Cofaktorspezifität verantwortlich ist. Im Fall der NAD(H)-abhängigen Enzyme befindet sich hier ein polarer bis negativ geladener Abschnitt, im Fall von NADP(H)-abhängigen ein positiv geladener Abschnitt.

Ein weiteres Merkmal (der mikrobiellen HSDHs) ist das katalytische Zentrum (**S-X₁₂-Y-X₃-K**) (Persson et al., 2009; Tanabe et al., 1998; Tanaka et al., 2001, 1996), das typisch für SDR-Enzyme ist (siehe Tabelle 1). Filling *et al.* erweiterte die katalytische Triade um ein Asparagin, welches zusammen mit dem Lysinrest bei der Protonenübertragung beteiligt ist und so die Wiederherstellung des Cofaktors unterstützt (Filling et al., 2002). Die eingesetzte 3 α -HSDH aus *C. testosteroni* hingegen weicht etwas von dem typischen aktiven Zentrum ab, die Anzahl an Aminosäuren zwischen dem katalytisch aktiven Serin und dem Tyrosin beträgt X₄₁ und nicht wie beschrieben 12 (Hwang et al., 2005).

Der Reaktionsmechanismus der HSDHs entspricht im Wesentlichen dem von ADHs. Am Beispiel der 7 α -HSDH aus *E. coli* konnten Tanaka et al. (1996) mittels Kristallstruktur und gerichteter Mutagenese der Aminosäure im aktiven Zentrum den katalytischen Mechanismus aufklären (siehe Abbildung 1). Nach Bindung des Cofaktors und dem Substrat (Chenodesoxycholsäure), welche eine Konformationsänderung im C-terminalen Bereich des Proteins bewirkt, geht die phenolische Gruppe des Tyr159 eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxylgruppe des Steroidgerüsts am C₇-Atom ein. Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ser146 und dem Steroidgerüst stabilisiert nun das Zwischenprodukt. Im zweiten Schritt wirkt die Seitenkette des Tyrosins als katalytische Base, welches ein Wasserstoffatom aus der Hydroxylgruppe des Substrates zieht. Der Cofaktor, der ebenfalls gebunden ist, nimmt den Wasserstoff auf der B-Seite des Nicotinamid-Rings in Position 4 auf. Die Anwesenheit der positiv geladenen Seitenkette des Lysins (Position 163) erleichtert zum einen die Protonenübertragung. Sobald ein Proton übertragen wurde, kann der Katalysator wiederhergestellt werden, indem das Hydrid auf den Cofaktor übertragen wird. Weiterhin ist das Lysin an der Bindung des Cofaktors beteiligt (Ridlon et al., 2005; Tanaka et al., 1996). In Abbildung 1 ist der Reaktionsmechanismus der HSDHs am Beispiel der 7 α -HSDH aus *E. coli* abgebildet.

Einleitung

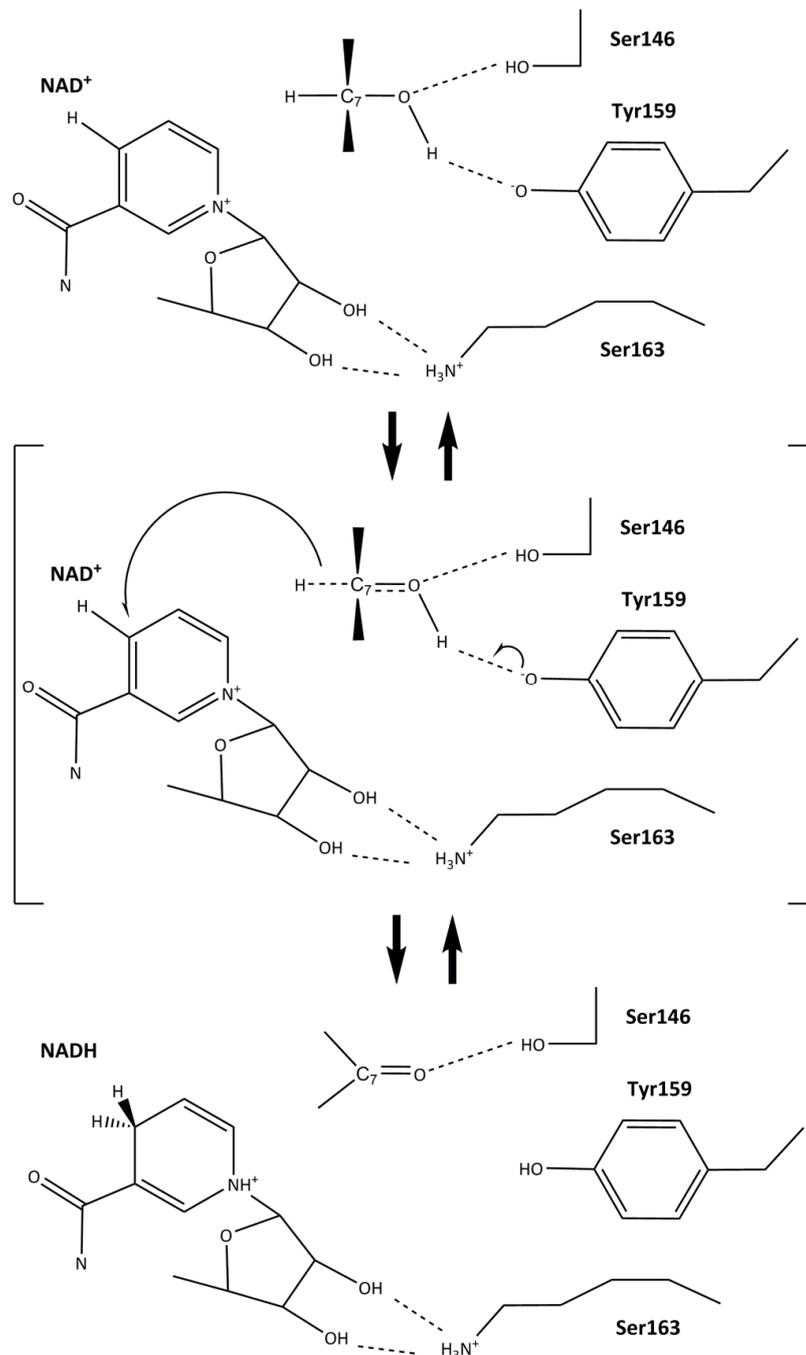


Abb. 1: Reaktionsmechanismus der 7 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase von *E. coli* (nach Tanaka et al., 1996).

Typischerweise sind die SDRs Dimere oder Tetramere und jede Untereinheit hat eine Länge von ca. 250 AS. Weiterhin besitzen sie im *Rossmann fold* das typische Glycin-Motiv und die katalytische Triade, alles Eigenschaften, die charakteristisch sind für die Gruppe der short-chain Dehydrogenasen (SDR). Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene HSDHs, die aus verschiedenen Mikroorganismen stammen, bearbeitet. Die biochemischen Eigenschaften der HSDHs sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Einleitung

Tabelle 2: Zusammenfassung der biochemischen Eigenschaften der rekombinanten HSDHs, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden. Alle HSDHs, die in der Tabelle aufgeführt wurden, gehören zu der Gruppe der SDR.

HSDH	Mikroorganismus	Cofaktor	Substrat-inhibierung	Literatur
3 α -HSDH	<i>C. testosteroni</i>	NAD(H)	ja	(Maser et al., 2000)
7 α -HSDH	<i>E. coli</i>	NAD(H)	ja	(MacDonald, 1973; Tanaka et al., 1996)
7 α -HSDH	<i>C. difficile</i>	NAD(P)(H)	Nein (NADP ⁺) Ja (NAD ⁺)	diese Arbeit (Bakonyi and Hummel, 2017)
7 β -HSDH	<i>C. aerofaciens</i>	NADP(H)	ja	(Liu et al., 2011)

Die Regulation der Expression hängt sowohl vom Enzym als auch vom Organismus ab. Die Expression kann entweder konstitutiv sein (Ferrandi et al., 2011) oder durch das Substrat (Gallensäuren/Steroide) induziert werden (Macdonald and Roach, 1981; Maser et al., 2000). Das Protein kann allerdings auch zu einem bestimmten Zeitintervall der Wachstumsphase im Organismus induziert werden (Coleman et al., 1994).

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten HSDHs näher beschrieben werden, speziell diejenigen, die für die Synthese von 12-Keto-Ursodesoxycholsäure, ausgehend von Dehydrocholsäure, bzw. Ursodesoxycholsäure, ausgehend von Chenodesoxycholsäure, verwendet werden können.

1.2.2.1. 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni*

Die erste beschriebene prokaryotische 3 α -HSDH stammt aus dem Gram-negativen Stamm *Comamonas testosteroni* (vormals *Pseudomonas testosteroni*), der zur β 2-Gruppe der Proteobakterien gehört (Abalain et al., 1995; Michel-Briand, 1969; Oppermann et al., 1993; Oppermann and Maser, 1996; Skålhegg, 1974a, 1974b; Suzuki et al., 1993; Tamaoka et al., 1987). *C. testosteroni* ist ein strikt aerober, nicht-fermentativer und chemoorganotropher Organismus, der selten Zucker, aber dafür organische Säuren und Aminosäuren verwerten kann (Maser et al., 2000). Außerdem kann *C. testosteroni* auf Steroiden bzw. Gallensäuren als alleiniger C-Quelle wachsen. Neben diesem Organismus wurden 3 α -HSDHs zumeist in Darmbakterien wie *Clostridium perfringens* (Macdonald et al., 1976), *Peptostreptococcus productus* (Edenharder et al., 1989) und *Eggerthella lenta* (früher *Eubacterium lentum*) (Macdonald et al., 1979) entdeckt. Es wurde das Enzym aus dem oben beschriebenen *C. testosteroni* gewählt, da das Gen in *E. coli* exprimiert werden kann (Suzuki et al., 1993).

Das Enzym katalysiert die Oxidation einer α -ständigen Hydroxyl- bzw. die Reduktion einer Keto-Gruppe an der C₃-Position des Steroidgerüsts. Dabei nimmt das Protein eine Vielzahl an C₁₉- bis C₂₇-Steroid-

Einleitung

Substraten an. Diese Reaktion ist von Bedeutung für die Initiierung des vollständigen Abbaus der zumeist inerten Substrate und kann wesentlich zur Sanierung von Habitaten, die mit hormonell aktiven Substanzen belastet sind, beitragen. Weiterhin akzeptiert die 3α -HSDH eine große Zahl sowohl an nicht-steroidalen- als auch an alkoholischen Verbindungen, auch aus dem Bereich der Xenobiotika (Hoffmann and Maser, 2007; Oppermann and Maser, 1996).

Die Expression des Gens für die 3α -HSDH aus *C. testosteroni* lässt sich durch Gallensäuren bzw. Steroide induzieren. Mikroorganismen, deren abbauende Enzyme induzierbar sind, zeigen einen deutlich schnelleren Metabolismus von Steroiden, da sie sich besser an die Substratmengen anpassen können. Bei höheren Organismen führt dieser Mechanismus zudem zu einer besseren Resistenz gegenüber diesen Verbindungen und zu einer verbesserten Entgiftung des Organismus (Oppermann and Maser, 1996).

Die Kristallstruktur der 3α -HSDH aus *C. testosteroni* konnte im Komplex mit NAD^+ aufgeklärt werden (PDB: 1FK8) (Grimm et al., 2000).

1.2.2.2. 7α -HSDH aus *E. coli*

Die Gruppe der 7α -HSDHs ist ähnlich gut erforscht wie die der 3α -HSDHs. Einige bekannte Enzyme stammen aus *E. coli* (MacDonald, 1973; Tanabe et al., 1998; Tanaka et al., 1996; Yoshimoto et al., 1991), *Clostridium sordellii* (Coleman et al., 1994), *Eubacterium* sp. (Baron et al., 1991), *Stenotrophomonas maltophilia* (Medici et al., 2002; Pedrini et al., 2006), *Bacteroides fragilis* (Bennett et al., 2003) und *Comamonas testosteroni* (Ji et al., 2014). Es gibt sowohl NAD^+ - als auch NADP^+ -abhängige 7α -HSDHs.

Die 7α -HSDH oxidiert am C_7 -Kohlenstoffatom von Steroiden bzw. Gallensäuren die α -ständige Hydroxylgruppe bzw. kann umgekehrt die C_7 -Ketogruppe zur 7α -Hydroxylgruppe reduzieren. Weiterhin ist auch hier bekannt, dass diverse 7α -HSDHs eine Vielzahl an nicht-steroidalen Verbindungen akzeptiert.

Die Expression der Gene dieser Enzymklasse ist unterschiedlich, es gibt sowohl konstitutiv exprimierte als auch induzierbare Gene. So ist die 7α -HSDH in *E. coli* konstitutiv vorhanden (Franklund, 1990; MacDonald, 1973), in *Clostridium limosum* ist sie dagegen durch primäre Gallensäuren induzierbar (Sutherland and Williams, 1985). In *Bacteroides* spp. ist sie sowohl induziert als auch Wachstumsabhängig vorhanden (Bennett et al., 2003; Hylemon and Sherrod, 1975).

Einleitung

Wie bei der 3 α -HSDH wurde die Kristallstruktur der 7 α -HSDH aus *E. coli* mit dem Coenzym NAD⁺ sowie der Ketoverbindung 7-Keto-glycochenodesoxycholsäure aufgeklärt (PDB: 1FMC) (Tanaka et al., 1996). Weiterhin konnte die Kristallstruktur der 7 α -HSDH aus *C. absonum* aufgeklärt werden, in der wertvolle Ergebnisse über die Struktur als auch Wechselwirkungen der einzelnen Untereinheiten mit dem Cofaktor publiziert wurden (PDB: 5EPO) (Lou et al., 2016).

1.2.2.3. 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens*

7 β -HSDHs katalysieren die Oxidation von Hydroxylgruppen bzw. die Reduktion von Ketogruppen am C₇-Atom von Steroiden bzw. Gallensäuren. Diese Gruppe ist weniger erforscht als die Enzymklassen der 3 α - oder 7 α -HSDHs. Das spiegelt sich auch in den bekannten Enzymen wieder. Das am besten charakterisierte Enzym stammt aus *Collinsella aerofaciens* (ehemals als *Eubacterium aerofaciens* beschrieben). Hier liegen Sequenzdaten vor und dieses Enzym ist in rekombinanter Form verfügbar (Liu et al., 2011). Ausserdem wurde von der HSDH aus *C. aerofaciens* als erste der HSDHs, die die Carbonylgruppe an Position C₇ in eine β -ständige Hydroxylgruppe reduzieren, die Kristallstruktur gelöst (Savino et al., 2016). Daneben sind noch 7 β -HSDH-Aktivitäten aus *Peptostreptococcus productus* und *Collinsella aerofaciens* (Hirano and Masuda, 1982) sowie *Stenotrophomonas maltophilia* (ehemals als *Xanthomonas maltophilia* bekannt) (Medici et al., 2002) und *Clostridium limosum* (Sutherland and Williams, 1985) bzw. *C. sardiniense* (ehemals *absonum*) (Macdonald and Roach, 1981) oder *C. baratii* (Lepercq et al., 2004b) beschrieben, allerdings liegen zu diesen Enzymen keine Sequenzdaten vor.

1.3. Protein Engineering

Enzyme sind leistungsfähige Biokatalysatoren, die chemische Reaktionen beträchtlich beschleunigen können (Bornscheuer and Kazlauskas, 2012). Es stehen heute verschiedenste Methoden des „Protein engineering“ zur Verfügung, um natürlich vorkommende und bereits vorhandene Biokatalysatoren hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften zu verändern bzw. zu optimieren und sie somit für eine bestimmte biotechnologische Anwendung besser nutzbar zu machen. Durch diese Methoden lässt sich jede Aminosäure in der Proteinsequenz ändern, so dass die Eigenschaften des Proteins z.B. in Bezug auf Stabilität, (Temperaturoptimum, Resistenz gegenüber organischen Lösungsmittel, etc.) Enantioselektivität oder Aktivität verändert werden können. Aktuelle Strategien des Protein

engineering umfassen einerseits das „rationale Design“, zum anderen die „gerichtete Evolution“ (Adamczak and Krishna, 2004).

1.3.1. Rationales Design

Rationales Protein-Design durch „*site-directed*“ Mutagenese (SDM) war bzw. ist immer noch eine sehr effektive Strategie, um Enzyme mit verbesserten Eigenschaften zu kreieren. Erfolgreiche Anwendungen, die zur Änderung der Substrat- oder auch Cofaktorspezifität, Enantioselektivität und Stabilität von Enzymen führen, finden sich zahlreich in der Literatur. Des Weiteren ist diese Methode auch geeignet, Beiträge zur Aufklärung von Enzymmechanismen zu leisten (Bornscheuer and Pohl, 2001).

Für das Rationale Design werden Informationen über die Proteinstruktur benötigt, wie sie in Strukturdatenbanken zu finden sind. So finden sich in der „Protein Data Bank“ (PDB) in großem Umfang aktuell (Stand Juli 2014) über 100.000 Proteinstrukturen (Berman et al., 2000). Sind solche detaillierten Kenntnisse über die dreidimensionale Struktur, die Funktionsweise und die Bedeutung einzelner Aminosäuren eines Enzyms bekannt, ist es möglich, durch den Einsatz von SDM das Enzym gezielt zu verändern.

In der Literatur sind zahlreiche Beispiele für eine Verbesserung von Enzymeigenschaften zu finden, so konnte rationales Protein-Design erfolgreich zur Stabilisierung von Enzymen gegen Hitzeinaktivierung sowie Oxidation eingesetzt werden. Die α -Amylase aus *B. licheniformis* konnte erfolgreich durch Austausch von drei Asparaginen deutlich hitzestabiler gemacht werden (Declerck et al., 2000). Weiterhin konnte eine verbesserte Resistenz gegen oxidativen Stress bei einer D-Aminosäure-Oxidase aus *Trichoderma variabilis* durch Austausch von 6 Methioninen zu Leucinen erreicht werden (Ju, 2000).

Die Änderung der Cofaktorspezifität spielt insbesondere bei Dehydrogenasen eine wichtige Rolle. Durch gezielten Austausch von Aminosäuren konnte die Cofaktorspezifität bei einigen Dehydrogenasen von NADP(H) auf NAD(H) erreicht werden. Das hat zur Folge, dass die Kosten reduziert werden konnten, da NAD⁺ preisgünstiger ist als NADP⁺, zudem ist NAD(H) deutlich stabiler als NADP(H). (Chenault and Whitesides, 1987). Diese Änderung der Cofaktorabhängigkeit konnte beispielsweise bei der Xylose-Reduktase aus *Candida tenuis* erreicht werden (Petschacher et al., 2005), wobei durch *site-directed* mutagenesis von zwei AS (K274R und R276D) ein NAD(H)-abhängiges Protein erhalten wurde. Die Cofaktor-Änderung von NADH auf NADPH dagegen hat andere Gründe als Kostenaspekte; so wurde diese Art der Änderung bei Laktat-Dehydrogenasen aus *Bacillus stearothermophilus* und *B. subtilis* durchgeführt, damit diese Enzyme nun für die Regenerierung von

Einleitung

NADP⁺ mittels Pyruvat eingesetzt werden konnten (Holmberg et al., 1999; Richter et al., 2011), da für die Regenerierung dieses Coenzym keine etablierte Standardmethode verfügbar ist.

1.3.2. Gerichtete Evolution

Wenn die Struktur eines Enzyms nicht bekannt ist, kann die Methode der ortsgerichteten Mutagenese, also das rationale Protein Design, nicht eingesetzt werden. Um dennoch Mutanten mit verbesserten biochemischen Eigenschaften zu erzeugen, kann man alternativ die Methode der gerichteten Evolution (Jäger et al., 2001; Stemmer, 1994) anwenden. Dabei werden durch molekularbiologische Methoden Enzymlibliotheken erzeugt, die in Kombination mit geeigneten Hochdurchsatz-fähigen Analysemethoden die Identifizierung verbesserter Biokatalysatoren ermöglichen. Die Evolution wird hier *in-vitro* im Labor zur Optimierung von bekannten Enzymen nachempfunden, wobei der Zeitraum von Millionen Jahren auf wenige Monate/Wochen reduziert wird.

Eine Vielzahl an Strategien steht zur Erstellung von DNA-Bibliotheken zur Verfügung: fehlerbehaftete PCR (error-prone PCR), kombinatorische Oligonukleotid-Mutagenese, DNA-shuffling, Exon-shuffling und viele weitere mehr. Eine sehr gute Übersicht über die verschiedenen Methoden ist in der Literatur zugänglich (Adamczak and Krishna, 2004; Dalby, 2011, 2003).

Den Ausgangspunkt der gerichteten Evolution eines Biokatalysators stellt immer der Wildtyp des Enzyms dar. Mittels Zufallsmutagenese wird für das entsprechende Enzym eine Bibliothek von Genvarianten hergestellt. Durch ein anschließendes Screening werden nun die Mutanten der Mutantenbibliothek mit verbesserter Eigenschaft identifiziert. Da man bei dieser Methode primär eine hohe Anzahl von Mutanten erzeugt, hängt der Erfolg wesentlich davon ab, ob für das Auffinden verbesserter Mutanten eine Hochdurchsatz-fähige Analysemethoden zur Verfügung steht, mit der man die hohe Anzahl an Mutanten in kurzer Zeit analysieren kann. Erkennt man verbesserte Mutanten beispielsweise nur durch chromatographische Methoden wie HPLC oder GC, stellt das Durchtesten von Bibliotheken mit mehreren 10.000 Proteinvarianten einen schwer zu bewältigenden Aufwand dar. Eine solche Einschränkung liegt beispielsweise vor, wenn man die Enantio- oder Diastereoselektivität eines Enzyms verbessern will.

Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist es, dass die in der ersten Generation gefundenen Enzymvarianten durch weitere Mutation optimiert werden können, man spricht in diesem Zusammenhang auch von iterativer Sättigungsmutagenese (ISM). Die ISM ist eine relativ neue und effiziente Methode, die die notwendigen molekularbiologischen Arbeiten und vor allem den Screening-Aufwand drastisch reduziert (Reetz and Carballeira, 2007).

Für das Einbringen geringfügiger Änderungen werden i.d.R. nicht rekombinante Methoden ausgesucht wie z.B. die error-prone PCR. Hier wird die Fehlerrate der Polymerase durch Zugabe von Manganionen erhöht. Die eingesetzte Polymerase darf in diesem Fall keine Korrekturlesefunktion besitzen (You and Arnold, 1996).

Rekombinante Methoden dagegen führen zu bedeutend stärker veränderten Gensequenzen. Ma et al., (2010) konnten durch DNA-shuffling eine Ketoreduktase in Bezug auf ihre Aktivität und Enantioselektivität industriell relevanter Substrate verbessern. Gleichzeitig konnten die Biokatalysatoren auch den gewünschten Reaktionsbedingungen angepasst werden (Ma et al., 2010).

1.4. Cofaktorregenerierung

Viele der eingesetzten Oxidoreduktasen sind auf Cofaktoren wie NADH oder NADPH angewiesen. Da der Einsatz des Cofaktors in stöchiometrischen Konzentrationen in aller Regel mit hohen Kosten verbunden ist, werden solche Reaktionen durchweg mit einer *in situ*-Regenerierung des Cofaktors verbunden (van der Donk and Zhao, 2003; Weckbecker et al., 2010). Dabei stehen prinzipiell enzymatische, elektrochemische, chemische und photochemische Verfahren zur Verfügung (Chenault & Whitesides 1987).

Die am häufigsten angewandte Methode zur Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren ist die enzymatische. Sie ist im Vergleich zu den anderen hochselektiv, effizienter und beeinträchtigt nicht die eigentliche Synthese (Kroutil et al., 2004). Der enzymatische Ansatz wird in drei Gruppen aufgeteilt (Hummel and Gröger, 2014):

- 1) enzymgekoppelte Regenerierung (mit Cofaktorregenerierungs-Enzym und Co-Substrat)
- 2) substratgekoppelte Regenerierung (ohne Cofaktorregenerierungs-Enzym aber mit Co-Substrat)
- 3) interne Regenerierung (ohne Cofaktorregenerierungs-Enzym und ohne Co-Substrat)

Nicotinamid-Cofaktoren werden bei der enzymgekoppelten Methode durch den Zusatz eines zweiten enzymatischen Biokatalysators in ihre Ausgangsform überführt. Ein essentieller Unterschied zur substratgekoppelten Methode besteht darin, dass das zusätzliche Enzym ein unterschiedliches Substratspektrum gegenüber dem Hauptenzym besitzt. Dies ist Voraussetzung dafür, dass beide Reaktionen unabhängig voneinander ablaufen können und ein erfolgreicher Prozess erreicht werden kann. Die Regenerierung von NADH sowie NADPH erfolgt hauptsächlich durch die Enzyme Formiat-Dehydrogenase (FDH) (NADH), Glucose-Dehydrogenase (GDH) (NADH und NADPH),

Einleitung

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) (NADPH), ADH (NADH und NADPH) und Hydrogenase (NADH). Für die Regenerierung der oxidierten Form werden in der Regel Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) (NADP⁺), Lactat-Dehydrogenasen (LDH) (NAD⁺), ADH (NAD⁺ und NADP⁺) und NAD(P)H-Oxidase (NOX) (NAD⁺ und NADP⁺) eingesetzt. Die bekanntesten Enzyme sind die FDH und GDH. Die Formiat-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von Formiat zu Kohlenstoffdioxid (CO₂) bei gleichzeitiger Reduktion von NAD⁺ zu NADH. Die Glucose-Dehydrogenase oxidiert β-D-Glucose zu D-Gluconolacton bei gleichzeitiger Reduktion von NAD(P)⁺ zu NAD(P)H. Dieses Enzym hat den Vorteil, dass es beide Nicotinamid-Cofaktoren akzeptiert und eine höhere spezifische Aktivität als die FDH besitzt. Eine erfolgreiche Anwendung der GDH fand in der Arbeit von Bakonyi et al., (2012) statt. In dem Reaktionsansatz mit zwei Enzymen sind NAD⁺ als auch NADP⁺ enthalten, die durch die GDH wieder zu der reduzierten Form überführt werden. Das Schema der Reaktion ist in Abbildung 2 dargestellt.

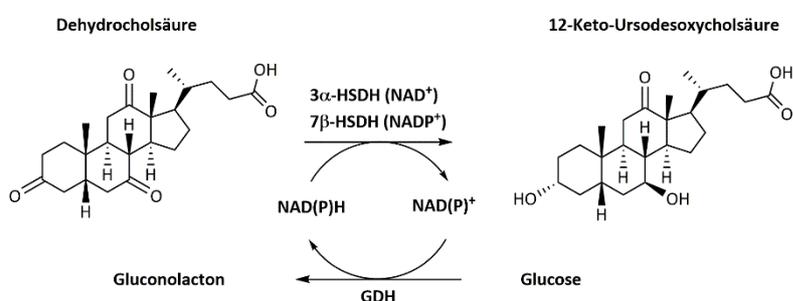


Abb. 2: Enzymgekoppelter Ansatz zur simultanen Cofaktorregenerierung von NADH sowie NADPH mittels GDH.

Vorteilhaft für die Oxidation von Substraten ist die Verwendung einer NAD(P)H-Oxidase (NOX). In der Literatur sind einige erfolgreiche Biotransformationen beschrieben, wie z.B. Oxidation von CDCA zur entsprechenden Keto-Verbindung (7-Keto-Lithocholsäure; 7-KLCA) mit Hilfe der NOX2 aus *Lactobacillus sanfranciscensis* (Bakonyi and Hummel, 2017). NAD(P)H-Oxidasen benötigen als Substrat lediglich O₂, welches ubiquitär vorliegt. Die NOX2 aus *L. sanfranciscensis* hat den weiteren Vorteil, dass kein Wasserstoffperoxid entsteht, sondern lediglich Wasser (Lountos et al., 2006).

Für die 2. Variante der Coenzymregenerierung (substratgekoppelte Regenerierung) wird ein weiteres, zweites Substrat dem Reaktionsansatz zugegeben, welches vom Hauptenzym umgesetzt wird. Der Biokatalysator übernimmt somit den reduktiven oder oxidativen Schritt, je nachdem, ob der reduzierte oder oxidierte Cofaktor benötigt wird. Um das thermodynamische Gleichgewicht in Richtung des Produktes zu verschieben, wird das Co-Substrat in einem großen Überschuss zugegeben. In der Regel werden kostengünstige Alkohole bzw. Aldehyde wie Isopropanol/Aceton als Co-Substrat eingesetzt, um die reduzierten oder oxidierten Nicotinamid-Cofaktoren zu regenerieren (Schubert et al., 2001). In Abbildung 3 ist das Reaktionsschema des gekoppelten Ansatzes dargestellt.

Einleitung

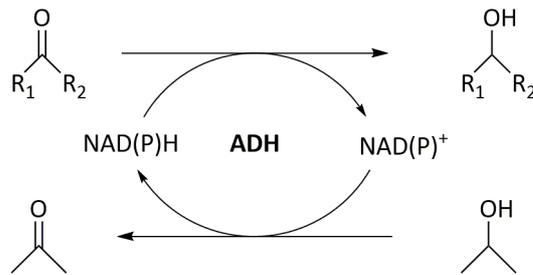


Abb. 3: Substratgekoppelter Ansatz zur Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren. ADH = Alkohol-Dehydrogenase

Die genannten regenerierenden Reaktionen konzentrieren sich im Wesentlichen auf die Wiederherstellung der richtigen Redoxstufe des Coenzym. Die Anforderungen für diesen Schritt umfassen unter anderem, dass das Co-Substrat preiswert ist und dass das Co-Produkt leicht in der Produktaufarbeitung entfernt werden kann. Eine Alternative zu den beiden genannten Methoden stellt die Variante der Cofaktorregenerierung dar, indem der Cofaktor intern, d.h. von den eingesetzten Substraten bzw. Intermediaten selbst regeneriert wird. Es wird somit keine externe Zugabe eines Co-Substrats benötigt und somit entsteht kein "Abfall". Als Voraussetzung für diese Art der Kopplung von Haupt- und Regenerierungsreaktion wird eine Zwischenverbindung benötigt, die durch die erste Redoxreaktion gebildet wird und anschließend durch die zweite, gegenläufige Redoxreaktion in das gewünschte Produkt überführt wird. Weiterhin müssen beide Enzyme dieselbe Cofaktorspezifität besitzen. Zur Erreichung eines vollständigen Umsatzes muss mindestens ein Schritt der Reaktion irreversibel sein, da die Verwendung von zwei reversiblen enzymatischen Schritten zu einer unvollständigen Bildung des Produktes führt (Hummel and Gröger, 2014). In Abbildung 4 ist ein Reaktionsschema aufgeführt, das die Methode der internen Regenerierung des Cofaktors nutzt.

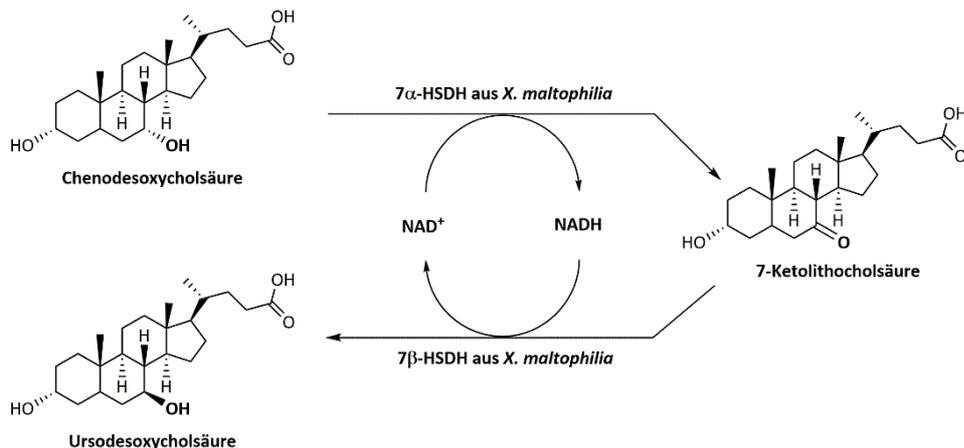


Abb. 4: Epimerisierung von Chenodesoxycholsäure zu Ursodesoxycholsäure ohne Cofaktorregenerierungs-Enzyme und ohne Co-Substrat. Die 7 α -HSDH reduziert den Cofaktor und stellt somit die richtige Oxidationsstufe des Cofaktors für das zweite Hauptenzym 7 β -HSDH bereit (Medici et al., 2002; Pedrini et al., 2006).

Bei Einsatz der Enzyme als Ganzzellbiokatalysator bezeichnet man die enzymatische Variante der Cofaktorregenerierung als biologische Methode. Diese Methode ist relativ neu, indem das cofaktorregenerierende Enzym und das eigentliche produzierende Enzym in *E. coli* Zellen vorliegen.

Einleitung

Vorteile dieser sog. „Designer Zellen“ sind die gleichen wie bei Biotransformationen mit Ganzzellkatalysatoren, unter anderem der Verzicht auf Isolierung und Reinigung von Enzymen.

Ursodesoxycholsäure (3 α ,7 β -Dihydroxy-5 β -Cholansäure) ist in der Therapie zur Auflösung von Gallensteinen weit verbreitet (Crosignani et al., 1996; Salen et al., 1980). Es wird durch mehrere chemische Syntheseschritte hergestellt. Mit isolierten Enzymen kann die Epimerisierung am C₇-Atom durch zwei Redoxreaktionen erreicht, hierfür wird keine Zugabe an Co-Substrat benötigt, da die Bereitstellung des geeigneten Coenzym reaktionsintern erfolgt (Abbildung 4).

1.5. Steroide

1.5.1. Struktur

Steroide bestehen aus dem Grundgerüst Steran (Cyclopentanoperhydrophenanthren), sie gehören zur Stoffklasse der Lipide. Lipide sind Moleküle mit lipophilen Gruppen, welche in der Regel wasserunlöslich sind. Der Name Steroid leitet sich vom erst bekannten Steroid, dem Cholesterin ab. Natürlicherweise kommen Steroide sowohl in Wirbeltieren als auch in Pflanzen oder Pilzen vor. In Wirbeltieren stellt das Cholesterin das wichtigste Steroid dar. In Pflanzen sind es sogenannte Phytosterine, die sich das gleiche Grundgerüst teilen, aber eine andere Seitenkette am C₁₇-Atom aufweisen.

Das Molekülgerüst Steran ist für Steroide charakteristisch. Beim Steran ist der A-Ring mit dem B-Ring *cis*-verknüpft. Sind diese beiden Ringe *trans*-verknüpft, spricht man vom Gonan. Benachbarte Ringe können somit in der Ebene (*trans*) liegen oder zueinander gewinkelt (*cis*) stehen. Dieser Unterschied in der Verknüpfung hat Auswirkungen auf die Stereochemie sowie die Eigenschaften des Moleküls. In Abbildung 5 ist das Grundgerüst des Sterans abgebildet sowie einige wichtige Steroid-ähnliche Verbindungen, die aus Steran aufgebaut sind.

Einleitung

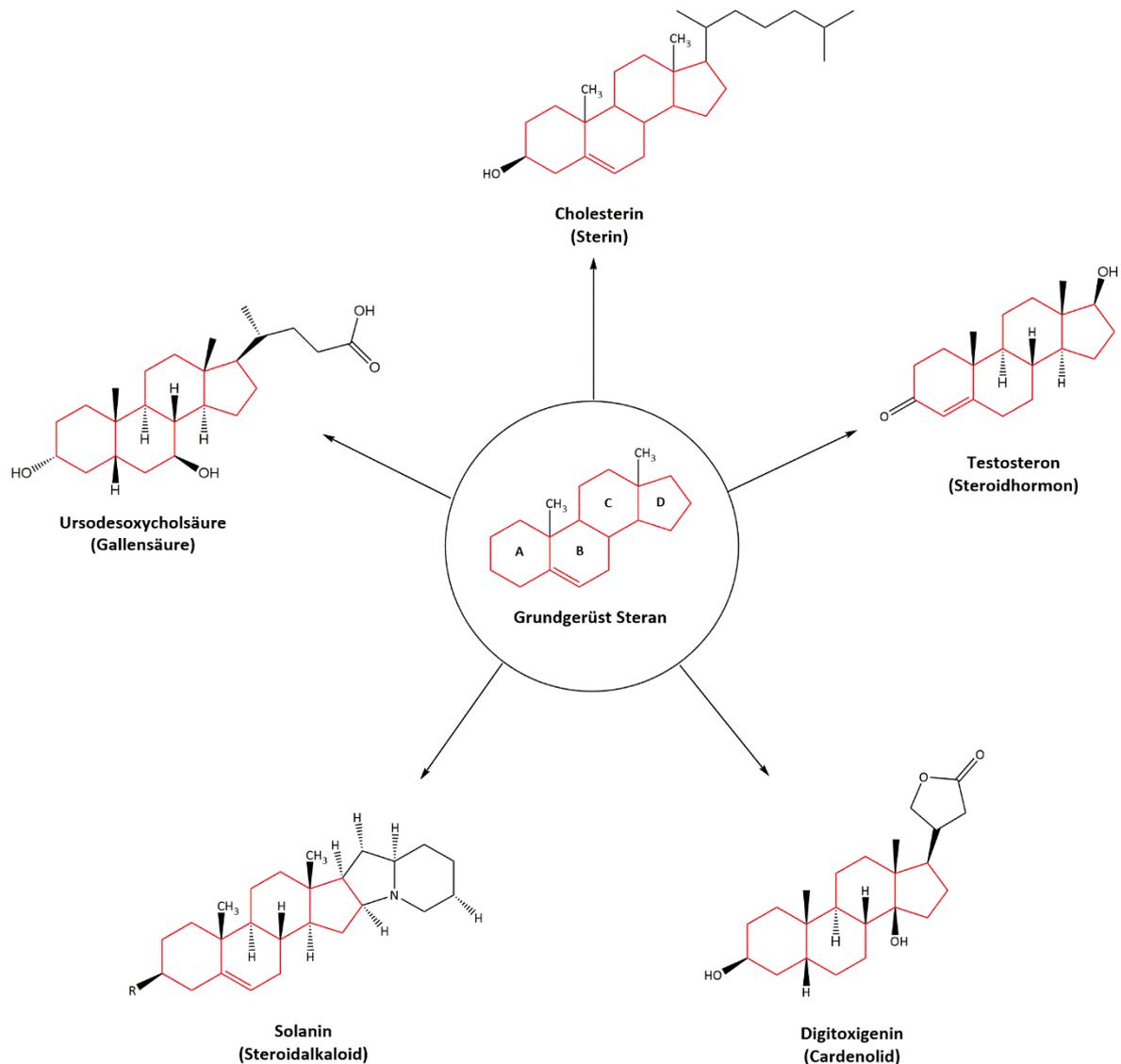


Abb. 5: Grundgerüst Steran und einige wichtige Steroid ähnliche Verbindungen, die aus einem Steran aufgebaut sind. Allen gemeinsam ist das Ringsystem (A bis D), das aus drei Cyclohexanringen (A bis C) und einem Fünfring (D) besteht.

Steroide bzw. Steroid-ähnliche Verbindungen werden aufgrund ihrer Funktion sowie ihres Aufbaus in verschiedene Gruppen eingeteilt. Wichtige Gruppen sind Sterine, Gallensäuren, Steroidhormone und Cardenolide sowie verschiedene N-haltige Steroidalkaloide (siehe Abbildung 5). Beispielsweise sind die A- und B-Ringe der Steroidhormone typischerweise *trans*-verknüpft und die der Gallensalze *cis*-verknüpft. Von den zahlreichen synthetischen Steroiden haben z.B. die Anabolika und zahlreiche strukturmodifizierte Steroidhormone große pharmakologische Bedeutung, die auch zur Leistungssteigerung im Sinne eines Dopings genutzt wird. Der erste Dopingfall im Sport wurde 1954 über die russische Gewichtheber-Mannschaft berichtet (Wade, 1972). Anabole Steroide erfreuten sich ab dieser Zeit immer größerer Beliebtheit unter den Athleten (Haupt and Rovere, 1984).

1.5.2. Gallensäuren

Das Steran ist, wie auch bei den Steroiden, das Grundgerüst der Gallensäuren. Es besteht aus zwei Einheiten, einem starren Steroidkern sowie einer aliphatischen Seitenkette (siehe Abbildung 6). Der Steroidkern besteht aus drei Cyclohexanringen (A, B, C) sowie einem Fünfring (D). Zudem findet man an den Kohlenstoffatomen C_{18} und C_{19} regelmäßig eine Methylgruppe. Eine Besonderheit ist die *cis*-Verknüpfung des A-Rings mit dem B-Ring, wie sie bei Gallensäuren in höher entwickelten Säugetieren vorkommen (Mukhopadhyay and Maitra, 2004). In einigen weniger entwickelten Wirbeltieren wie beispielsweise Fröschen sind die Gallensäuren *trans*-verknüpft, d.h. das Molekül ist flach. Die Beschaffenheit der Seitenkette bestimmt die Art der Gallensäure; ist beispielsweise ein Alkohol gebunden, spricht man von einem Gallenalkohol (Eisenbrand et al., 2006). Bei den Gallensäuren gibt es zwei Formen: C_{27} - und C_{24} -Gallensäuren. Diese unterscheiden sich im wesentlichen in der Länge der Seitenkette. Bei höher entwickelten Organismen ist die C_{24} -Form die dominierende Form der Gallensäure (Mukhopadhyay and Maitra, 2004).

Gallensäuren sind in einem strukturellen und funktionellen Sinn sehr vielfältig, da die Anzahl und Position der Hydroxylgruppe am Ringsystem die Eigenschaften stark beeinflusst. An den C_3 -, C_7 - und/oder C_{12} -Kohlenstoffatomen können Hydroxylgruppen vorkommen, die meist α -ständig konfiguriert sind (Monte et al., 2009). Der bekannte, bzw. am häufigsten vorkommende Vertreter dieser Gruppe ist die Cholsäure ($3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -Trihydroxycholansäure), die dreifach α -konfiguriert hydroxyliert ist. Die β -ständige Konfiguration der Hydroxylgruppe(n) kommt dagegen nicht so häufig vor. Eine wesentliche Eigenschaft der Gallensäuren, die Hydrophilie, hängt mit der Anzahl der Hydroxylgruppen zusammen, sie steigt mit zunehmender Anzahl an Hydroxylgruppen. Des weiteren beeinflusst die α - oder β -Positionierung der Hydroxylgruppen die grenzflächenaktiven Eigenschaften der Gallensäuren (Chiang, 2004).

Wenn die Gruppen sich, wie in Abbildung 6 gezeigt, in der α -ständigen Position (also unterhalb der Zeichenebene) befinden, ist das Molekül bedeutend wasserlöslicher. β -ständige Hydroxylgruppen, die also oberhalb der Zeichenebene stehen, stehen eher auf der hydrophoben Seite und das Molekül hat geringere grenzflächenaktive Eigenschaften. Die hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften variieren daher stark in Abhängigkeit von der Lage der Substituenten (Hofmann, 1999).

Einleitung

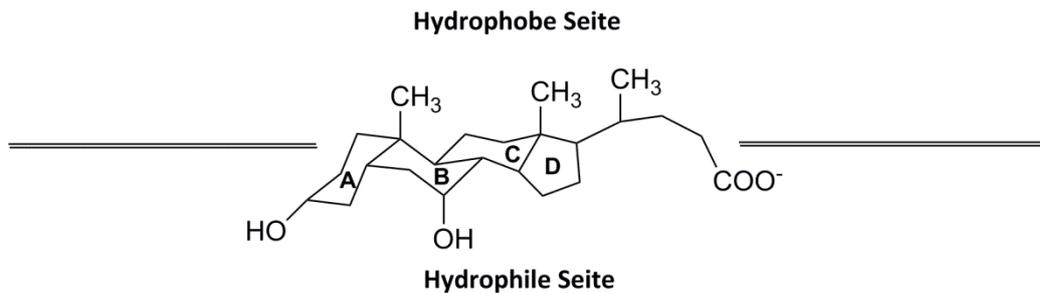


Abb. 6: Orientierung von Chenodesoxycholsäure in der Interphase eines Zweiphasensystems. Oberhalb der Ebene liegen die hydrophoben Reste (Methylgruppen an den Positionen C₁₈, C₁₉ und C₂₁) und die β -orientierten Hydroxylgruppen, unterhalb der Ebene die Hydroxylgruppen bei α -Positionierung sowie die Carbonsäure (Eggert et al., 2014; Hofmann and Hagey, 2014; Monte et al., 2009).

Im Gegensatz zu herkömmlichen oberflächenaktiven Molekülen besitzen Gallensalze ein starres Steroidgerüst mit polaren Hydroxylgruppen an der konkaven Fläche und α -Methylgruppen auf der konvexen β -Fläche. Diese Anordnung schafft eine einzigartige Amphiphilie, die auf andersartige Weise zu oberflächenaktiven Molekülen führen.

Als Konsequenz dieser Amphiphilie in wässrigen Lösungen bilden sich kleine Aggregate oder Mizellen von üblicherweise weniger als 10 Monomeren, solange die „critical micellar concentration“ (CMC) nicht überschritten ist (Monte et al., 2009). Typischerweise besitzen Dihydroxy-Gallensäuren eine CMC unter 5 mM, wohingegen Trihydroxy-Gallensäuren auf Grund ihrer höheren Wasserlöslichkeit einen deutlich höheren CMC-Wert von 10 bis 15 mM aufweisen. (Mukhopadhyay and Maitra, 2004).

Durch ihre oberflächenaktiven Eigenschaften erleichtern Gallensäuren die Emulsion von Fetten bei der Verdauung und die Aufnahme von hydrophoben Vitaminen. Sie dienen daher als „Lipidträger“ und ermöglichen so den Transport von Fetten oder Vitaminen in eine wässrige Umgebung, welche an sich für die Aufnahme von Fetten bzw. fettlöslichen Vitaminen nicht geeignet ist (Begley et al., 2005).

1.5.3. Mikrobielle Umwandlung von Gallensäuren

Gallensäuren werden in primäre und sekundäre Gallensäuren unterteilt. Zu den primären, die in der Leber aus Cholesterin gebildet werden, gehören Cholsäure (CA) sowie Chenodesoxycholsäure (CDCA). Die primären Gallensäuren machen mit ca. 70 % den Hauptbestandteil der Gallensäuren in der Gallenblase aus. Die sekundären Gallensäuren, zu denen unter anderem Ursodesoxycholsäure (UDCA) gehört, entstehen aus den primären durch bakterielle Modifikationen im Darm.

Die 7 α -Dehydroxylierung durch Bakterien im menschlichen Darm ist die quantitativ wichtigste Biotransformation von Gallensäuren (Ridlon et al., 2005). Durch 16S rRNA-Analyse zeigte sich, dass die Mehrheit der Darmbakterien, die die Dehydroxylierung durchführen, der Gattung *Clostridium*

Einleitung

zugeordnet werden kann (Wells et al., 2003). Durch 7 α -Dehydroxylierung entsteht z.B. aus Cholsäure Desoxycholsäure und aus Chenodesoxycholsäure die Lithocholsäure (Wells and Hylemon, 2000).

Weitere wichtige Modifikationen an den primären Gallensäuren sind die Dekonjugation (Abspaltung von Glycin oder Taurin) sowie Oxidation der Hydroxylgruppen an C₃, C₇ und C₁₂. Die Oxidation geschieht durch Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDH), wobei das entsprechende Ketoderivat der Gallensäuren entsteht (Ridlon et al., 2005). Diese Keto-Verbindungen können dann mittels der entsprechenden HSDH wieder in α - oder β -Hydroxylgruppen umgewandelt werden (Bovara et al., 1993; Carrea et al., 1984; Fukiya et al., 2009).

1.5.4. Gallensteine und deren Behandlung

Gallensteine sind eine der häufigsten Erkrankungen des Verdauungssystems in den westlichen Ländern. Es wird angenommen, dass 10 bis 15 % der Erwachsenen Gallensteine haben (Portincasa et al., 2006). In den Vereinigten Staaten betragen beispielsweise im Jahr 2000 die Aufwendungen für die Behandlung von Gallensteinen über 6 Milliarden Dollar (Di Ciaula et al., 2010). Als Folge der höheren Lebenserwartung und veränderten Ernährungsgewohnheiten steigt die Zahl der Betroffenen (Schafmayer et al., 2006).

Gallensteine, die zum Hauptteil aus Cholesterin bestehen, können bis zu 30 % Bilirubin (Calciumsalz) enthalten (Schafmayer et al., 2006). Diese pigmentierten Gallensteine, die aus größeren Mengen an Bilirubin bestehen, werden untergliedert in „schwarze“ Steine, die hart sind und in „braune“ Steine, die weich sind (Cahalane et al., 1988). Ausserdem konnten diverse Metalle in Gallensteinen nachgewiesen werden (Suzuki et al., 1975). In Abbildung 7 sind verschiedene Gallensteine abgebildet.



Abb. 7: Ansicht von verschiedenen Gallensteinen im Ganzen (A, B, F) oder Querschnitt (C, D, E). F ist ein Konglomerat von vielen kleinen Gallensteinen. C, D und E besitzen einen dunkel pigmentierten Kern. Die schwarze horizontale Linie unter A steht für die Länge von 1 cm (Portincasa et al., 2006).

Ein gewisser Anteil der Bevölkerung zeigt eine besondere Neigung zur Bildung von Gallensteinen. Der primäre pathophysiologische Defekt bei den meisten dieser sogenannten cholelithogenen Menschen ist die Übersekretion von Cholesterin durch die Leber, sie geht mit einer normalen, hohen oder niedrigen Sekretion von Gallensalzen sowie Phospholipiden einher. Einzeln oder in Kombination mit

Einleitung

Gallensalzen und Phospholipiden stellt somit die Übersättigung an Cholesterin in der Galle die Hauptursache für die Bildung von Gallensteinen dar (Carey and Small, 1978; Wang et al., 2009). Zusätzlich wird diese Erkrankung durch umweltbedingte sowie genetische Faktoren beeinflusst. Zu den Risikofaktoren Alter, Geschlecht und Rasse gehört außerdem der Faktor Ernährung (Guarino et al., 2013).

Die therapeutischen Möglichkeiten der Gallensteinbehandlung sind auf wenige, aber wichtige Schritte beschränkt, die von der An- bzw. Abwesenheit typischer Symptome, dem Vorhandensein von Komplikationen, der Funktion der Gallenblase sowie der Zusammensetzung und Größe von Gallensteinen abhängen (Portincasa et al., 2012).

Für die Entfernung von Gallensteinen ist die chirurgische Methode „cholecystectomy“ (Entfernung der Gallenblase) derzeit die erste Wahl. Sie bietet den Vorteil eines kurzen Krankenhausaufenthalts sowie geringer postoperativer Schmerzen und Narbenbildung. Weiterhin ist die nicht-chirurgische, also die medikamentöse Behandlung von Gallensteinen in den letzten Jahrzehnten sehr gut untersucht worden. Die orale Verabreichung von Gallenstein-lösenden Medikamenten erlaubt eine nicht-invasive Therapie, die bedeutend einfacher und sicherer ist (Lee and Kim, 2009). Die erste erfolgreiche Auflösung von Cholesterin-Gallensteinen auf diesem Weg wurde 1972 mittels der oralen Verabreichung der primären Gallensäure CDCA erreicht (Danzinger et al., 1972). Die Verwendung von CDCA wurde später zugunsten von UDCA aufgegeben, da Nebenwirkungen wie z.B. ein Dosis-abhängiger Anstieg der Serum-Leberenzyme, eine Erhöhung des LDL (low-density-lipoprotein) oder Diarrhö auftraten (Portincasa et al., 2012).

Ursodesoxycholsäure wurde in Form von Galle aus Schwarzbären als Teil der traditionellen chinesischen Medizin aus der Zeit der Tang-Dynastie (618-907 n. Chr.) für die Behandlung von verschiedenen Lebererkrankungen wie der Gelbsucht eingesetzt (Roma et al., 2011). Die therapeutische Anwendung wurde viele Jahre später mit den ersten Berichten über den Einsatz in Japan im Jahr 1961 durch die moderne Medizin wiederentdeckt, gefolgt von der Veröffentlichung der ersten kontrollierten Studie bei Patienten zur Behandlung von Cholesterin-Gallensteinen und auch zur Therapie der primären biliären Zirrhose (PBC) in den späten 80er Jahren (Leuschner et al., 1989; Makino and Tanaka, 1998).

Seit dem ersten Bericht zur Behandlung von Gallensteinen mit UDCA im Jahr 1961, wird diese als Alternative zur Cholezystektomie (Gallenblasenentfernung) eingesetzt, indem die Gallensteine durch medikamentöse Behandlung aufgelöst werden (Makino et al., 1975; Roma et al., 2011). Obwohl Gallensteine hauptsächlich aus Cholesterin bestehen, kann nur eine kleine Anzahl an Patienten ($\leq 10\%$) durch eine systematische Therapie mit UDCA behandelt werden. Die empfohlene Dosis am

Einleitung

Tag von UDCA beträgt 8 – 10 mg/kg. Eine höhere Dosis hat keinen besseren Effekt zur Folge (Portincasa et al., 2012).

1.5.5. Ursodesoxycholsäure

Das Präfix „ursus“ in Ursodesoxycholsäure ist auf den lateinischen Begriff „Bär“ zurückzuführen, da UDCA erstmals in der Galle des chinesischen Schwarzbären entdeckt und danach benannt wurde (Hagey et al., 1993). UDCA wird im Bären direkt aus Cholesterin synthetisiert und zählt somit zumindest bei dieser Spezies zu den primären Gallensäuren. UDCA ist eine hydrophile Gallensäure und stellt ein Epimer von Chenodesoxycholsäure dar. Es besitzt am C₇-Kohlenstoffatom des B-Rings eine β-Hydroxylgruppe und eine α-ständige an Position 3. CDCA besitzt dagegen nur α-ständige Hydroxylgruppen (an C₃- und C₇-Position). Aus CDCA, welches eine primäre Gallensäure ist, kann daher prinzipiell durch Epimerisierung der Hydroxylgruppe an Position C₇ die sekundäre Gallensäure UDCA gewonnen werden (Trauner and Graziadei, 1999).

1.5.6. Chemische Synthese

UDCA wird bislang über den chemischen Weg nur aus Cholsäure hergestellt. Der komplexe Aufbau des Steroidmoleküls erfordert allerdings kostenintensive, mehrstufige Reaktionen bei der chemischen Synthese dieser Steroidverbindung. Diese Route (siehe Abbildung 8) beinhaltet das Einbringen und spätere Abspalten von Schutzgruppen, um eine Stereo- und Regioselektivität der Reaktionen zu ermöglichen. Durch diese aufwändige Prozedur ist die Gesamtausbeute sehr gering (Fernandes et al., 2003). Für die Herstellung von UDCA, ausgehend von CA, erfolgen zuerst 5 Schritte zur Herstellung des Epimers CDCA (Hofmann, 1963). Dieses kann dann durch Epimerisierung am C₇-Atom zu UDCA umgewandelt werden. Die Ausbeute liegt bei 9 bis 14 % (Kanazawa et al., 1954; Sawada et al., 1982).

Einleitung

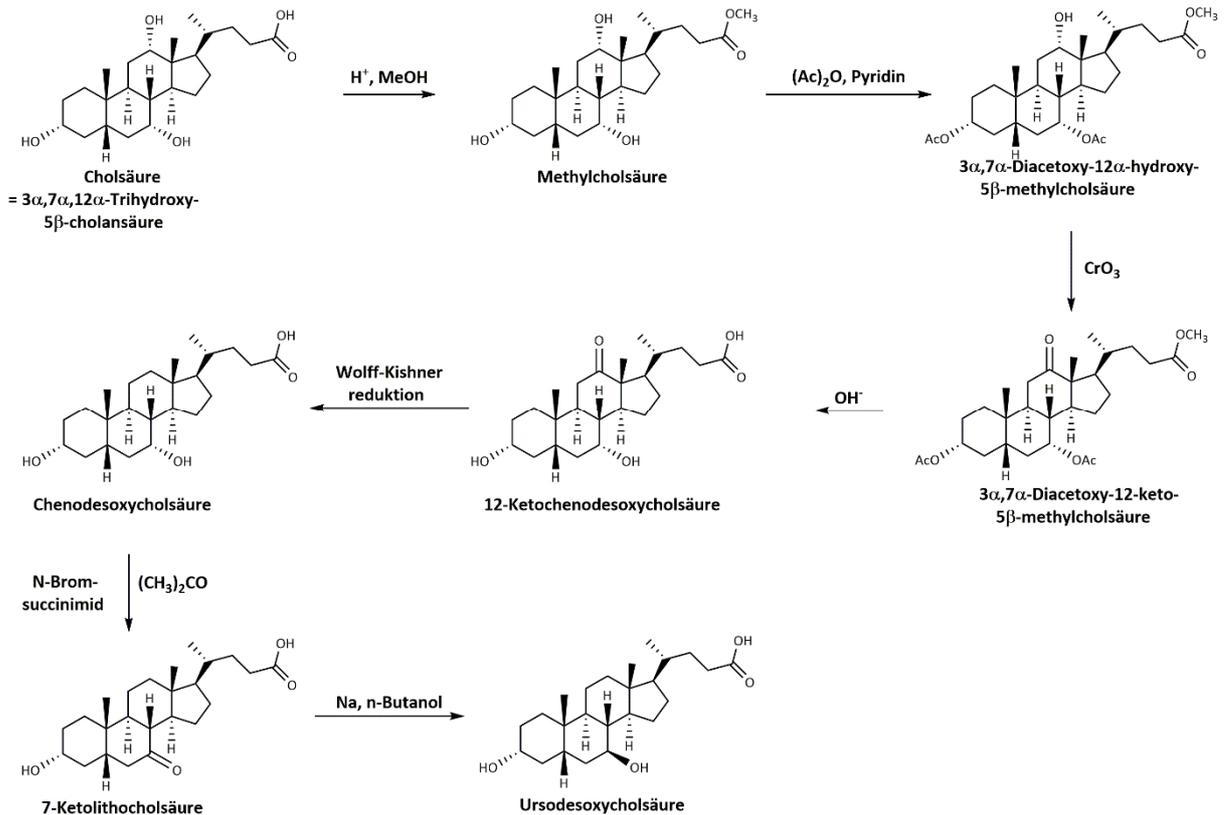


Abb. 8: Chemischer Syntheseweg zur Herstellung von Ursodesoxycholsäure (Hofmann, 1963; Kanazawa et al., 1954). Als Ausgangsstoff dient Cholsäure, die zunächst in den Methyl ester überführt und dann an den Hydroxylgruppen an C₃ und C₇ mit Schutzgruppen versehen wird. Anschließend erfolgt eine Oxidation an C₁₂. Nach Entfernung der Schutzgruppen erhält man 12-Ketochenodesoxycholsäure, welche mittels Wolff-Kishner-Reaktion zu Chenodesoxycholsäure umgesetzt wird. Anschließend wird die Hydroxylgruppe in zwei Schritten an C₇ unter Bildung von Ursodesoxycholsäure epimerisiert.

Chemische Synthesen erfordern häufig die Verwendung von Reagenzien, die nicht nur gefährlich für die Gesundheit der Mitarbeiter sind, sondern auch ein Problem bei der Entsorgung darstellen können.

1.5.7. Enzym-katalysierte Synthesen von Ursodesoxcholsäure

Die oben genannten ökonomischen und ökologischen Probleme, die mit der chemischen Synthese von Steroid- oder Gallensäure-Molekülen, insbesondere der Synthese von Ursodesoxycholsäure verbunden sind, treten bei der mikrobiellen oder enzymatischen Steroidbiotransformation nicht auf. Diese Methodik hat sich als ein leistungsfähiges Werkzeug für die effiziente Produktion von pharmazeutischen Wirkstoffen und wichtigen Zwischenprodukten (Donova and Egorova, 2012) sowie zur Entwicklung von neuartigen Steroid-Medikamenten etabliert. Die mikrobielle Steroidumwandlung kann bei milden Bedingungen durchgeführt werden und stellt somit eine effiziente Alternative zur chemischen Synthese dar, die außerdem hilft, Einschränkungen in der Prozessführung zu überwinden bzw. den Reinheitsgrad der Produkte zu erhöhen (Fernandes et al., 2003). Somit kann die

Einleitung

Biotechnologie einen leistungsstarken alternativen Ansatz zur Herstellung von therapeutischen Steroid-Derivaten liefern.

Die steigende Zahl an Gallenleiden führt zu einem steigenden Bedarf an nicht-invasiven Methoden zur Bekämpfung von Gallensteinen, wie sie die orale Verabreichung von UDCA darstellt. Quellen wie die Bären-galle oder auch die chemischen Synthesewege sind allerdings nicht gut geeignet, den erhöhten Bedarf zu decken. Das trifft eher auf biotechnologische Synthesewege zu, so dass seit den 1990-er Jahren mikrobielle und enzym-katalysierte Wege ausgiebig untersucht worden sind, bislang allerdings ohne dass sich ein industrielles Verfahren etablieren konnte. Die Ausarbeitung dieser biokatalytischen Wege sind unterstützt worden durch Untersuchungen zur Mikrobiologie der Darmflora und die Aufklärung der Stoffwechselwege, die zur Bildung sekundärer Gallensäuren führen (Kisiela et al., 2012; Ridlon et al., 2005). Eggert et al., (2014) geben einen detaillierten und aktuellen Überblick über die mikrobiellen und enzym-katalysierten Wege.

Die in der Literatur beschriebenen Ausgangsmaterialien für die biologische Synthese von UDCA sind CA und CDCA (Hayakawa, 1982; Kuhajda et al., 2006; Lepercq et al., 2004a; Riva et al., 1986). In Abbildung 9 sind die beiden wesentlichen Ausgangsverbindungen und das Produkt dargestellt.

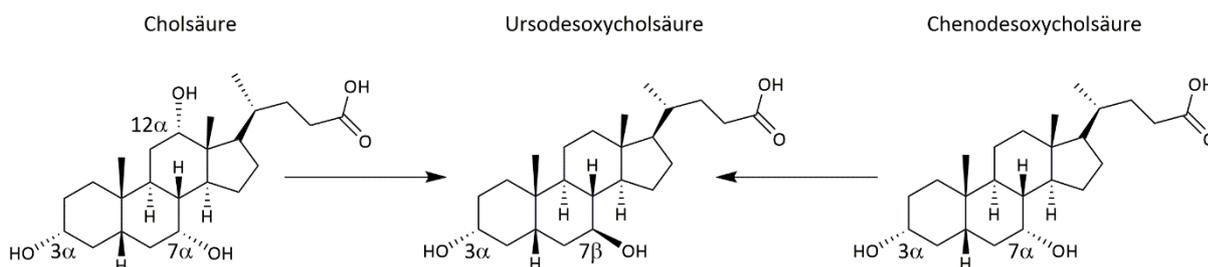


Abb. 9: Strukturen der Startmaterialien (Cholsäure und Chenodesoxycholsäure) sowie des gewünschten Produkts Ursodesoxycholsäure (UDCA).

Die Abbildung 9 verdeutlicht die Schwierigkeit der Synthese von UDCA. Zwar liegt die Hydroxylgruppe am C₃ in den beiden Ausgangsverbindungen CA und CDCA in der richtigen Konfiguration vor, aber ausgehend von CA muss zum einen die Hydroxylgruppe an C₁₂ entfernt werden, weiterhin müssen sowohl bei CA als auch CDCA die Hydroxylgruppe an C₇ epimerisiert werden, d.h. die α -ständige Gruppe muss in eine β -ständige überführt werden. Im Folgenden werden die bislang beschriebenen enzymatischen Syntheserouten kurz erläutert:

Synthese von UDCA ausgehend von CA

Für die Route ausgehend von CDCA muss zum einen die Hydroxylgruppe an C₇ epimerisiert werden sowie die Hydroxylgruppe an C₁₂ entfernt werden. Für die Epimerisierung muss ein oxidativer Schritt mit einem reduktiven Schritt kombiniert werden. Für die Entfernung der Hydroxylgruppe in 12-Position

Einleitung

bei Verwendung von CA als Startmaterial nutzt man in aller Regel die Wolff-Kishner-Reduktion, wobei in einem vorgelagerten Schritt die Hydroxylgruppe in eine Ketogruppe überführt werden muss. Das bedeutet aber auch, dass für eine Syntheseplanung die Reihenfolge der einzelnen Schritte berücksichtigt werden müssen. Hierfür wurden diverse Methoden entwickelt, um die Reaktionen voneinander zu trennen. Weiterhin wurden Synthesen entwickelt, die sowohl chemische als auch enzymatische Reaktionen vereinen.

Einer der ersten Ansätze wurde von Bovara et al. (1996) beschrieben. Als erstes wurden die Hydroxylgruppen an C₇ und C₁₂ von CA (12,5 mM) zur Ketogruppe mittels einer 7 α -HSDH aus *Clostridium absonum* sowie einer 12 α -HSDH aus *Clostridium* group P (Braun et al., 1991) oxidiert, gefolgt von einer Reduktion der C₇-Ketogruppe mit einer 7 β -HSDH ebenfalls aus *C. absonum*. Die oxidativen Schritte der 7 α - und 12 α -HSDH wurden gleichzeitig mit einer Glutamat-Dehydrogenase sowie α -Ketoglutarat zur Regeneration von NADP⁺ gekoppelt, während der reduktive Schritt mit einer Glucose-Dehydrogenase sowie Glucose zur Regeneration von NADPH gekoppelt wurde. Das Zwischenprodukt dieser Reaktion konnte mit einer Reinheit von ca. 90 % isoliert werden. Die Ausbeute von UDCA (nach der 7 β -Reduktion) betrug 88 % mit einer Reinheit von ca. 98 %. Der Enzym-katalysierte Oxidationsschritt wurde vom reduktiven Schritt mittels einer Ultrafiltrationsmembran in einem Enzymmembranreaktor getrennt, um eine ausreichende Konzentration an Cofaktor bzw. eine vollständige Redoxreaktion zu gewährleisten. Aufgrund der hohen Stabilität der Enzyme konnten diese für 8 weitere Zyklen recycelt werden.

Ein weiterer Ansatz wurde von Giovannini et al. (2008) unternommen. Hier wurden in einem mehrstufigen Verfahren zwei enzymatische sowie zwei chemische Schritte kombiniert angewendet, um UDCA zu gewinnen. Als erstes wurde die α -ständige C₁₂-Hydroxylgruppe enzymatisch oxidiert, um die dann gebildete Ketogruppe mittels Wolff-Kishner Reaktion zu entfernen. Der oxidative Schritt mittels einer 12 α -HSDH aus *Acinetobacter calcoaceticus* wurde gleichzeitig mit einer Laktat-Dehydrogenase (LDH) sowie Pyruvat zur Regeneration von NAD⁺ gekoppelt. Nach dem chemischen Schritt wurde die Oxidation der α -ständigen C₇-Hydroxylgruppe mittels einer 7 α -HSDH (ebenfalls aus *A. calcoaceticus*) durchgeführt. Durch Kopplung mit einer LDH wurde die Regeneration von NAD⁺ sichergestellt. Schließlich wurde UDCA durch einen chemischen Reduktionsschritt unter Verwendung von Natrium in wasserfreiem 2-Butanol gewonnen. Es konnte eine Gesamtausbeute von 70 % nachgewiesen werden.

Monti et al. (2009) untersuchten in einem „Eintopfverfahren“ mit 5 Enzymen die Biotransformation von CA zu UDCA. Die oxidativen Reaktionen wurden mit einer 7 α -HSDH aus *Bacteroides fragilis* sowie einer käuflich erworbenen 12 α -HSDH (Quelle unbekannt) durchgeführt und der reduktive Schritt mit einer 7 β -HSDH aus *C. absonum* umgesetzt. Die Trennung der oxidativen von den reduktiven Schritten

Einleitung

erlaubte die Nutzung aller beteiligten Enzyme in einem „Eintopfverfahren“. Dies ist möglich aufgrund der Coenzympezifität der eingesetzten Enzyme. Die Enzyme für den oxidativen Schritt sind strikt NAD⁺-abhängig, während für den reduktiven Schritt NADPH benötigt wird. Nach der Isolierung des Produktes konnte eine Ausbeute von 73 % nachgewiesen werden, ausgehend von einer Startkonzentration von 12,5 mM.

Synthese von UDCA ausgehend von CDCA

Die Synthese von UDCA (Ursodesoxycholsäure) ausgehend von CDCA (Chenodesoxycholsäure) hat den Vorteil, dass die Struktur dieser Verbindung sehr ähnlich zum gewünschten Produkt ist. Wie bei dem Startmaterial CA ist die Hydroxylgruppe an C₃ richtig konfiguriert. Des Weiteren hat CDCA aber den Vorteil, dass an C₁₂ weder eine Carbonyl- noch eine Hydroxylgruppe vorhanden ist, d.h. es muss lediglich die Hydroxylgruppe an C₇ einer α/β -Inversion unterzogen werden. Diese Epimerisierung wurde bisher weitreichend in Publikationen zur menschlichen Darmflora wie auch in einzelnen Stämmen beschrieben (Hirano et al., 1981; Kole and Altosaar, 1985; MacDonald et al., 1982).

Die einfachste Möglichkeit der Epimerisierung würde darin bestehen, in einer neutralen Redoxreaktion direkt den oxidativen und den reduktiven Schritt miteinander zu kombinieren, ohne dass externe Regenerierungsenzyme eingesetzt werden. Einzige Voraussetzung dafür ist, dass die Enzyme dieselbe Cofaktorspezifität besitzen. Pedrini et al. (2005) haben diesen Syntheseweg ausgehend von CDCA mit dem Stamm *Xanthomonas maltophilia* untersucht. Dieses Bakterium besitzt eine NADH-abhängige 7 α -HSDH, die die α -ständige Hydroxylgruppe an C₇ in eine Carbonylgruppe und diese dann durch die NADH-abhängige 7 β -HSDH in eine β -ständige Hydroxylgruppe überführt. Ausgehend von einer Startkonzentration von 14,5 mM CDCA konnte eine 75 %-ige Umsetzung erreicht werden. Durch Zugabe von 2-Hexanol konnte die Umsetzung dann auf 82 % erhöht werden, da die verfügbare Menge an NADH durch die Oxidation des 2-Hexanol erhöht wurde.

Synthese von UDCA ausgehend von DHCA

Die Verwendung von Dehydrocholsäure als Startmaterial, bei der in C₃, C₇ und C₁₂-Position nur Ketogruppen vorliegen, hat den Vorteil, dass für die enzymatischen Schritte nur Reduktionen an den C₃- und C₇-Positionen erforderlich sind. DHCA wird durch Oxidation (z.B. mit CrO₃) von CA gewonnen, eine Möglichkeit und wurde von Carrea et al. (1992) publiziert. Nach der Oxidation von CA erfolgten

Einleitung

die enzymatischen Schritte zum einen mit einer NADH-abhängigen 3 α -HSDH aus *C. testosteroni* (Grimm et al., 2000; Horinouchi et al., 2012) sowie einer NADPH-abhängigen 7 β -HSDH aus *C. absonum* (Macdonald and Roach, 1981). Die reduktiven Schritte wurden mit einer Glucose-Dehydrogenase sowie Glucose zur Regeneration von NADH und NADPH gekoppelt. Carrea et al. konnten mit einer Startkonzentration von 12,5 mM eine Produktausbeute der Vorstufe 12-Keto-UDCA, die mittels Wolff-Kishner Reaktion in UDCA umgewandelt werden kann, von 85 % bei einer Reinheit von 99 % nachweisen. Allerdings sind Konzentrationen in dieser Größenordnung für die Anwendung eines industriellen Verfahrens nicht geeignet.



2. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen verschiedene chemo-enzymatische Wege zur steroidal Verbindung Ursodesoxycholsäure (UDCA), ausgehend von Cholsäure (CA) oder Chenodesoxycholsäure (CDCA) entwickelt und vergleichend charakterisiert werden.

UDCA ist ein Therapeutikum, das unter anderem in der nicht-invasiven Behandlung von Gallensteinen Anwendung findet. Diese medikamentöse Behandlung stellt neben der operativen Entfernung der Gallenblase, die die gängigste Methode darstellt, eine für den Patienten schonende Alternative dar. Die Einnahme von UDCA hat sich als sehr effektiv erwiesen, um Gallensteine zu lysieren, da es geringe Nebenwirkungen aufweist. UDCA wird bis zu 8 - 10 mg/kg Körpergewicht und pro Tag verabreicht. Eine weitere Behandlung mit UDCA findet bei der primären biliären Zirrhose statt.

Die Herstellung von UDCA im industriellen Maßstab wird bislang nur chemisch ausgehend von Cholsäure durchgeführt. Der komplexe Aufbau des Steroidmoleküls erfordert allerdings eine kostenintensive und mehrstufige chemische Synthese. Diese Route beinhaltet das Einbringen als auch das spätere Abspalten von Schutzgruppen, um eine Stereo- und Regioselektivität der Reaktionen zu ermöglichen. Die Gesamtausbeute bewegt sich allerdings nur auf einem niedrigen Level von 9 bis 14 %. Ziel dieser Arbeit ist es, einzelne chemische Syntheseschritte durch enzymatische Umsetzungen zu substituieren; dabei ist zu erwarten, dass auf Grund der hohen Selektivität von Hydroxysteroid-Dehydrogenasen die Ausbeute beträchtlich gesteigert und auf Schutzgruppen verzichtet werden kann.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung von Syntheserouten, um aus den Vorstufen CA oder CDCA mittels enzymatischer Umsetzungen den aktiven Wirkstoff UDCA zu gewinnen. Das beinhaltet zudem auch die Bereitstellung und biochemische Charakterisierung diverser rekombinanter Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDHs) und Enzyme für die Coenzym-Regenerierung. Die Entwicklung eines Enzym-Baukasten durch die Klonierung bekannter, aber auch neuartiger HSDHs ermöglicht somit die Etablierung neuer Syntheserouten zu UDCA bzw. zur Vorstufe 12-Keto-UDCA, wie sie in Abbildung 10 dargestellt ist.

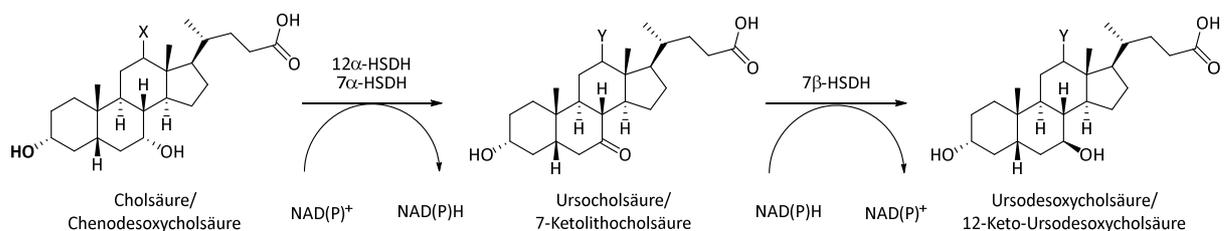


Abb. 10: Schema für die enzymatische Umwandlung von Cholsäure bzw. Chenodesoxycholsäure zu Ursodesoxycholsäure bzw. 12-Keto-Ursodesoxycholsäure bei gleichzeitiger Anwendung der 7 α -, 12 α - und 7 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDHs). 12-Keto-UDCA wird mittels Wolff-Kishner Reaktion weiter zu UDCA verarbeitet. X = H, Chenodesoxycholsäure; X = OH, Cholsäure; Y = O, 12-Keto-Ursodesoxycholsäure.

Aufgabenstellung

Zeigen sich bei den präparativen Umsetzungen Limitierungen der beteiligten Enzyme, soll im Rahmen dieser Arbeit auch versucht werden, diese durch *Protein engineering* aufzuheben oder die Eigenschaften deutlich zu verbessern.

Die Etablierung neuer Syntheserouten zur Gewinnung von UDCA kann entweder chemoenzymatisch oder rein enzymatisch aus den Verbindungen CA bzw. CDCA realisiert werden. Bei den chemoenzymatischen Synthesen sowohl von CA als auch von CDCA ausgehend hat es sich in Vorversuchen als vorteilhaft gezeigt, die entsprechenden Di- oder Triketoverbindungen als Substrat einzusetzen, diese Oxo-Verbindungen sind relativ einfach durch chemische Oxidation aller Hydroxylgruppen zu gewinnen. Das bietet den Vorteil, dass dann ausschließlich reduzierende enzymatische Schritte folgen, für die ein breites Spektrum an Cofaktor-regenerierenden Enzymen wie z.B. eine Glucose-, Formiat- oder auch Alkohol-Dehydrogenase zur Verfügung stehen. So kann z.B. die Triketo-Verbindung Dehydrocholsäure (DHCA), die aus einer chemischen Oxidation aus Cholsäure entsteht, mittels Enzymen so umgesetzt werden, dass sich die Vorstufe 12-Keto-ursodesoxycholsäure (12-Keto-UDCA) bilden lässt. 12-Keto-UDCA kann mittels der chemischen „Wolff-Kishner“-Reduktion zu Ursodesoxycholsäure (UDCA) umgewandelt werden (Abbildung 11).

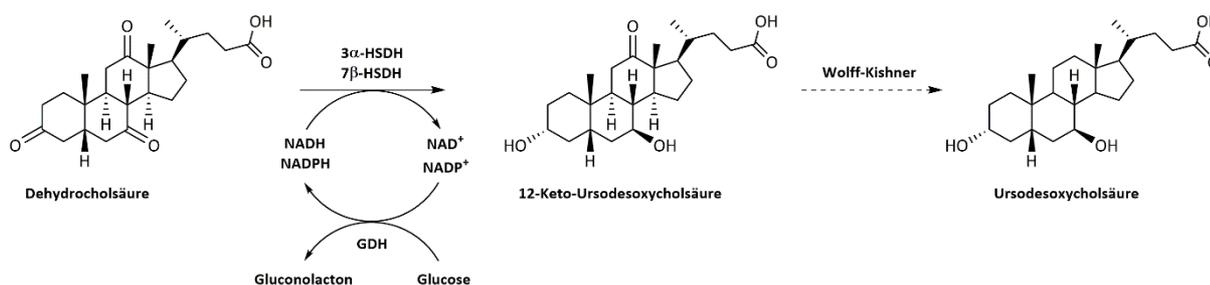


Abb. 11: Schema für die enzymatische Umwandlung von DHCA (Dehydrocholsäure) zu 12-Keto-Ursodeoxycholsäure bei gleichzeitiger Anwendung der 3 α - und 7 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDHs). 12-Keto-UDCA wird mittels Wolff-Kishner Reaktion weiter zu UDCA verarbeitet.

Ein alternativer Syntheseweg von UDCA geht von Chenodesoxycholsäure (CDCA) aus. Von CDCA auszugehen hat bei einer rein enzymatischen Synthese den Vorteil, dass die Hydroxylgruppe am C₃-Atom schon in der α -ständigen Position vorliegt und nur noch eine Epimerisierung, also die Überführung der α -ständigen Hydroxylgruppe in eine β -ständige, am C₇ Atom durchgeführt werden muss. Der Vorteil einer chemoenzymatischen Synthese, bei der primär die Diketo-Verbindung erzeugt wird, liegt darin, dass die gleichen Enzyme wie für die enzymatische Synthese von DHCA zu 12-Keto-UDCA genutzt werden können (Abbildung 11). Hier fällt dann die anschließende Wolff-Kishner Reduktion weg, da CDCA keine funktionelle Gruppe an Position 12 des Steroidgerüsts besitzt.

Ein weiteres Ziel der Arbeit besteht in der Entwicklung leistungsfähiger Expressionssysteme, die sowohl für rein enzymatische Umsetzungen als auch für Ganzzellbiotransformationen nützlich sind. Diese Daten erleichtern die Überführung der hier entwickelten Prozesse in den technischen Maßstab.

Aufgabenstellung

Dazu gehören auch die Optimierung der Konzentrationen an Gallensäuren und an Cofaktoren, die Definition eines optimalen pH- oder Temperaturbereichs und die Produktaufarbeitung.

Eine weitere Aufgabe bei der Entwicklung neuer Synthesewege zu UDCA stellt die Auswahl eines geeigneten Cofaktor-Regenerierungssystems dar. Angestrebt wird, im Idealfall „one-pot one-step“-Synthesen zu entwickeln. Die folgenden Arbeitsschritte geben eine Übersicht, welche Aufgaben bzw. Methoden zum Erreichen der Ziele eingesetzt werden sollen:

Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Wildtyp-Enzyme

- 3α -HSDH, 7β -HSDH, 12α -HSDH für die Steroid-Modifikationen
- Glucose-DH, Alkohol-DH und NADH-Oxidasen für die Cofaktor-Regenerierung
- Bestimmung von Michaelis-Menten-Konstanten und weiterer Enzymdaten
- Strukturaufklärung einzelner HSDHs

Entwicklung von Cofaktor-regenerierenden Systemen

- Klonierung von Enzymen zur Regenerierung des reduzierten Cofaktors
- Klonierung von Enzymen zur Regenerierung des oxidierten Cofaktors

Prozeß-Entwicklungen

- 12-Keto-UDCA aus CA oder DHCA
- UDCA aus CDCA oder Diketo-UDCA
- Jeweils mit isolierten Enzymen oder rekombinanten Ganzzell-Systemen (*designer cells*)

Abschließend soll im Rahmen der Diskussion ein Vergleich und eine Bewertung der verschiedenen Biotransformations-Prozesse durchgeführt werden.



II. Material & Methoden

3. Materialien

3.1. Allgemeines Material

Alle Gallensäuren wurden von PharmaZell GmbH bereitgestellt. Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien waren mindestens von p.a.-Qualität und wurden von Fluka, Sigma Aldrich, Carl Roth oder Acros Organics bezogen. Nährmedienbestandteile waren von Carl Roth oder Difco, die Coenzyme von Biomol. Restriktionsenzyme und alle weiteren Enzyme für die molekularbiologischen Arbeiten kamen von Thermo Scientific. Chemikalien für die molekularbiologischen Untersuchungen waren von höchster Qualität.

3.1.1. Mikroorganismen und Vektoren

Alle verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 3 und 4 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Wildtyp-Stämme. Der Stamm *Escherichia coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH wurde von PharmaZell zur Verfügung gestellt.

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK ⁻ mK ⁺), λ -
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) hdhA ⁻
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	DSM 20451
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 20205
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 20054

Tabelle 4: Verwendete rekombinante Stämme. Der Stamm *Escherichia coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH wurde als Expressionsstamm von PharmaZell zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Name	Plasmide
<i>E. coli</i> DB01	pDB5 (GDH2 + 7 β -HSDH) + pA_3 α -HSDH(2)
<i>E. coli</i> DB02	pDB4 (GDH2 + 3 α -HSDH) + pA_7 β -HSDH
<i>E. coli</i> DB03	pDB2 (7 β -HSDH + 3 α -HSDH) + pA_GDH2
<i>E. coli</i> DB04	pDB5 (GDH2 + 7 β -HSDH) + pDB6 (GDH2 + 3 α -HSDH)
<i>E. coli</i> DB05	pDB6 (GDH2 + 3 α -HSDH) + pDB2 (7 β -HSDH + 3 α -HSDH)
<i>E. coli</i> DB06	pET28a_CD7 α (N) + pA_7 β -HSDH [G39S/R64E]
<i>E. coli</i> DB07	pET28a_7 α -HSDH [D42G/I43R] + pA_7 β -HSDH [G39S/R64E]
<i>E. coli</i> DB08	pDB4b (GDH2 + 3 α -HSDH [T188A]) + pA_7 β -HSDH [G39S/R64E]
<i>E. coli</i> DB09	pDB9 (LbNOX + 7 β -HSDH) + pDB10 (7 α -HSDH + LkADH)
* <i>E. coli</i> DB10	pDB9 (LbNOX + 7 β -HSDH) + pDB10 (7 α -HSDH + LkADH)
<i>E. coli</i> DB11	pET28a_LpNOX[G178R/L179R] + pA_12 α -HSDH]

* = Hier wurde der unveränderte Wildtyp-Stamm *Escherichia coli* BL21(DE3) als Expressionsstamm verwendet.

Material & Methoden

Zur Expression sämtlicher Proteine wurden die Vektoren pET21a(+), pET28a(+), pETDuet1 und pACYCDuet verwendet. Die Gensequenzen wurden in die vorhandenen multiple cloning sites (MCS) kloniert, welche je unter der Kontrolle eines T7-Promotors und T7-Transkriptionsstarts stehen, sie besitzen einen lac-Operator und einen T7-Terminator. Die Expression wird mittels Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet und erzeugt wurden, sind in Tabelle 5 und 6 aufgeführt.

Tabelle 5: Eingesetzte Expressionsplasmide.

Plasmid	Genotyp	Herkunft
pET21a(+)		Novagen
pET28(+)		Novagen
pETDuet1		Novagen
pACYCDuet		Novagen

Tabelle 6: Expressionskonstrukte, die in der dieser Arbeit verwendet und erzeugt wurden. Es wurden nur die Konstrukte mit Wildtypgensequenzen und Fusionsproteine aufgeführt.

Plasmid	Genotyp	Herkunft
pET22b_3 α -HSDH	Gen der 3 α -HSDH aus <i>Comamonas testosteroni</i>	PharmaZell
pET22b_7 β -HSDH	Gen der 7 β -HSDH <i>Collensiella aerofaciens</i>	PharmaZell
pET22b_12 α -HSDH	Gen der 12 α -HSDH aus <i>Clostridium</i> sp. Group	PharmaZell
pET21a_3 α -HSDH(-)	Gen der 3 α -HSDH kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in pET21a(+)	diese Arbeit
pET21a_7 β -HSDH(-)	Gen der 7 β -HSDH kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in pET21a(+)	diese Arbeit
pET28a_3 α -HSDH(C)	Gen der 3 α -HSDH kloniert über <i>NcoI-BsaI/XhoI</i> in pET28a(+)	diese Arbeit
pET28a_3 α -HSDH(N)	Gen der 3 α -HSDH kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in pET28a(+)	diese Arbeit
pET28a_3 α -HSDH(3his)	wie 3 α -HSDH(+), nur 3 Histidine statt 6	diese Arbeit
pET28a_3 α -HSDH(9his)	wie 3 α -HSDH(+), nur 9 Histidine statt 6	diese Arbeit
pET28a_3 α -HSDH(Lys)	wie 3 α -HSDH(+), nur 6 Lysine statt 6 Histidine	diese Arbeit
pET28a_7 β -HSDH(C)	Gen der 7 β -HSDH kloniert über <i>NcoI/XhoI</i> in pET28a(+)	diese Arbeit
pET28a_12 α -HSDH(N)	Gen der 12 α -HSDH kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in pET28a(+)	diese Arbeit
pA_12 α -HSDH(MCS2)	Gen der 12 α -HSDH kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in pACYCDuet	diese Arbeit
pGDH	Gen der GDH2 kloniert über <i>NcoI/XhoI</i> in pETDuet1	bereitgestellt von A. Weckbecker
pA_GDH	Gen der GDH2 kloniert über <i>NcoI/XhoI</i> in pACYCDuet1	diese Arbeit
pA_G6PDH	Gen der P6GDH kloniert über <i>NcoI/XhoI</i> in pACYCDuet1	bereitgestellt von M. Muschalik
pA_7 β -HSDH	Gen der 7 β -HSDH kloniert über <i>NcoI/XhoI</i> in pACYCDuet1	diese Arbeit
pA_3 α -HSDH(2)	Gen der 7 β -HSDH kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in pACYCDuet1	diese Arbeit
pET28a_LbNOX(N)	Gen der NOX kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in pET28a(+)	diese Arbeit
pET28a_LsNOX(C)	Gen der NOX kloniert über <i>NcoI/XhoI</i> in pET28a(+)	diese Arbeit
pET28a_LpNOX(N)	Gen der NOX kloniert über <i>NcoI/XhoI</i> in pET28a(+)	diese Arbeit

Material & Methoden

(Fortsetzung der Tabelle 6)

Plasmid	Genotyp	Herkunft
pET28a_7 α -HSDH(-)	Gen der 7 α -HSDH aus <i>E. coli</i> kloniert über <i>NcoI/XhoI</i> in pET28a(+)	diese Arbeit
pET28a_7 α -HSDH(C)	Gen der 7 α -HSDH <i>E. coli</i> kloniert über <i>NcoI/XhoI</i> in pET28a(+)	diese Arbeit
pET28a_7 α -HSDH(N)	Gen der 7 α -HSDH <i>E. coli</i> kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in pET28a(+)	diese Arbeit
pET28a_Cd7 α -HSDH(C)	Gen der 7 α -HSDH aus <i>C. difficile</i> kloniert über <i>NcoI/XhoI</i> in pET28a(+)	diese Arbeit
pET28a_Cd7 α -HSDH(N)	Gen der 7 α -HSDH aus <i>C. difficile</i> kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in pET28a(+)	diese Arbeit
pDB01	Gen der 3 α -HSDH kloniert über <i>BamHI/HindIII</i> in MCS1 Gen der 7 β -HSDH kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in MCS2 pETDuet1	diese Arbeit
pDB02	Gen der 7 β -HSDH kloniert über <i>NcoI/NotI</i> in MCS1 Gen der 3 α -HSDH kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in MCS2 pETDuet1	diese Arbeit
pDB04	Gen der GDH2 kloniert über <i>EcoRI/NotI</i> in MCS1 Gen der 3 α -HSDH kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in MCS2 pETDuet1	diese Arbeit
pDB04	Gen der GDH2 kloniert über <i>EcoRI/NotI</i> in MCS1 Gen der 3 α -HSDH [T188A] kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in MCS2 pETDuet1	diese Arbeit
pDB05	Gen der GDH kloniert über <i>NcoI/NotI</i> in MCS1 Gen der 7 β -HSDH kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in MCS2 pETDuet1	diese Arbeit
pDB05b	Gen der GDH2 kloniert über <i>NcoI/NotI</i> in MCS1 Gen der 7 β -HSDH kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in MCS2 pETDuet1	diese Arbeit
pDB06	Gen der GDH2 kloniert über <i>EcoRI/NotI</i> in MCS1 Gen der 3 α -HSDH kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in MCS2 pACYCDuet1	diese Arbeit
pDB09	Gen der LbNOX kloniert über <i>NcoI/XhoI</i> in MCS1 Gen der 7 β -HSDH kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in MCS2 pETDuet	diese Arbeit
pDB10	Gen der 7 α -HSDH kloniert über <i>NcoI/NotI</i> in MCS1; Gen der LkADH kloniert über <i>NdeI/XhoI</i> in MCS2; pACYCDuet	diese Arbeit

Material & Methoden

3.2. Geräte

Analytik		
	HPLC LC-2010AHT-System	Shimadzu
Bildverarbeitung		
	Eagle Eye II	Stratagene
	Stella	Raytest
Desintegration		
	Ultraschallgerät Sonopuls HD 60	Bandelin
	French press	Thermo Scientific
Elektrophorese		
	DNA Elektrophoresekammer GT System	Bio-Rad
	Mini-Protean	Bio-Rad
Fermentation		
	Techfors	Infors HT
Inkubator		
	Multitron Standard	Infors HT
PCR		
	Mastercycler epGradient S	Eppendorf
	CFX96 Touch™ Real-Time cycler	Bio-Rad
Spektroskopie		
	UV/VIS-Spektralphotometer UV-1700	Shimadzu
	Nanodrop 2000c	Eppendorf/Peqlab
Rührer		
	Multirührer Ro 5	IKA Labortechnik
Zentrifugation		
	Sorvall RC5B Plus	Thermo Scientific
	Sorvall RC6 Plus	Thermo Scientific
	Tischzentrifuge Mikro 22 R	Thermo Scientific
	Tischzentrifuge Rotina 35 R	Thermo Scientific

4. Methoden

4.1. Mikrobiologische Methoden

4.1.1. Anzucht und Medien von Stämmen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Nährmedien nach Angaben der DSMZ hergestellt und vor Gebrauch durch Autoklavieren bei 2 bar und 121 °C für 21 min sterilisiert. Das MRS-Medium dagegen wurde nach Herstellerangaben nur für 12 min autoklaviert. Zur Herstellung fester Medien wurde 1,5 % Agar zugesetzt.

Für die Anzucht von *L. brevis* und *L. sanfranciscensis* wurde MRS-Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet:

MRS-Medium:	
Caseinpepton (trypt. verdaut)	10,0 g
Fleischextrakt	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Glucose	20,0 g
CH ₃ COONa	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
Tween 80	1,0 g
Diammoniumhydrogencitrat	2,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g
MnSo ₄ x H ₂ O	0,05 g
Destilliertes Wasser	ad. 1000 ml

pH: 6,2 bis 6,5

Die Kulturen wurden ohne zu schütteln bei 30 °C für und für 18 h angezogen.

Die Anzucht der verschiedenen *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium mit folgender Zusammensetzung.

LB (Luria-Bertani)-Medium	
Trypton	10,0 g
Hefextrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
Destilliertes Wasser	ad. 1000 ml

pH 7,5

Die Anzucht erfolgte bei 37 °C und 130 rpm für 18 h.

Material & Methoden

Weiterhin wurde der *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH-Stamm für die Genexpression in Auto-Induktions (AI)-Medium mit folgender Zusammensetzung angezogen:

Medium-Komponente

Casein-Hydrolysat	12,0 g
Hefextrakt	24,0 g
Glycerin	5,0 g
Destilliertes Wasser	ad. 800 ml

Puffer-Komponente

K ₂ HPO ₄	53,3 g
KH ₂ PO ₄	26,4 g
Destilliertes Wasser	ad. 500 ml

Zucker-Komponenten (separate Lösungen)

Glucose	50 g/L
Lactose	20 g/L

Für 1 L AI-Medium wurden 800 ml Medium-, 90 ml Puffer-, 10 ml Glucose- und 100 ml Lactose-Komponente zusammengegeben. Die Medium- und Puffer-Komponenten wurden vor Gebrauch wie beschrieben autoklaviert, nur die Zuckerkomponenten wurden vor Gebrauch steril filtriert. Die Anzucht erfolgte bei 15 °C und 130 rp, für 72 h.

4.1.2. Expression der Gene

Für die Ausbeute großer Proteinmengen wurde das T7-Expressionssystem verwendet. Bei dem T7-Expressionssystem stehen rekombinanten Zielgene unter der Transkriptionskontrolle eines Promotors aus dem Bakteriophagen T7 (Studier and Moffatt, 1986; Tabor and Richardson, 1985). Die Expressionsstämme für dieses System tragen eine Kopie des T7-RNA-Polymerase-Strukturgens im Chromosom integriert, das unter der Kontrolle eines induzierbaren lac-Promotors steht.

Zur Überexpression der in verschiedenen Plasmiden klonierten Gene in *E. coli* BL21(DE3) hsd⁻ (*E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH) wurden die Zellen unter Selektionsdruck bei 37 °C in LB-Medium inkubiert. Zunächst wurden Vorkulturen (VK) in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 130 rpm und 37 °C geschüttelt. Die Hauptkulturen (HK) wurden 1 bis 2 %ig mit der VK inokuliert und ebenfalls bei 130 rpm und 37 °C bebrütet. Die Expression der rekombinanten Gene in LB-Medium wurde nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 mit 0,5 mM IPTG induziert. Die HK der Expression in AI-Medium wurde nach Erreichen der OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 in den 15 °C Inkubator bebrütet. Die Zellen wurden nach Ernte durch Zentrifugation weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

4.1.3. Kultivierung von *Escherichia coli* im 15 L Rührkessel

Die Expression der 3α -HSDH, 7β -HSDH und der GDH erfolgte sowohl in Schüttelkolben als auch in einer Hochzelldichte-Fermentation, die in einem 40 L Fermenter von Infors durchgeführt wurde. Für die Anzucht im Rührkessel (15 L) wurde eine 5 ml Vorkultur hergestellt, mit der eine 100 ml Übernachtskultur (beide LB-Medium) inokuliert wurde. Mit der Übernachtskultur wurde dann das Batch-Medium angeimpft. Es wurde mit einer Satzphase begonnen, die nach Verbrauch der Kohlenstoffquelle, in ein Zulaufverfahren übergang. Die Induktion der heterologen Expression wurde durch Zugabe mit IPTG erreicht. Das gesamte Fermentationsmedium setzte sich somit aus dem Batch- und dem Fermentations-Medium zusammen.

Die Komponenten für das Batch-Medium setzen sich wie folgt zusammen:

0,2 g L⁻¹ NH₄Cl; 2 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 13 g L⁻¹ KH₂PO₄; 10 g L⁻¹ K₂HPO₄; 6 g L⁻¹ NaH₂PO₄ H₂O; 3 g L⁻¹ Hefeextrakt, 2 g L⁻¹ β -D Glucose; 1 g L⁻¹ MgSO₄ 7 H₂O; 0,25 % Vitaminlösung (0,1 g L⁻¹ Riboflavin; 10 g L⁻¹ Thiamin-HCl; 0,5 g L⁻¹ Nicotinsäure; 0,5 g L⁻¹ Pyridoxin-HCl; 0,5 g L⁻¹ Calcium-Phantotenat; 0,001 g L⁻¹ Biotin; 0,002 g L⁻¹ Folsäure; 0,01 g L⁻¹ Cyanocobalamin); 0,16 % Spurenelementlösung (10 g L⁻¹ CaCl₂ * 2H₂O; 0,5 g L⁻¹ ZnSO₄ * 7H₂O; 0,25 g L⁻¹ CuCl₂ * * 2H₂O; 2,5 g L⁻¹ MnSO₄ * H₂O; 1,75 g L⁻¹ CoCl * 6H₂O; 0,125 g L⁻¹ H₃BO₃; 2,5 g L⁻¹ AlCl₃ * 6H₂O 2; 0,5 g L⁻¹ FeSO₄ * 7H₂O) und 0,1 g L⁻¹ Thiamin.

Die Komponenten für das Fermentations-Medium setzen sich wie das Batch-Medium zusammen, davon abweichend wurden 18 g L⁻¹ Hefeextrakt; 600 g L⁻¹ β -D Glucose und 10 g L⁻¹ MgSO₄ 7 H₂O eingesetzt.

Satzphase

Die Kultivierung der Stämme *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH pET21a_3 α -HSDH, *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH pET21a_7 β -HSDH und *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH pGDH2 wurde nach einem Standard Hochzelldichtefermentationsprotokoll durchgeführt. Nach der Zugabe des Batch-Medium und des entsprechenden Antibiotika (80 mg L⁻¹ Ampicillin) wurde die Fermentation mit einer Vorkultur 1 %ig (v/v) angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Rührerdrehzahl und Sauerstoffeintrag wurden so angepasst, dass ein Sauerstoffpartialdruck von 30 % nicht unterschritten wurde. Die maximalen Werte betragen 800 rpm Rührerdrehzahl und 5 L ml⁻¹ Lufteintrag. Bei Bedarf wurde ein Überdruck von bis zu 1 bar angelegt. Während des Prozesses wurden pH, Sauerstoffpartialdruck, Druck und die Zugabe an Fermentations-Medium erfasst und dokumentiert. Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 erfolgte unter Verwendung von 25 % Ammoniakwasser und 85 % Phosphorsäure.

Material & Methoden

Zulaufphase

Sobald die vorgelegte C-Quelle verbraucht war, wurde die Feedlösung mit 600 g L⁻¹ Glucose computergesteuert zugesetzt. Der Verbrauch an Glucose kann durch den Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks festgestellt werden. In der Zulaufphase wurde die Temperatur auf 30 °C reduziert und der Sauerstoffpartialdruck wurde mittels Rührerdrehzahl auf 30 – 40 % eingestellt.

Expressionsphase

Die Induktion der Expression erfolgte innerhalb der Zulaufphase durch 2 mM IPTG. Nach ca. 12 Stunden wurden die Zellen geerntet und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

4.1.4. Konservierung der Bakterienstämme

Für eine Konservierung über längere Zeiträume wurden die Bakterienstämme bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in 5 ml des empfohlenen Mediums angezogen. Aliquots von 700 µl wurden entnommen, mit 300 µl sterilem Glycerin versetzt, durchmischt und bei -80 °C gelagert.

4.2. Biochemische Methoden

4.2.1. Gewinnung von Rohextrakt

Die durch Zentrifugation geernteten Zellen wurden mit 50 mM KPi-Puffer pH 8,0 auf 20 bis 25 %ige Zellsuspensionen verdünnt und entweder im Ultraschalldesintegrator oder mittels French press aufgeschlossen. Der Aufschluss mit Ultraschall wurde bei einer Intensität zwischen 20 bis 30 % und einem Puls von 50 % dreimal 1 min mit jeweils 1 min Pause durchgeführt. Der Aufschluss mit French press wurde bei einem Druck von ca. 200 bar und drei Durchgängen durchgeführt.

Nach dem Aufschluss wurden die aufgeschlossenen Zellen für 5 min bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde anschliessend bei 20000 g für 30 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt) wurde abgenommen und das Pellet (inclusion bodies) in 6 M Harnstoff gelöst und für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

4.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt von Enzymlösungen wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Die Kalibriergerade wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt. Der Proteingehalt wurde durch Messung der Absorption bei 595 nm bestimmt.

4.2.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Überprüfung von Proteinproben unterschiedlicher Reinheitsgrade auf Zusammensetzung und Homogenität sowie die Kontrolle der Expressionsleistung erfolgte über Gelelektrophorese. Der Zusatz von SDS bewirkt die Denaturierung der Proteine. Die Proteine erhalten proportional zu ihrer Größe eine negative Ladung und können im Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Das Gießen der Gele mit unterschiedlichen Acrylamid-Konzentrationen erfolgte nach den Methoden von Laemmli (Laemmli, 1970).

Für ein 15 %iges SDS-PAGE-Gel wurden zunächst 2,5 ml Acrylamid, 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 1,2 ml dest. Wasser, 50 µl 10% (w/w) Natriumdodecylsulfat, 5 µl Tetramethylethyldiamin und 50 µl 10 % (w/w) Ammoniumpersulfat in die Apparatur gegossen, mit Isopropanol überdeckt und gewartet, bis die Polymerisation beendet war. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel, das zusammengesetzt war aus 0,415 ml Acrylamid, 0,65 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 1,4 ml dest. Wasser, 25 µl 10 % (w/w) Natriumdodecylsulfat, 5 µl Tetramethylethyldiamin und 25 µl 10 % (w/w) Ammoniumpersulfat besteht, auf das Trenngel gegossen.

Die zu untersuchenden Proteine wurden mit SDS-Gel-Ladepuffer (300 mM Tris-HCl, pH 6,8, 50 % (v/v) Glycerin, 10 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,05 % (v/v) Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert. Es wurden 10 µl der Probe, entsprechend einer Proteinkonzentration von 10 µg bzw. 15 µg, pro Geltasche aufgetragen. Als Marker wurde der SeeBlue® Pre-Stained Protein Standard (Thermo Scientific) verwendet.

Das Gel wurde 10 min bei 100 mV in SDS-Laufpuffer gefahren, bis die Proben vollständig aus dem Sammelgel ausgelaufen waren. Daraufhin wurde die Spannung auf 200 mV erhöht. Nach ca. 30 min wurde das Gel mit Färbelösung (3.3.4.) gefärbt. Das SDS-Gel wurde mit dem Videosystem Stella (Raytest) dokumentiert.

4.2.4. Coomassie-Färbung von Proteinen

Die Coomassie-Färbung von Proteinen auf Gelen erfolgte laut Vorschrift mittels der Coomassie G-250 Färbelösung SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen).

4.2.5. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitäten wurden mit Hilfe eines Küvetten-Photometers gemessen. Die Aktivitätsbestimmung der Enzyme beruhte auf der photometrisch gemessenen Abnahme bzw. Zunahme der NAD(P)H-Menge bei 340 nm. Die Messungen erfolgten bei 25 °C über einen Zeitraum von 30 Sekunden. Der molare Extinktionskoeffizient für NAD(P)H beträgt $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Extinktionsänderung wurde anschließend für den linearen Anfangsbereich ermittelt und die Aktivität basierend auf dem Lambert-Beer-Gesetz berechnet:

$$A = \frac{\Delta E * V}{\epsilon * d * v}$$

mit	A:	Enzymaktivität [$\text{U ml}^{-1} = \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$]
	ΔE :	Extinktionsänderung pro Minute [min^{-1}]
	V:	Volumen des Ansatzes [ml]
	ϵ :	molarer Extinktionskoeffizient [$\text{L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
	d:	Schichtdicke [cm]
	v:	Enzymvolumen [ml]

Die Aktivität wird wie folgt definiert: 1 U des Enzyms entspricht der Enzymmenge, welche die Umsetzung von $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ eines Substrates katalysiert.

Bestimmung der 3 α -HSDH-Aktivität

Bei der Reduktion der Gallensäure (DHCA, 3,12-Diketo-UDCA, 3,7-Diketo-UDCA) durch die NADH-abhängige 3 α -HSDH wird NADH oxidiert. Die Aktivitätsbestimmung der HSDH beruht auf der photometrisch gemessenen Abnahme der NADH-Menge.

Der Ansatz enthielt 100 μl 100 mM DHCA und 10 μl Enzymlösung in 50 mM KPi-Puffer, pH 8,0. DHCA ist als 0,1 M Stammlösung in 50 mM Puffer pH 8,0 gelöst worden. Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 1 ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 16 μl 12,5 mM NADH-Lösung gestartet.

Material & Methoden

Bestimmung der 7 β -HSDH-Aktivität

Die Aktivität der 7 β -HSDH wurde ebenfalls durch die Messung der Abnahme des Cofaktors NADPH bestimmt. Der Ansatz enthielt 100 μ l 100 mM Gallensäure (DHCA, 7-KLCA, 3,7-Diketo-UDCA) und 10 μ l Enzymlösung in 50 mM KPi-Puffer, pH 8,0. Die Gallensäure wurde als 0,1 M Stammlösung in 50 mM KPi pH 8,0 gelöst. Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 1 ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 16 μ l 12,5 mM NADPH-Lösung gestartet.

Bei den NAD⁺-abhängigen Mutanten (G39D, G39E, G39D/R40I, G39D/R40L, G39D/R40W) wurde NADH statt des eigentlichen Cofaktor NADPH eingesetzt.

Bestimmung der 7 α -HSDH-Aktivität

Bei der Oxidation von Gallensäuren (DHCA, CA, CDCA) durch die NAD⁺-abhängige 7 α -HSDH aus *E. coli* bzw. durch die NADP⁺-abhängige 7 α -HSDH aus *C. difficile* wird NAD(P)⁺ reduziert. Die Aktivitätsbestimmung der HSDH beruht auf der photometrisch gemessenen Zunahme der NAD(P)H-Menge.

Der Ansatz enthielt 100 μ l 100 mM Gallensäuresalz und 20 μ l 25 mM NAD(P)⁺-Lösung in 50 mM KPi-Puffer, pH 8,0. Die Gallensäuren wurden jeweils als 0,1 M Stammlösung in 50 mM KPi pH 8,0 gelöst. Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 1 ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l Enzymlösung gestartet.

Bestimmung der Aktivität der Glucose-Dehydrogenase (GDH)

Die Ermittlung der GDH-Aktivität beruhte auf der photometrischen Messung des bei der Reaktion entstandenen NAD(P)H bei 340 nm. Der Testansatz setzte sich zusammen aus 50 mM KPi-Puffer pH 8,0, 100 mM D-Glucose und 0,5 mM NAD(P)⁺ auf 1 ml. Die Glucose wurde als 1,5 M Stammlösung in dest. Wasser gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l Enzymlösung gestartet.

Bestimmung der G6PDH-Aktivität

Die Aktivität der G6PDH wurde ebenfalls durch die Messung des entstandenen NADPH gemessen. Der Ansatz setzte sich zusammen aus 50 mM KPi-Puffer pH 8,0, 100 mM Glucose-6-phosphat und 0,5 mM NADP⁺ auf 1 ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l Enzymlösung gestartet.

Material & Methoden

Bestimmung der NOX-Aktivität

Die Ermittlung der NOX-Aktivität beruhte auf der photometrisch gemessenen Abnahme des bei der Reaktion oxidierten NAD(P)H. Der Ansatz setzte sich zusammen aus 50 mM KPi pH 7,0 und 16 μ l NAD(P)H-Lösung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l Enzymlösung gestartet.

4.2.6. Proteinaufreinigung

4.2.6.1. Mittels Histidin-Fusionsproteinen

Die Proteinaufreinigung geschah mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) nach (Porath et al., 1975). Dabei handelt es sich um eine Affinitätschromatographie, welche zu den selektivsten Trennmethoden von Biomolekülen zählt. Sie beruht auf einer spezifischen und umkehrbaren Wechselwirkung eines Liganden und des gewünschten Moleküls. Im Falle der immobilisierten Metallaffinitätschromatographie wurden Proteine am C- oder N-Terminus mit einer exponierten Polyhistidin-Abfolge versehen, welche Nickelionen (Ni^{2+}) komplexieren. Die Ionen sind in eine hochvernetzte Agarosematrix des Säulenmaterials integriert. Die Elution erfolgte durch Verdrängung, in diesem Fall mittels Imidazol.

Die Reinigung der Proteine erfolgte nach der Expression der korrespondierende Gene in dem Vektor pet28a im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH. Nach der Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und das Pellet in Lysis-Puffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8) resuspendiert, so dass eine 20 %ige (w/v) Zellsuspension entstand. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und die unlöslichen Komponenten durch Zentrifugation abgetrennt. Der als Überstand erhaltene Rohextrakt wurde anschließend mit einer mindestens 5 Säulenvolumen equilibrierten (waschen mit 5 Volumen dest. Aqua sowie Lysis-Puffer) „ Ni^{2+} -NTA“ Tropfsäule (4 ml Säulenvolumen, MCLAB (San Francisco)) vermischt und für ca. 10 min inkubiert. Die Säule wurde anschließend mit Wasch-Puffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8) 5-mal gewaschen, um unspezifisch gebundene Fremdproteine zu entfernen. Es erfolgte die Elution mit Elutions-Puffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8). Das aufgefangene Eluat wurde anschließend entsalzt und aufkonzentriert (Kapitel 4.2.7.) und die Reinheit der Enzympräparationen wurde anschließend mittels SDS-PAGE untersucht.

Material & Methoden

4.2.6.2. Chromatographische Reinigung

Die Reinigung der 3 α -HSDH ohne 6xHis-Tag erfolgte nach der Expression des Gens in dem Vektor pet21a_3 α -HSDH(-) im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH an einer Äkta-Purifier. Nach der Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und das Pellet in 50 mM TRIS/HCl pH 9,0 resuspendiert, so dass eine 20 %ige (w/v) Zellsuspension entstand. Die Aufreinigung des nicht His-getaggt Proteins erfolgte über einen Anionentauscher. Hierzu wurde eine Q-Sepharose-Säule (GE Healthcare Life Science) mit 30 ml Säulenvolumen verwendet. Äquiliert wurde die Säule mit 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 9). Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten steigender Ionenstärke bis 1 M NaCl. Auf Grund ihrer negativen Ladung von Proteinen bei pH-Werten über dem jeweiligen isoelektrischen Punkt binden diese aufgrund ionischer Wechselwirkung an das Säulenbett. Die Startbedingung waren 100 % 50 mM Tris-HCl, pH 9 (Eluent A) und die Endbedingung 100 % 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 9 (Eluent A). Das Gesamtvolumen betrug 300 ml. Die Flussgeschwindigkeit betrug 4 ml/min. Als Startpuffer wurde hier 50 mM TRIS/HCl (1 M NaCl, pH 9,0) verwendet und als Elutionspuffer 50 mM TRIS/HCl (pH 9,0). Die positiven Fraktionen wurden wieder gepoolt, mittels Photometertest getestet und dann mit 50 mM KPi-Puffer pH 8 umgepuffert. Die aufgefangenen Fraktionen wurden anschließend zusammengeführt und aufkonzentriert sowie entsalzt (Kapitel 4.2.7.). Die Reinheit der Enzympräparation wurde anschließend mittels SDS-PAGE untersucht.

4.2.7. Entsalzen und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Das Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen erfolgte mittels PD10-Säulen nach Anleitung des Herstellers (GE Healthcare). Die PD10 Säulen sind mit Sepharose G25 beladen. Das Aufkonzentrieren erfolgte in Vivaspin 20 Zentrifugations-Einheiten (Sartorius). Die Membranen besaßen eine Ausschlussgrenze von 10 kDa.

4.2.8. Bestimmung von K_M und v_{max}

Für die heterolog als auch homolog exprimierten Gene wurde mit den verschiedenen Gallensäuren kinetische Messungen durchgeführt. Für die Messungen wurde der Standardassay (3.3.5.) mit aufgereinigter Proteinlösung als auch teilweise Rohextrakt und den jeweiligen Konzentrationsreihen der verschiedenen Substrate durchgeführt. Für die 7 α -HSDH aus *Clostridium difficile* wurde der Assay verändert. Die Messungen wurden bei 30 °C durchgeführt.

Material & Methoden

Die Auswertung der kinetischen Konstanten zur Ermittlung von K_M und v_{max} erfolgte mittels nichtlinearen Regression an die hyperbole Kurve der Michaelis-Menten-Gleichung:

$v = (v_{max} * [S]) / (K_M + [S])$ (Briggs and Haldane, 1925; Michaelis and Menten, 1913) mit Hilfe des Programms „Graphpad Prism“ (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA).

4.2.9. Thermal-shift-assay (Thermofluor)

Der Einfluss des His-Tags auf die 3α -HSDH aus *C. testosteronei* als auch zur Charakterisierung der 7β -HSDH erfolgte durch die Methode „Thermofluor“ (Pantoliano et al., 2001). Die Methode ist auch unter den Namen „Thermofluor screen“ bekannt, die Methode zur Charakterisierung der Proteine wurde von Boivin weiter entwickelt (Boivin et al., 2013).

Das Protein wird in einem RT-PCR Cycler langsam in Anwesenheit eines Farbstoffes (SYPRO® Orange, Invitrogen) erhitzt, der sensitiv an die frei werdenden hydrophoben Bereiche des Proteins bindet. Der Farbstoff hat ein Absorptionsmaximum von 575 nm und wird bei 485 nm angeregt.

Die Proteinkonzentration der aufgereinigten Proteine betrug ca. 2 mg ml⁻¹ und die Schmelzpunkte wurden in verschiedenen Puffersystemen und unterschiedlichen pH-Werten ermittelt. Das Schema des Screenings wurde von Boivin übernommen. 2 µl Enzym wurden mit 2 µl 62x SYPRO® Orange in 25 µl Endvolumen eingesetzt. Der Assay wurde in 96-Well Format durchgeführt, die vorsichtig mit einer adhäsiven Folie beklebt wurde und anschliessend für 5 min bei 1000 g und 4°C zentrifugiert wurde. Die Proben wurden in einem RT-PCR Cycler (Bio-Rad) platziert und die Proben wurden von 4°C auf 95°C mit einer Aufheizrate von 1°C min⁻¹ erhitzt. Die Emission der Fluoreszenz wurde alle 5 Sekunden bei 530 nm gemessen. Die Kurven wurden mittels CFX™ Manager Software (BioRad) berechnet, die auf der 1. Ableitung nachfolgender Gleichung basieren:

$$x = \frac{-d(RFU)}{dT}$$

d = 1. Ableitung

RFU = relative Fluoreszenzeinheit

T = Temperatur

4.3. Molekularbiologische Methoden

4.3.1. Isolation von genomischer DNA

Die Isolierung von genomischer rDNA aus *L. brevis* und *L. sanfranciscensis* erfolgte mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit der Firma QIAGEN (Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 200 µl dest. Wasser eluiert und bei -20 °C gelagert.

4.3.2. Polymerasekettenreaktion

Die PCR dient zur *in vitro* Amplifikation von DNA. Dafür ist eine Matrizen-DNA (Template) sowie eine thermostabile DNA-Polymerase notwendig. Die Reaktion erfolgt in drei sich wiederholenden Schritten (three step): Denaturierung der Template-DNA, Hybridisierung der Primer mit der Template-DNA und ausgehend von den Primern die 5' → 3' Polymerisation der neuen DNA. Bei einer two-step PCR entfiel aufgrund der hohen Schmelztemperatur der Primer die Hybridisierung mit der Template-DNA. In dieser Arbeit wurde die hauseigene hergestellte Pfu DNA Polymerase oder die Phusion (Thermo Scientific) verwendet. Der typische Reaktionsansatz ist in Tabelle 7 beschrieben.

Tabelle 7: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes.

Komponente	Menge
Template DNA	40 – 400 ng
Polymerase	5 U
Polymerase Puffer (10x/5x)	5 µl/10 µl
dNTPs	0,2 mM
Forward Primer	20 pmol
Reverse Primer	20 pmol
DMSO	2,5 µl
dest. Wasser	add to 50 µl

Die Durchführung erfolgte in einem Eppendorf Thermocycler. Das verwendete Protokoll bei Einsatz der Pfu-Polymerase ist in Tabelle 8 beschrieben.

Tabelle 8: PCR-Programm bei Verwendung der Pfu-Polymerase. Die Annealing-Temperatur hängt von den Schmelzpunkten der Primer ab. Die Schritte 2 bis 4 wurden 30-mal wiederholt.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1. Initialdenaturierung	95°C	2 min
2. Denaturierung	95°C	0,5 min
3. Annealing	($T_m - 4^\circ\text{C}$)	1 min
4. Elongation	68°C	1,75 min
5. Finale Elongation	68°C	10 min
6. Kühlung	12°C	∞

Material & Methoden

Bei Verwendung der Phusion-Polymerase wurde eine abgeänderte Methode verwendet, die in Tabelle 9 beschrieben ist.

Tabelle 9: PCR-Programm bei Verwendung der Phusion-Polymerase. Die Annealing-Temperatur hängt von den Schmelzpunkten der Primer ab. Die Schritte 2 bis 4 wurden 30 mal wiederholt.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1. Initialdenaturierung	98°C	2 min
2. Denaturierung	98°C	0,5 min
3. Annealing	($T_m + 3^\circ\text{C}$)	0,5 min
4. Elongation	72°C	0,5 min
5. Finale Elongation	72°C	10 min
6. Kühlung	12°C	∞

Die Dauer der Extensionsreaktion hängt von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Bereichs ab. Die Primerannealing-Temperatur hängt von der Nukleotidsequenz der eingesetzten Primer ab:

$$T_m = 2 \times \Sigma A/T + 4 \times \Sigma G/C = x^\circ\text{C}.$$

4.3.3. Kolonie-Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Kolonie-Polymerasekettenreaktion kann der erfolgreiche Einbau eines gewünschten Inserts nach Ligation in den Vektor untersucht werden oder eine Amplifizierung des Zielgens ohne Isolierung der genomischen DNA durchgeführt werden. Hierzu wurde eine PCR, wie in 3.4.2 beschrieben, durchgeführt, wobei statt Template-DNA ein Abstrich einer Einzelkolonie auf einer Agarplatte in den PCR-Ansatz im Reaktionsgefäß gerührt wurde und die initiale Denaturierung auf 5 bis 10 min erhöht wurde. Als Primer zur Amplifikation wurden die zur Klonierung verwendeten Oligonukleotide verwendet. Dadurch können falsch-positive Ergebnisse minimiert werden, da der Ligationsansatz einen Überschuss an dem einzuführenden DNA-Fragment enthielt (Dallas-Yang et al., 1998). Anhand des Nachweises einer Bande, beziehungsweise deren Größe konnte auf ein erfolgreich eingebautes Fragment geschlossen werden.

Mittels Kolonie-PCR wurden das Gen der 7α -HSDH aus *E. coli* amplifiziert und zur Klonierung eingesetzt. Die weiteren Schritte wurden hierbei wie beschrieben in Kapitel 4.3.4. fortgesetzt.

4.3.4. Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in 1% igen Agarosegelen mit 0,5 fachen TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE) (2,5 fachen TBE-Puffer: 89 mM Tris, 89 mM H₃BO₃, 2,5 mM EDTA, pH 8,3). Die Herstellung der Gele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgten nach der Vorschrift von Sambrook (Sambrook and Green, 2012). Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen an DNA-Probenpuffer (10x DNA-Probenpuffer 10 x TBE pH 8,0, 50 % (v/v) Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau) versetzt. Den Agarosegelen wurde 0,05% (v/v) Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) (EtBr) zugesetzt. Die anschließende Visualisierung beruht auf der Interkalierung von EtBr in die doppelsträngige DNA. Dabei bildet EtBr einen Komplex, welcher bei einer Bestrahlung mit UV-Licht im sichtbaren Bereich fluoresziert ($\lambda = 312 \text{ nm}$). Die Agarosegele wurden mit dem Videosystem EagleEye II (Stratagene) dokumentiert. Als Größenstandard wurde die 1 kb DNA-Ladder (Thermo Scientific) verwendet. Die Stärke des angelegten Stroms betrug ca. 130 mA.

4.3.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem innuPREP DOUBLEpur Kit (Analytik Jena) laut Anweisung. Mit Hilfe dieses Kits wurde die DNA selektiv an eine Silicagel-Membran gebunden. Die DNA wurde mit 10 bis 20 μl dest. Wasser eluiert.

4.3.6. In-vitro Rekombination von DNA

Die hydrolytische Spaltung von DNA wurde mit Endonukleasen des Typs II nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden 2 bis 5 U eines Restriktionsenzym pro Reaktionsansatz ($\leq 50 \mu\text{l}$) verwendet und die Proben für mind. 2 h bzw. ü.N. inkubiert. Bei einer Restriktion mit zwei Enzymen wurde, wenn möglich, ein Puffer verwendet, in dem beide Enzyme eine hohe Aktivität besaßen. Um nach der ersten Restriktion die Pufferkomponenten sowie Endonukleasen aus der Probe zu entfernen, wurden diese aufgereinigt (3.4.5.). Die verwendete Ligase wurde nach den Vorgaben des Herstellers in den angegebenen Puffern verwendet. Bei der Ligation wurde ein molares Verhältnis von 1:3 (Vektor : Insert) eingesetzt, wobei der Quotient der DNA-Menge pro Größe [ng/kb] für beide Fragmente berücksichtigt wurde. Es kamen 10 U T4-DNA-Ligase zum Einsatz. Der Ligationsansatz wurde entweder für 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei +7 °C inkubiert.

Material & Methoden

4.3.7. Positionsgerichtete Mutagenese

Um gezielt Aminosäuren einer Proteinsequenz auszutauschen, wurde die positionsgerichtete Mutagenese angewendet. Dabei nutzt man Oligonukleotide, die komplementär zueinander sind und die gewünschte Mutation tragen. Als Templat dient N⁶-adeninmethylierte, doppelsträngige Plasmid-DNA, die das betreffende Insert enthält. Während eines PCR-Schritts werden die Primer komplementär zum Templat verlängert, wodurch Plasmide mit Strangbruch samt gewünschter Mutation entstehen. Die PCR-Ausbeute steigt bei diesem Verfahren nur linear, da die neugebildete DNA nicht als Templat benutzt werden kann.

Die entsprechenden Mutationen wurden durch QuikChange™-PCR nach Vorgaben des Herstellers Stratagene (La Jolla, CA, USA) gemäß Anleitung des „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ durchgeführt. Die Oligonukleotide (6.1.) wurden in der Regel so kreiert, dass sie eine Schmelztemperatur von ≥ 70 °C besaßen. Der typische Reaktionsansatz ist in Tabelle 10 beschrieben.

Tabelle 10: Zusammensetzung einer QuikChange™-PCR.

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
Template Plasmid-DNA	10 – 100 ng
Polymerase	5 U
Polymerase Puffer (10x/5x)	5 μ l/10 μ l
dNTPs	0,3 mM
Forward Primer	2 - 10 pmol
Reverse Primer	2 - 10 pmol
DMSO	2,5 μ l
dest. Wasser	add to 50 μ l

Das PCR-Programm sah wie folgt aus:

Tabelle 11: QC-PCR-Programm. Die Annealing-Temperatur hängt von den Schmelzpunkten der Primer ab. Die Schritte 2 bis 4 wurden 23 (Phusion) bzw. 20 (Pfu) mal wiederholt.

Reaktionsschritt	Phusion-Polymerase		Pfu-Polymerase	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
1. Initialdenaturierung	98°C	2 min	95°C	2 min
2. Denaturierung	98°C	0,5 min	95°C	0,5 min
3. Annealing	($T_m + 3^\circ\text{C}$)	0,5 min	($T_m - 3^\circ\text{C}$)	0,5 min
4. Elongation	72°C	2,5 min	68°C	10 min
5. Finale Elongation	72°C	10 min	68°C	10 min
6. Kühlung	12°C	∞	12°C	∞

Um parentale Plasmide zu verdauen, wurde der Ansatz nach Reinigung (3.4.5.) für 2 h oder über Nacht bei 37 °C mit *DpnI* inkubiert. Anschließend konnten die Ansätze nach 3.4.9. transformiert werden.

Material & Methoden

4.3.8. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach (Sambrook and Green, 2012). Die Herstellung von kompetenten Zellen wurde unter sterilen und gekühlten (auf Eis arbeiten) Bedingungen durchgeführt. Als erstes wurde eine Übernachtskultur von 5 ml LB-Medium in einem sterilen Reagenzglas von der Platte aus angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Hauptkultur mit 200 ml LB wurde in einem sterilen 1 L Kolben mit einer $OD_{600} = 0,05$ von der ü.N. - Kultur aus angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen der OD_{600} von 0,5 wurde die Kultur zu je 50 ml aliquotiert und für 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mittels Zentrifuge geerntet (10 min, 4 °C, 1750 g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in je 14 ml FB-Puffer (1,48 g KCl, 1,5 g $CaCl_2 \times 2H_2O$, 20,0 g Glycerin, 2 ml 1 M CH_3COOK , 200 ml dest. Wasser, pH 6,4) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 20 min auf Eis inkubiert und dann geerntet (20 min, 4 °C, 1750 g). Die Pellets wurden dann mit je 3,4 ml FB-Puffer resuspendiert und in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Die Lagerung geschah bei -80 °C.

4.3.9. Transformation von *E. coli*-Zellen

100 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und ca. 10 ng Plasmid-DNA zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 60 sec auf 42 °C erhitzt, nach weiteren 2 min auf Eis wurden 700 µl LB-Medium zugesetzt. Die phänische Expression erfolgte je nach Antibiotikaresistenz für 60 bis 180 min bei 37 °C. Die Zellen wurden auf Agarplatten mit Selektionsdruck ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Je nach Plasmid enthielten die Agarplatten Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml), Chloramphenicol (36 µg/ml) oder eine Mischung aus Ampicillin (80 µg/ml)-Chloramphenicol (30 µg/ml) als Selektionsmarker.

4.3.10. Präparation von Plasmid DNA

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des innuPREP™ Plasmid MiniPrep-Kit der Firma Analytik Jena (Jena) isoliert. Die Methode beruht in einer modifizierten Form der alkalischen Lyse der Bakterienzellen nach Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers, wobei mit 50 µL bis 100 µl H_2O eluiert und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren wurde.

4.3.11. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

DNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, was zur Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösungen verwendet werden kann. Zur Messung wurden 1 μL DNA-Lösung auf ein Spektralphotometer der Firma PEQLAB Biotechnologie (NanoDrop, Erlangen) gegeben und die optische Dichte (OD) bestimmt. Dabei entspricht eine OD von 1 einer Konzentration von $50 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 und 280 nm kann die Reinheit bewerten, da Proteine bei 280 nm ihr Absorptionsmaximum haben. Eine reine DNA-Lösung sollte einen Wert von 1,8 erreichen und nicht unter 1,5 liegen.

4.3.12. Sequenzierung von Plasmid DNA

Sämtliche Sequenzierungen wurden von der Firma LGC Genomics (Berlin) in Auftragsarbeit durchgeführt.

4.4. Chemische Alkoholoxidation

Für die chemoenzymatische Synthese von UDCA ausgehend von 3,7-Diketo-UDCA wurde CDCA mittels 4.4.1.) SWERN-Oxidation oder 4.4.2.) mit stöchiometrischen Mengen an Natriumhypochlorit oxidiert. Die Reinheit des gewonnenen 3,7-Diketo-UDCA wurde mittels HPLC bestimmt.

4.4.1. SWERN-Oxidation

In einem 1 L Dreihalskolben wurde Oxalylchlorid (70 mmol; 6,02 ml) in ca. 50 ml Dichlormethan (CH_2Cl_2) gelöst und mit einem Aceton/Trockeneis-Bad auf -78°C gekühlt. Über einen Tropftrichter wird binnen 5 min eine Lösung von Dimethylsulfoxid (130 mmol; 9,24 ml) in 15 ml CH_2Cl_2 zugetropft. Eine Lösung von CDCA (30 mmol; 11,78 g) in einem Gemisch aus CH_2Cl_2 /DMSO (insg. 30 ml [ca. 15 ml DMSO, Rest CH_2Cl_2]) wird über einen weiteren Tropftrichter binnen 5 min zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 15 min gerührt, anschließend wird mit Triethylamin (150 mmol; 21 ml 42 ml) versetzt, weitere 5 min gerührt und das Kältebad entfernt. Zu der auf RT erwärmten Reaktionsmischung werden 180 ml dest. H_2O gegeben und min 5 gerührt. Anschließend werden wässrige und organische Phase getrennt und die wässrige Phase mit 200 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden sukzessive mit je 250 ml 0,5 M HCl und dest. H_2O gewaschen, über NaSO_4 getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

4.4.2. Natriumhypochlorit-Oxidation

Die Chenodesoxycholsäure (10g, 24.5 mmol) wurden in einem 500 ml Dreihalskolben in Essigsäure (110 ml) bei 18°C gelöst. Zur daraus resultierenden braunen Lösung wurde innerhalb von 40 min Hypochlorit (35 ml, 2.66 Eq, 65.15 mmol) über einen Tropftrichter zugesetzt. Dabei wurde die Temperatur bei 7 -15 °C gehalten. Die milchige Suspension wurde anschließend weitere drei Stunden unter Kühlung gerührt. Zur Neutralisation des überschüssigen Hypochlorits wurde Natriumbisulfid-Lösung (20.4 mmol, 35 ml) dazu getropft. Die Temperatur wurde dabei wieder konstant bei 15°C gehalten. Es wurde weitere 45 min gerührt, dabei wurde die zunächst klare Lösung wieder leicht milchig. Nach Zugabe von dest. H₂O (160 ml) wurde eine milchige Suspension erhalten. Diese milchige Suspension wurde für 45 min. auf 70°C erhitzt, anschließend wurde innerhalb einer Stunde auf 20°C runtergekühlt. Das Produkt wurde an der Saugflasche filtriert mit ca. 600 ml dest. H₂O gewaschen und anschließend getrocknet.

4.5. Enzymatische Synthesen

4.5.1. Durchführung von Biotransformation mit isolierten Enzymen

Zur Synthese von 12-Keto-UDCA ausgehend von DHCA wurden die beteiligten Enzyme als Rohextrakt eingesetzt. Zur Regenerierung der Cofaktoren NADH und NADPH wurde die Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* eingesetzt. Die Ansätze erfolgten in einem Volumen von 5 ml bis 1000 ml. Die Inkubationstemperatur betrug 25 °C. Der pH-Wert der Reaktionsansätze für die Synthese von UDCA ein- als auch zweistufig) wurde in einem Bereich von 5,0 bis 8,0 in je 0,5er Schritten variiert. Die Zusammensetzungen der Ansätze im analytischen Maßstab sind in Tabelle 12 und die Ansätze in einem präparativen Ansatz in Tabelle 13 dargestellt.

Material & Methoden

Tabelle 12: Zusammensetzung der analytischen Reaktionsansätze mit isolierten Enzymen.

Edukt	Produkt	Zusammensetzung
DHCA	12-Keto-UDCA	100 – 200 mM KPi (pH 7,0); 0,1 – 0,5 mM NAD ⁺ bzw. NADP ⁺ ; 10 – 50 mM DHCA; 50 – 200 mM β -D-Glucose; 0,5 - 1,5 U ml ⁻¹ 3 α -HSDH; 0,5 – 1,5 U ml ⁻¹ 7 β -HSDH; 3 – 10 U ml ⁻¹ GDH
	3,12-Diketo-UDCA	100 – 200 mM KPi (pH 7,0); 0,1 – 0,5 mM NADP ⁺ ; 10 – 50 mM DHCA; 50 – 100 mM β -D-Glucose; 0,5 - 1,5 U ml ⁻¹ 7 β -HSDH; 3 – 10 U ml ⁻¹ GDH
	7,12-Diketo-UDCA	100 – 200 mM KPi (pH 7,0); 0,1 – 0,5 mM NAD ⁺ ; 10 – 50 mM DHCA; 0,5 - 1,5 U ml ⁻¹ 3 α -HSDH; 3 – 10 U ml ⁻¹ GDH
CDCA „zweistufig“	UDCA	50 – 100 mM KPi; 0,1 – 0,5 mM NAD ⁺ bzw. NADP ⁺ ; 10 – 50 mM CDCA; 0,5 - 1,0 U ml ⁻¹ 7 α -HSDH; 1,0 – 1,5 U ml ⁻¹ 7 β -HSDH; 10 U ml ⁻¹ LbNOX; 5 - 10 U ml ⁻¹ G6PDH
CDCA „einstufig“	UDCA	50 – 100 mM KPi; 0,1 – 0,5 mM NADP ⁺ ; 10 – 50 mM CDCA; 0,5 - 1,0 U ml ⁻¹ 7 α -HSDH; 1,0 – 1,5 U ml ⁻¹ 7 β -HSDH
3,7-Diketo-UDCA	UDCA	100-200 mM TEA (pH 7,5;8,0;8,5;9,0)/Tris-HCl (pH 7,5;8,0;8,5;9,0)/KPi (pH 7,0)/Zitronensäurepuffer (pH 6,0); 0,2 mM NAD ⁺ bzw. NADP ⁺ ; 10 – 40 mM 3,7-Diketo-UDCA; 50 – 200 mM β -D-Glucose; 0,1 mg 3 α -HSDH sowie 7 β -HSDH; 1 mg GDH

Tabelle 13: Zusammensetzung der präparativen Reaktionsansätze mit isolierten Enzymen. Der pH wurde durch Zugabe von 10 bis 20 %iger NaOH eines pH-Statens (Metrohm/SI-Analytik) konstant gehalten.

Edukt	Produkt	Zusammensetzung
DHCA	12-Keto-UDCA	50 mM KPi; 0,05 – 0,25 mM NAD ⁺ bzw. NADP ⁺ ; 50 – 100 mM DHCA; 0,5 - 1,5 U ml ⁻¹ 3 α -HSDH; 0,5 – 1,5 U ml ⁻¹ 7 β -HSDH; 3 – 10 U ml ⁻¹ GDH
	3,12-Diketo-UDCA	50 mM KPi; 0,1 – 0,25 mM NADP ⁺ ; 10 – 50 mM DHCA; 50 – 100 mM β -D-Glucose; 0,5 - 1,5 U ml ⁻¹ 7 β -HSDH; 3 – 10 U ml ⁻¹ GDH
	7,12-Diketo-UDCA	50 mM KPi; 0,1 – 0,25 mM NAD ⁺ ; 10 – 50 mM DHCA; 50 – 100 mM β -D-Glucose; 0,5 - 1,5 U ml ⁻¹ 3 α -HSDH; 3 – 10 U ml ⁻¹ GDH
3,7-Diketo-UDCA	UDCA	25 mM KPi (pH 7,0)/Zitronensäurepuffer (pH 6,0); 0,2 mM NAD ⁺ bzw. NADP ⁺ ; 20 – 40 mM 3,7-Diketo-UDCA; 100 – 250 mM β -D-Glucose; 0,1 mg 3 α -HSDH sowie 7 β -HSDH; 1 mg GDH

4.5.2. Durchführung von Biotransformation mit ganzen Zellen

Zur Synthese von 12-Keto-UDCA ausgehend von DHCA mittels Ganzzellbiokatalysatoren wurden die „designer bugs“ *E. coli* DB01 bis DB05 als auch DB08 eingesetzt. Für die Synthese von UDCA ausgehend von CDCA ohne Cofaktorregenerierung wurden die Ganzzellbiokatalysatoren *E. coli* DB06 bis 07 eingesetzt. Mit Cofaktorregenerierung wurden die GZKs *E. coli* DB09 als auch *E. coli* DB10 eingesetzt. Ausgehend vom Edukt 3,7-Diketo-UDCA wurde die GZKs *E. coli* DB02 sowie *E. coli* DB03 eingesetzt. Zur Synthese von 12-Keto-UDCA ausgehend von CA wurde der Ganzzellbiokatalysator *E. coli* DB10 mit anschließender Verwendung von *E. coli* DB11 eingesetzt. In Tabelle 6 sind die Plasmide aufgeführt, aus

Material & Methoden

denen der jeweilige rekombinante Expressionsstamm besteht. Die Zusammensetzungen der Ansätze sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der analytischen Reaktionsansätze mit Ganzzellbiokatalysatoren. GZK = Ganzzellbiokatalysator

Edukt	Produkt	Zusammensetzung
DHCA	12-Keto-UDCA	1 mg _(BFM) ml ⁻¹ GZK; 50 - 200 mM KPi (pH 7,0); 70 mM DHCA; 0,05 – 0,2 mM NAD ⁺ bzw. NADP ⁺ ; 200 mM β-D-Glucose
CDCA „interne Cofaktor-regenerierung“	UDCA	5 mg _(BFM) ml ⁻¹ GZK; 100 mM KPi (pH 6,0 – 8,0); 25 mM CDCA, 0,5 mM NADP ⁺
CDCA „externe Cofaktor-regenerierung“	UDCA	10 mg _(BFM) ml ⁻¹ GZK; 80 mM Zitronensäurepuffer (pH 6,0); 10 mM CDCA; 0,3 mM NAD ⁺ ; 0,6 mM NADP ⁺ ; 10 % Isopropanol
3,7-Diketo-UDCA	UDCA	5 mg _(BFM) ml ⁻¹ GZK; 100 mM Tris-HCl (pH 8,5); 20 bis 40 mM 3,7-Diketo-UDCA; 0,2 mM NADP ⁺ als auch NAD ⁺ ; 200 mM β-D-Glucose
CA	12-Keto-UDCA	<u>1. Stufe:</u> 10 mg _(BFM) ml ⁻¹ <i>E. coli</i> DB10; 80 mM Zitronensäurepuffer (pH 6,0); 10 mM CA; 0,3 mM NAD ⁺ ; 0,6 mM NADP ⁺ ; 10 % Isopropanol <u>2. Stufe:</u> 10 mg _(BFM) ml ⁻¹ <i>E. coli</i> DB11

4.6. Analytische Methoden

4.6.1. Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur qualitativen und quantitativen Analytik aller für die betrachteten Reaktionen beteiligten Gallensäuren wurde das HPLC-System LC-2010AHT (Shimadzu) bzw. Jasco verwendet. Die Trennung der Substanzen erfolgte mit Hilfe einer Umkehrphasen-Chromatographiesäule vom Typ Purospher STAR® RP-18e (5 μm) der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) und KINETEX der Firma Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland). Für die Säule von Merck wurde eine Gradientenelution und für die Säule der Firma Phenomenex ein isokratische Elution durchgeführt. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Acetonitril und phosphorsaurem Wasser (pH 2,6) eingesetzt. Letzteres diente dazu, einen einheitlichen Protonierungsgrad zu erhalten. Die Analyse der Substanzen erfolgte bei 25 °C (Purospher STAR) bzw. 30 °C (KINETEX) Ofentemperatur und die Detektion erfolgte mit einem UV-Sensor bei λ = 200 nm.

Material & Methoden

DHCA, 3,12-Diketo-UDCA, 7,12-Diketo-UDCA, 12-Keto-UDCA

Säule:	KINETEX
Flussrate:	2 ml/min, konstant 65% Eluent A/35% Eluent B
Probeninjektion:	2 µl
Retentionszeit:	12-Keto-UDCA: 0,8 min; 3,12-Diketo-UDCA: 1,1 min; 7,12-Diketo-UDCA: 1,3 min; DHCA: 1,7 min

RP-C₁₈ kurz (CDCA, 7-KLCA, UDCA)

Säule:	Purospher STAR®
Flussrate:	1 ml/min
Probeninjektion:	20µl
Gradient:	0 – 15 min konstant 40% Acetonitril, 15 – 17 min lineare Zunahme auf 90% Acetonitril, 17 – 27 min konstant 90% Acetonitril, 27 – 29 min lineare Abnahme auf 40% Acetonitril, 29 – 35 min konstant 40% Acetonitril
Retentionszeit:	UDCA: 8,0 min; 7-KLCA: 11,7 min; CDCA: 17,5 min

RP-C₁₈ lang (Reinheitsüberprüfung)

Säule:	Purospher STAR®
Flussrate:	1 ml/min
Probeninjektion:	20µl
Gradient:	0 – 15 min lineare Zunahme von 20% Acetonitril auf 35%, 15 – 53 min lineare Zunahme auf 70% Acetonitril, 53 – 75 min konstant 70% Acetonitril, 75 – 78 min lineare Abnahme auf 20% Acetonitril, 78 – 88 min konstant 20% Acetonitril

HPLC-System von Shimadzu

Retentionszeit:	12-Keto-UDCA: 13,0 min; 3,12-Diketo-UDCA: 13,5 min; 7,12-Diketo-UDCA: 15,6 min; DHCA: 17,0 min; 12-Keto-CDCA: 18,5 min; CA: 22,4 min; UDCA: 24,1; 7-KLCA: 26,7 min; CDCA: 31,1 min
-----------------	--

Material & Methoden

HPLC-System von Jasco

Retentionszeit: UDCA: 24,5 min; 3-Keto-UDCA:26,7 min; 7-KLCA: 27,5 min; 3,7-Diketo-UDCA:
29,7 min

4.6.2. Probenvorbereitung für HPLC

100 µl der zu untersuchenden Reaktionslösung wurde vor der Analyse auf einen pH von ca. 2 eingestellt und anschließend mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (90 %/10 %, v/v) so versetzt, dass ausgehend von der Substratkonzentration, eine 2,5 mM Konzentration eingestellt wurde. Um präzipitiertes Protein bzw. ganze Zellen zu entfernen, wurde die Proben für 20 min bei 20000 g und RT zentrifugiert.

4.6.3. Kalibrierung der HPLC

Die Auswertung der Biotransformation ausgehend von DHCA über 3,12-Diketo-UDCA und 7,12-Diketo-UDCA zu 12-Keto-UDCA erfolgte durch Referenzsubstanzen. Die gemessene Konzentration wurde aus dem gemessenen Umsatz einer Messprobe und der im Reaktionsansatz eingesetzten Gesamtkonzentration errechnet. Dies ist möglich, da die eingesetzten Salze der Gallensäuren einen Extinktionskoeffizienten ähnlicher Größenordnung besitzen.

Die Kalibrierung der CDCA, 7-KLCA, 3-KetoUDCA, 3,7-Diketo-UDCA und UDCA erfolgte über Referenzsubstanzen und Kalibriergeraden.

4.7. Computerprogramme und online Datenbanken

Im Folgenden werden häufig genutzte Datenbanken bzw. Software aufgeführt, welche für Recherchen, Sequenzvergleiche und Auswertungen dienen.

Allgemein

Microsoft Excel	Auswertung von Versuchen
CloneManager	Klonierungssoftware
Graphpad Prism	Programm für die Analyse von enzymkinetischen Daten

Grafiksoftware

Chimera	Programm zur Visualisierung und Untersuchung von Proteinstrukturmodellen
PJmol	Programm zur Visualisierung und Untersuchung von Proteinstrukturmodellen
Chemdraw	Program zur Visualisierung von chemischen Strukturen und Reaktionsgleichungen

Sequenzvergleiche

ClustalW2	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
ClustalOmega	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/

Modellierung

SWISS-Model	http://swissmodel.expasy.org/
Psipred	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/

Homologiesuche

Blast	http://www.uniprot.org/blast/
-------	---

Docking

3DLigandSite	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dligandsite/
SWISSDock	http://www.swissdock.ch

Proteindatenbanken

BRENDA-Enzyme	http://www.brenda-enzymes.info/
Uniprot	http://www.uniprot.org/
ExpASy	http://www.expasy.org/
EMBL-EBI	http://www.ebi.ac.uk

III. Ergebnisse

Der komplexe Aufbau des Steroidmoleküls erfordert eine für chemische Synthesen ungewöhnliche Vorgehensweise, wenn man eine ganz bestimmte Steroidstruktur herstellen will. Steroid-artige Zielmoleküle können nicht aus einfachen Molekülbausteinen aufgebaut werden, sondern man geht von kostengünstigen und in größeren Mengen verfügbaren, analogen Steroidverbindungen aus. Insofern steht die Frage nach einer solchen geeigneten Ausgangsverbindung am Anfang einer Syntheseplanung. Abhängig von der Ausgangsverbindung werden dann in aller Regel mehrstufige rein chemische Reaktionen, enzymatische Schritte oder eine Kombination beider Wege verwendet.

Ziel dieser Arbeit ist die Ausarbeitung einer industriell anwendbaren enzymatischen Synthese von Ursodesoxycholsäure (UDCA). Ausgangsverbindungen können Cholsäure (CA), Chenodesoxycholsäure (CDCA), Dehydrocholsäure (DHCA) und auch 3,7-Diketo-UDCA sein. Die beiden letzteren Gallensäuren entstehen durch eine chemische Oxidation aus CA bzw. CDCA. Das einzige rein chemische Verfahren geht von Cholsäure aus, es beinhaltet die Synthese von Intermediaten mit Schutzgruppen, die dann wieder entfernt werden müssen. Diese notwendigen Zwischenschritte resultieren in einer Vielzahl einzelner Teilschritte und in einer niedrigen Gesamtausbeute (Kanazawa et al., 1954) (siehe Kapitel 1.5.6. Abbildung 8). Alle anderen Synthesewege nutzen für die wesentlichen regio- und stereoselektiven Teilschritte Enzyme oder Mikroorganismen mit geeigneten Enzymen. Diese mikrobiellen Biotransformationen haben sich auch für den Bereich der Steroidmodifikation als ein leistungsfähiges Werkzeug zur Erzeugung von Pharmaka, die Steroide als Grundsubstanz enthalten, bewährt (Donova and Egorova, 2012).

In dieser Arbeit wurden 4 verschiedene Wege vergleichend untersucht:

1) Synthese ausgehend von Cholsäure

- Ein chemoenzymatischer Syntheseweg, der von Dehydrocholsäure ausgeht (Kapitel 7.). Diese Verbindung wird mittels einer 3α - und einer 7β -HSDH zu 12-Keto-UDCA umgesetzt. Der dann noch notwendige Schritt, die Entfernung der 12-Ketogruppe, wird rein chemisch mittels einer Wolff-Kishner-Reaktion durchgeführt, dieser Schritt ist nicht Teil dieser Arbeit.
- Ein chemoenzymatischer Syntheseweg, wobei nur der letzte Schritt ein chemischer ist. Die Ausgangsverbindung CA wird in zwei Schritten enzymatisch zu 12-Keto-UDCA umgesetzt und mittels einer Wolff-Kishner-Reaktion zu UDCA überführt (Kapitel 8.). Auch hier ist die Wolff-Kishner-Reaktion nicht Teil dieser Arbeit.

2) Synthese ausgehend von Chenodesoxycholsäure

- Ein rein enzymatischer Schritt, indem die Carbonylgruppe an C₇-Position der Chenodesoxycholsäure epimerisiert werden muss. Hierfür wurde sowohl eine Biotransformation mit isolierten Enzymen als auch eine Ganzzellbiokatalyse etabliert. Weiterhin wurde die Synthese mit einer i) externen Cofaktorregenerierung (siehe Kapitel 9.1.) als auch mit einer ii) internen Cofaktorregenerierung (siehe Kapitel 9.2.) untersucht.
- Ein chemoenzymatischer Syntheseweg, der von 3,7-Diketo-UDCA ausgeht, der durch eine chemische Oxidation aus CDCA gewonnen wurde. Das 3,7-Diketo-UDCA wurde durch eine doppelte Reduktion enzymatisch zu UDCA überführt (siehe Kapitel 9.3.).

Schwerpunkt dieser Arbeit ist also die biochemische Charakterisierung und der Einsatz der Hydroxysteroid-Dehydrogenasen 3 α -, 7 α - und 7 β -HSDH. Die Literatur und erste eigene Vorversuche haben gezeigt, dass die Enzyme teilweise einer starken Inhibierung unterliegen, so dass geplant ist, solche Engpässe mittels *protein engineering* zu beseitigen oder zu vermindern. Da zudem die natürlicherweise vorkommenden Enzyme 3 α -HSDH NAD(H)-abhängig und die 7 β -HSDH NADP(H)-abhängig sind, werden auch Kombinationen der vorab beschriebenen Wege mit Mutanten untersucht, deren Coenzym-Spezifitäten gezielt geändert wurden.

Der Gesamtprozess von DHCA zu 12-Keto-UDCA erfordert, wie Abb. 12 verdeutlicht, 2 HSDHs, eine 3 α - und eine 7 β -HSDH.

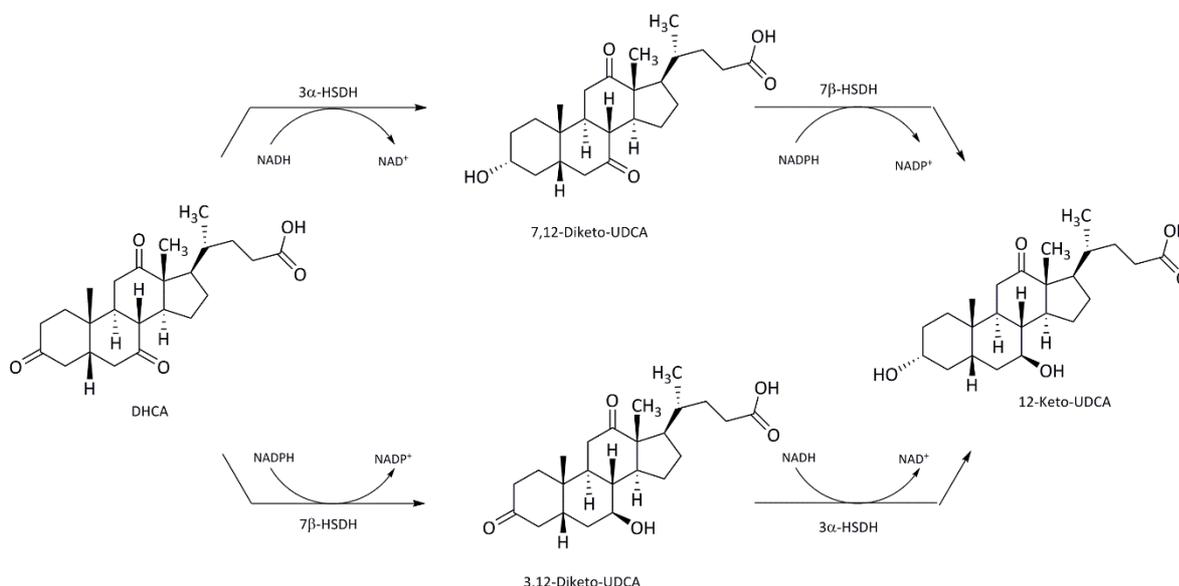


Abb. 12: Reaktionsprinzip der enzym-katalysierten Umsetzung von DHCA zu 12-Keto-UDCA über die Intermediate 7,12-Diketo-UDCA, resultierend aus der Reduktion mittels 3 α -HSDH aus *C. testosteroni* sowie 3,12-Diketo-UDCA, resultierend aus der Reduktion mit der 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens*. Die Cofaktorregenerierung geschah mittels Glucose, die von der GDH zu Glucono-1,5-lacton umgesetzt wird.

Ergebnisse

Prinzipiell kann man die Reaktion sowohl sequentiell als auch parallel durchführen. Sequentiell würde bedeuten, dass DHCA erst vollständig mit einer HSDH umgesetzt wird, dann lässt man das Zwischenprodukt mit dem anderen Enzym zu 12-Keto-UDCA weiterreagieren. Diese 2-stufige Verfahrensweise hat vor allem den Nachteil, dass sie zeitaufwendig ist. Einfacher wäre es, wenn man beide Enzyme in paralleler Weise reagieren lassen könnte. Da DHCA aber von beiden Enzymen umgesetzt wird, bedeutet die parallele Reaktionsweise, dass jede HSDH 2 Substrate vorfindet, DHCA und das von dem jeweils anderen Enzym teilreduzierte Intermediat. Das setzt aber voraus, dass auch die teilreduzierten Verbindungen mit akzeptablen kinetischen Werten umgesetzt werden. Sollte eine dieser Zwischenverbindungen gar nicht oder sehr schlecht umgesetzt werden, wäre die parallele Reaktionsführung nicht möglich. Für die Charakterisierung des Prozesses ist es daher notwendig, neben DHCA auch die teilreduzierte Verbindung als Substrat mit zu betrachten. Für die 7 β -HSDH bedeutet das, dass neben DHCA auch 7,12-Diketo-UDCA als Substrat betrachtet werden muss.

5. Biochemische Charakterisierung der Hydroxysteroid-Dehydrogenasen

5.1. 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens*

Um die enzymkinetischen Parameter der 7 β -HSDH zu bestimmen, wurde das Gen der 7 β -HSDH unter Verwendung des Plasmids pET21a_7 β -HSDH(-) in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Diese Variante besitzt keinen 6xHis-Tag, so dass eine Reinigung des Enzyms aufwendig ist, für erste charakterisierende Untersuchungen wird daher mit zellfreien Rohextrakt gearbeitet. Dieser Rohextrakt wurde in Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 10 μ M und 30 mM bei konstanter Coenzym-Konzentration von 0,2 mM NADPH durchgeführt. In Abbildung 13 sind die Verlaufsdiagramme und in Tabelle 15 die Werte für die 7 β -HSDH ohne His-Tag dargestellt.

Ergebnisse

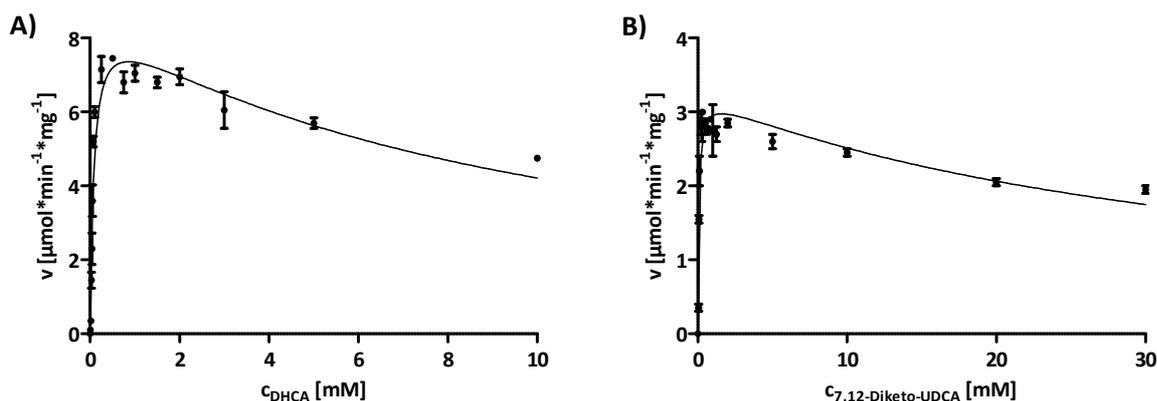


Abb. 13: Michaelis-Menten-Kinetik der 7 β -HSDH (ohne His-Tag) für das Substrat DHCA (Bild A) sowie das Intermediat 7,12-Diketo-UDCA (Bild B). Die Messungen wurden mit Rohextrakt durchgeführt.

Tabelle 15: Kinetische Konstanten der 7 β -HSDH (ohne His-Tag) für das Substrat DHCA und 7,12-Diketo-UDCA. Die Messungen wurden mit Rohextrakt durchgeführt.

Substrat	Cosubstrat	v_{\max} [μ mg $^{-1}$]	K_M [μ M]	K_I [mM]
DHCA	NADPH	8,4 \pm 0,5	74,5 \pm 15,4	12,4 \pm 3,2
7,12-Diketo	NADPH	3,2 \pm 0,1	72,3 \pm 15,6	35,2 \pm 9,0

Anders als bei dem klassischen Michaelis-Menten-Modell sind bei dem Michaelis-Menten-Modell mit Substratinhibierung (siehe Abbildung 13) die v_{\max} -Werte nicht als maximal erreichbare spezifische Enzymaktivitäten zu sehen, da sich die spezifischen Enzymaktivitäten mit zunehmender Substratkonzentration nicht asymptotisch an v_{\max} annähern, sondern durch den inhibierenden Einfluss der hohen Substratkonzentrationen wieder abnehmen. Der ermittelte K_M -Wert ist sowohl für das Edukt DHCA als auch das Intermediat 7,12-Diketo-UDCA sehr niedrig. Auffällig ist, dass der v_{\max} für das Intermediat 7,12-Diketo-UDCA, welche eine Monohydroxyl-Diketo-Verbindung darstellt, um den Faktor 2,5 schlechter ist als für die reine Triketo-Verbindung DHCA.

Weiterhin wurden die enzymkinetischen Parameter der 7 β -HSDH mit einem 6xHis-Tag bestimmt, um den Einfluss der zusätzlichen Histidine am C-Terminus zu überprüfen. Dafür wurde das Gen der 7 β -HSDH unter Verwendung des Plasmids pET28a_7 β -HSDH(C) in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Diese Variante besitzt einen C-terminalen 6xHis-Tag. Der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen wurde mittels Ni-NTA aufgereinigt und Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 10 μ M und 30 mM für DHCA bei konstanter Coenzym-Konzentration von 0,2 mM NADPH durchgeführt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an DHCA konstant bei 1 mM gehalten und die NADPH-Konzentration zwischen 10 μ M und 0,3 mM untersucht. In Abbildung 14 sind die Verlaufsdiagramme und in Tabelle 16 die Werte für die 7 β -HSDH mit His-Tag dargestellt.

Ergebnisse

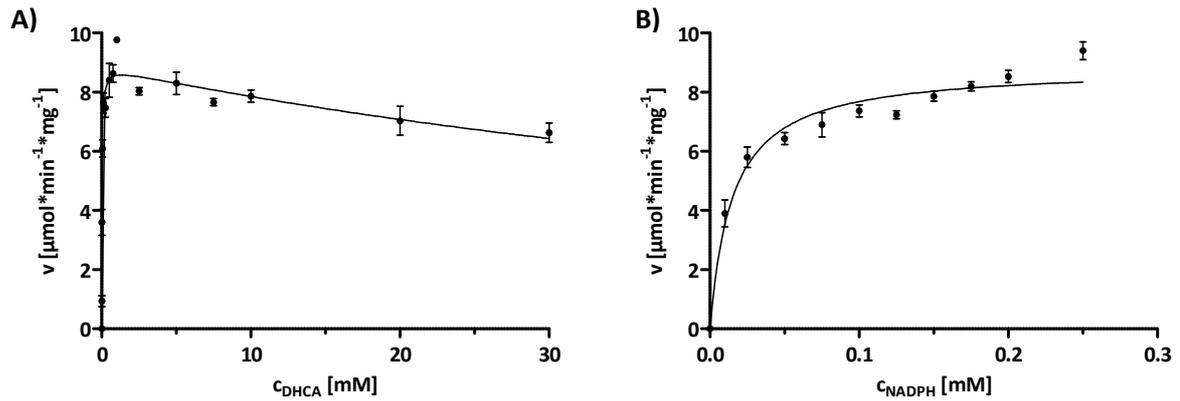


Abb. 14: Michaelis-Menten-Kinetik der 7 β -HSDH für das Substrat DHCA (Bild A) sowie für den Cofaktor NADPH (Bild B). Die Messungen wurden mit aufgereinigtem Protein durchgeführt, das einen C-terminalen His-Tag besitzt.

Tabelle 16: Kinetische Konstanten der 7 β -HSDH (mit C-terminalem His-Tag) für das Substrat DHCA, 7,12-Diketo-UDCA als auch für den Cofaktor NADPH. Die Messungen wurden mit aufgereinigtem Protein durchgeführt. X = keine Inhibierung

Substrat	Cosubstrat	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	K_I [mM]
DHCA	NADPH	8,9 \pm 0,2	20,3 \pm 2,9	79,8 \pm 16,4
NADPH	DHCA	8,9 \pm 0,2	15,2 \pm 2,2	x

Verglichen mit den Messungen mit Rohextrakt (Abb.13/Tab.15) ist erkennbar, dass nahezu dieselbe Aktivität bestimmt werden konnte. Dies liegt vermutlich daran, dass die Expression der 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* zu über 90 % Zielprotein führen und die *E. coli* eigenen Proteine weniger als ein Zehntel des Gesamtproteins ausmachen. In Abbildung 15 ist das SDS-Bild dargestellt, das dies verdeutlicht. Somit kann geschlossen werden, dass der His-Tag am C-Terminus keinen Einfluss auf das Enzym hat.

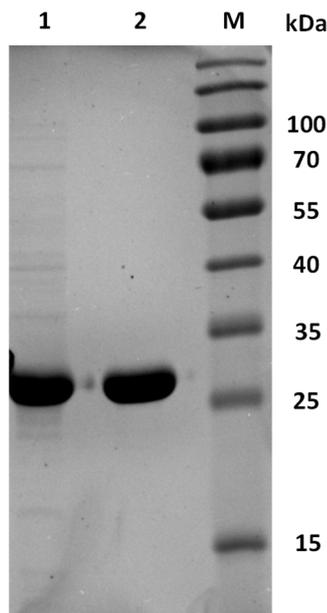


Abb. 15: SDS-PAGE der Expression und Aufreinigung der 7 β -HSDH, jeweils differenziert in den Rohextrakt (1) und aufgereinigtes Protein (2). Die Expression der 7 β -HSDH führt in der Regel zu über 90 % Zielprotein. Die 7 β -HSDH hat eine Größe von 29,8 kDa. Aufgetragen wurde jeweils 10 μ g Protein. M = Marker (prestained Ladder)

Ergebnisse

Aufgrund der ähnlichen Konstanten für DHCA (v_{\max} 8,4 zu 8,9 und K_M 74,5 zu 20,3), die nahezu identisch sind, wurde die Bestimmung der kinetischen Konstanten für das Intermediat 7,12-Diketo-UDCA nicht durchgeführt.

In diesem Abschnitt wurde eine Substratinhibierung der 7 β -HSDH festgestellt. Diese Inhibierung lässt die Reaktionsgeschwindigkeit bei hohen Konzentrationen an Dehydrocholsäure nicht effizient bzw. ökonomisch ablaufen. Anhand der Kinetik in Abbildung 15 erkennt man, dass das Enzym max. 66 % seiner maximalen Geschwindigkeit abrufen kann. Um diesen Engpass zu beheben, soll mittels gerichteter Evolution die Substratinhibierung des Enzyms beseitigt werden

5.1.1. Strukturaufklärung der 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens*

Die Struktur der 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* wurde kürzlich von Savino *et al.* publiziert, allerdings wurde keine Cokristallisation mit Substrat oder Cofaktor erwähnt (Savino *et al.*, 2016). Daher wurde in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Niefind (Universität Köln, Institut für Biochemie) eine eigene Kristallisation und Strukturaufklärung durchgeführt, in der auch eine Cokristallisation mit dem Cofaktor NADPH gelang. Die Arbeiten wurden von Frau Dipl.-Biol. Dipl.-Phys. Christine Tölzer durchgeführt.

5.1.1.1. Kristallisation der 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens*

Um sowohl den Wildtyp als auch die Mutante G39S/R64E (siehe Kapitel 5.1.2.4.) zu kristallisieren, wurden die Gene unter Verwendung des Plasmids pET28a_7 β -HSDH(C) bzw. pET28a_7 β -HSDH(C) [G39S/R64E] in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Diese Varianten besitzen einen C-terminalen 6xHis-Tag, so dass der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen mittels Ni-NTA aufgereinigt werden konnte. Nach der Reinigung und Umpufferung in 100 mM Zitronensäurepuffer (pH 6) konnten die Enzyme in der Regel mit einer Proteinkonzentration von ca. 15 bis 20 mg ml⁻¹ gewonnen werden. Ein Teil der Proteinlösung wurde anschließend über eine präparative Größenausschlusschromatographie (Superdex 75) in 100 mM Tris-HCl Puffer mit 100 mM NaCl gefiltriert. Wird diese Chromatographie an einer geeichten Säule durchgeführt, erkennt man anhand des Elutionsprofil, dass das Enzym in Lösung als Homodimer vorliegt, was mit der Beobachtung von Savino *et al.*, übereinstimmt. Es wurden nach der Größenaustauschchromatographie unterschiedlichste Kristallisationsbedingungen getestet, in positiven Fällen wurden dann die Bedingungen weiter optimiert. Für die Kristallisation mittels Dampfdiffusion wurde die *sitting-drop*-Methode angewendet. Hier zeigte sich, dass die besten Kristalle

Ergebnisse

für das Wildtyp-Enzym bei folgenden Bedingungen entstanden sind: 30 % PEG 400, 0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH 4,6), 0,1 M Calciumchlorid, 0,2 M Ammoniumtrifluoracetat und einer Proteinlösung aus 7 β -HSDH (7,4 mg ml⁻¹) mit 100 mM NADP⁺. Für die Mutante sahen die Kristallisierungsbedingungen ähnlich aus, einzige Veränderung war, dass 25 % PEG 400 eingesetzt wurde. In Abbildung 16 sind Kristalle unter mikroskopischer Auflösung dargestellt, die unter optimierten Bedingungen angewachsen sind.

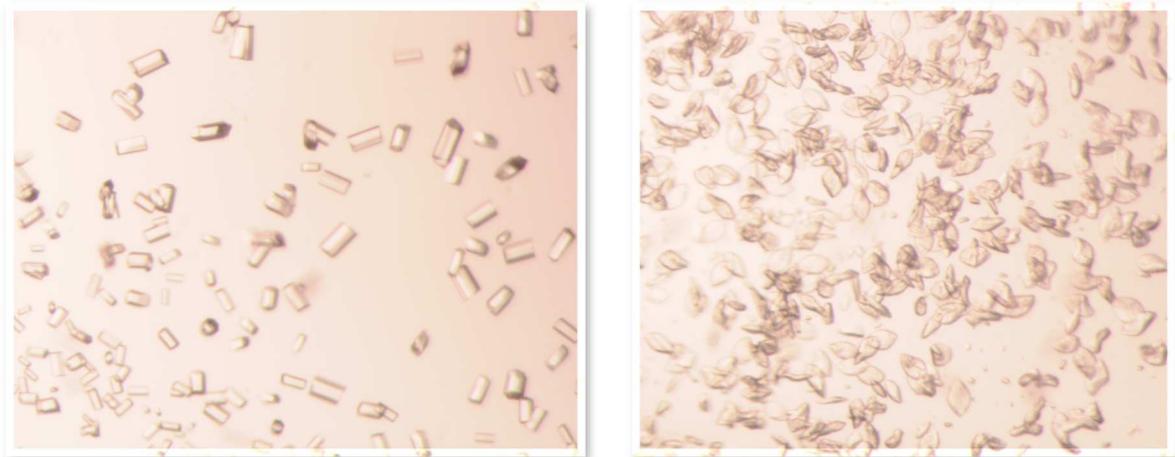


Abb. 16: Kristalle des 7 β -HSDH Wildtyp-Enzyms (linkes Bild) und der Mutante G39S/R64E (rechtes Bild), die unter den optimierten Bedingungen und der „sitting-drop“ Methode gewachsen sind.

Es konnten Kristalle erhalten werden, welche bis zu einer Auflösung von 1.8 Å (Wildtyp) und 1.1 Å (Mutante) streuten und die eine Raumgruppierung von P 21 21 2 (Wildtyp) bzw. C 1 2 1 (Mutante) besaßen. Die Strukturen wurden mit Hilfe des molekularen Ersatzes desselben Proteins (PDB ID: 5FYD) aufgelöst, die die Mitarbeiter von Savino et al. vorher kristallisiert haben, anschließend mit der „Phenix Software Suite“ verfeinert und mit der Software „COOT“ manuell modelliert (persönliche Mitteilung C. Tölzer).

Die Gesamtstruktur der 7 β -HSDH besteht aus zwei identischen Monomeren, die zusammen ein Homodimer bilden. Die 7 β -HSDH gehört der Gruppe der short-chain Dehydrogenasen/Reductasen (SDR) an und weist auch die typischen Merkmale einer SDR auf. Das *Rossmann fold*-Motiv befindet sich im N-terminalen Bereich und besteht aus sieben β -Faltblättern, die von sieben α -Helices umgeben sind. Die Substrat-Binde-Domäne befindet sich im C-terminalen Bereich und umfasst vier α -Helices sowie ein β -Faltblatt, das aus drei kleinen verdrehten β -Faltblättern besteht (siehe Abbildung 17).

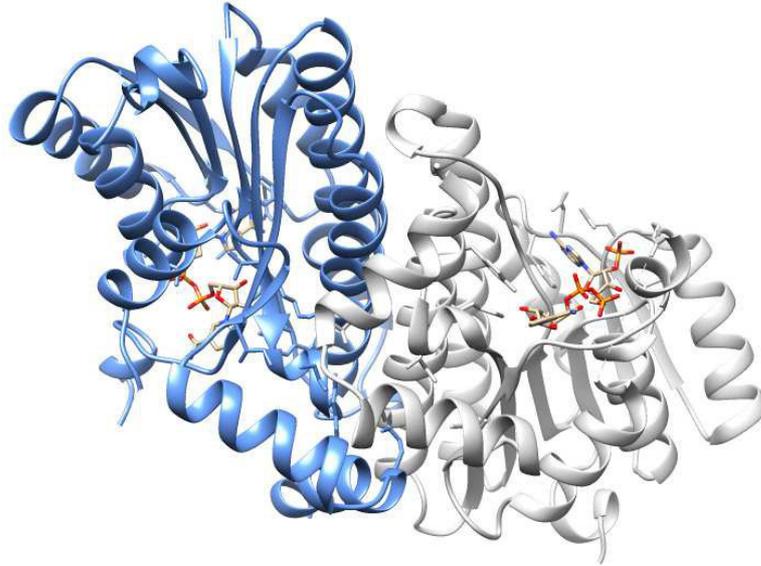


Abb. 17: Dimerstruktur der 7 β -HSDH. Das Homodimer setzt sich aus zwei gleichen Monomeren (Untereinheit A = blau; Untereinheit B = grau) zusammen. Zusätzlich konnte der Cofaktor NADP⁺ mit der 7 β -HSDH kokristallisiert werden.

5.1.2. Mutanten mit verbesserter Aktivität

Um den in Kapitel 5.1. beschriebenen Engpass der Substratinhibierung zu beseitigen, wurde mittels gerichteter Mutagenese gezielt eine Verbesserung dieser Eigenschaft angestrebt. Im Reaktionsmechanismus von Alkohol-Dehydrogenasen, die zu den short-chain Dehydrogenasen (SDR) gehören, wird vermutet, dass die Dissoziation des Cofaktors den geschwindigkeitslimitierenden Schritt darstellt (Charlier and Plapp, 2000). Aufgrund dieser Vermutung wurden verschiedene Positionen im *Rossmann-fold* des Enzymes mutagenisiert, die eine Bindung mit dem Coenzym eingehen.

5.1.2.1. Mutagenese der Position 17

An Position 17 der 7 β -HSDH, also innerhalb des Glycin-Motivs, befindet sich die Aminosäure Threonin, die eine wichtige Funktion bei der Cofaktorbindung übernimmt (Ghosh et al., 1995; Kavanagh et al., 2008). Anhand der aufgelösten Röntgenstruktur konnte geklärt werden, dass das Threonin an Position 17 in räumlicher Nähe zum Cofaktor liegt und eine stereochemisch eindeutig definierte Bindung eingeht.

Zur Aktivitätsbestimmung wurde der Standardassay benutzt. Alle Aktivitätstests wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden nach Expression mittels Ultraschall aufgeschlossen, Proteingehalt des Rohextraktes bestimmt und die Expression mittels SDS-PAGE überprüft.

Ergebnisse

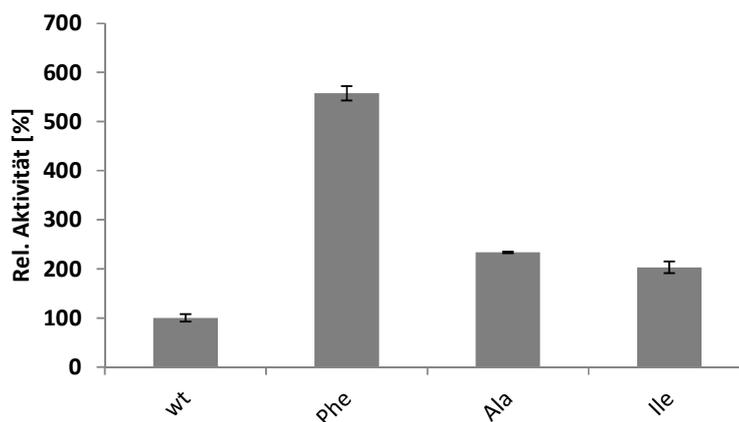


Abb. 18: Vergleich der Aktivitäten der Mutanten (T17F, T17A und T17I) mit dem Wildtyp. Für die Messungen wurde Rohextrakt eingesetzt. Die Aktivität des Wildtyps von $8,7 \text{ U mg}^{-1}$ wurde als 100 % gesetzt.

Aus Abbildung 18 geht hervor, dass Aminosäure-Austausche an dieser Position Thr17 zu einer Steigerung der Aktivität führen. Insbesondere der Austausch T17F hat zu einer Steigerung der Aktivität von ca. 530 % geführt. Alle anderen aufgeführten Mutationen hatten den Effekt, die Aktivität um den Faktor 2 zu steigern. Weiterhin zeigte die T17F-Mutante auch eine Nebenaktivität mit dem unphosphorylierten Cofaktor von ca. $0,4 \text{ U mg}^{-1}$ im Rohextrakt. Diese ist aber gegenüber der Aktivität mit dem phosphorylierten Cofaktor verschwindend gering.

In weiteren Versuchen hat sich gezeigt, dass diese Position nicht mit Austausch an anderen Positionen (siehe Kapitel: 5.1.2.4) kombinierbar ist, es konnten keine Überexpressionsbanden im SDS-Gel ermittelt werden. Daher wurden Mutanten dieser Position nicht gereinigt bzw. biochemisch näher charakterisiert.

5.1.2.2. Mutagenese der Position 39

Das Glycin in Position 39 konnte identifiziert werden aufgrund der konservierten Region bzw. Funktion. Die 7β -HSDH ist ein NADP^+ -abhängiges Enzym und die Aminosäure Glycin an Position 39 bietet der 2'-Phosphatgruppe des Adenosinrings genügend Platz, um einen Elektronentransport zwischen dem Substrat mit dem Cofaktor zu gewährleisten. Carugo und Argos haben nach Auswertung einer Vielzahl von NADP^+ -abhängigen Dehydrogenasen zeigen können, dass eine kleine Aminosäure wie Glycin eine wichtige Rolle einnimmt. Sie schafft nicht nur wie oben erwähnt genügend Platz, sondern sie ist auch stereochemisch von Bedeutung (Carugo and Argos, 1997). Ein Austausch des Glycins zum etwas größeren Serin führte dazu, dass eine erhöhte Aktivität festgestellt werden konnte. Vermutlich hat dieser Austausch dazu geführt, dass der Elektronenfluss aufgrund des räumlich näheren Abstands des Cofaktors mit dem Substrat schneller ablaufen kann. Die Einbringung einer negativen Ladung statt des

Ergebnisse

ursprünglichen Glycins hat gezeigt, dass der ursprüngliche Cofaktor NADPH nicht mehr angenommen wird (Kapitel 5.1.3.).

Um die enzymkinetischen Parameter der 7 β -HSDH [G39S] zu bestimmen, wurde das Gen der 7 β -HSDH [G39S] unter Verwendung des Plasmids pET28a_7 β -HSDH(C) [G39S] in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Diese Variante besitzt einen C-terminalen 6xHis-Tag. Der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen wurde mittels Ni-NTA aufgereinigt und Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 10 μ M und 20 mM für DHCA bei konstant 0,2 mM NADPH durchgeführt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an DHCA konstant bei 1 mM gehalten und die NADPH-Konzentration zwischen 10 μ M und 0,3 mM untersucht. Alle Aktivitätstests wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, der Proteingehalt des Rohextraktes als auch des aufgereinigten Proteins bestimmt und die Expression/Aufreinigung mittels SDS-PAGE überprüft. In Abbildung 19 sind die Verlaufsdiagramme und in Tabelle 17 die Werte für die 7 β -HSDH mit C-terminalem His-Tag dargestellt.

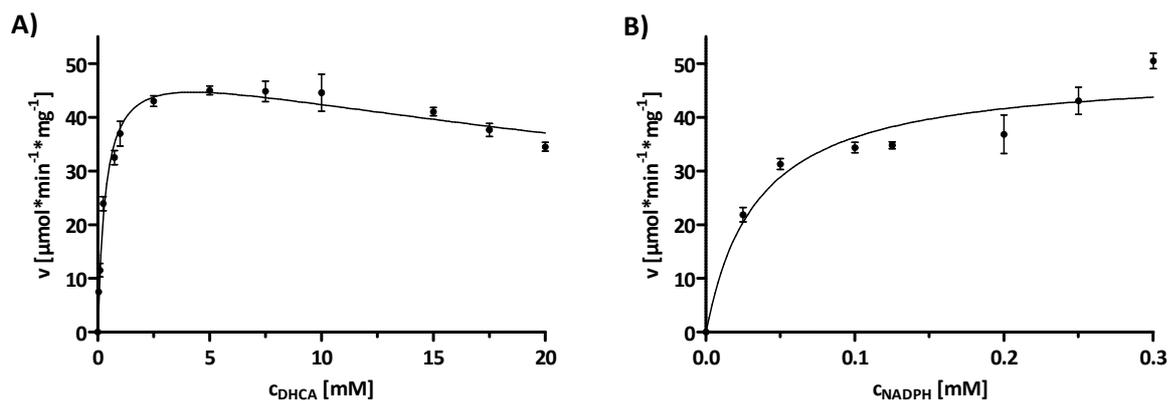


Abb. 19: Michaelis-Menten-Kinetik der G39S Mutante für das Substrat DHCA (Bild A) sowie für den Cofaktor NADPH (Bild B).

Tabelle 17: Kinetische Konstanten der 7 β -HSDH Mutante [G39S] für das Substrat DHCA und für den Cofaktor NADPH. X = keine Inhibierung.

	Substrat	Cosubstrat	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	K_I [mM]
G39S	DHCA	NADPH	$52,0 \pm 1,9$	$352,4 \pm 42,7$	$51,8 \pm 10,1$
	NADPH	DHCA	$48,78 \pm 2,2$	$34,5 \pm 6,6$	x
Wt	DHCA	NADPH	$8,9 \pm 0,2$	$20,3 \pm 2,9$	$79,8 \pm 16,4$

Aus Tabelle 17 geht hervor, dass die Aktivität durch den Austausch G39S um ca. das 6-fache gesteigert werden konnte. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass der K_M -Wert sich im Vergleich mit dem Wildtyp-Enzym um den Faktor 17 verschlechtert hat. Der K_M -Wert sagt aus, wie hoch die Affinität des

Ergebnisse

Enzyms zum gemessenen Substrat ist. Je geringer der Wert, desto höher die Affinität. Die Mutante zeigt in Bezug auf die Substratinhibierung (K_i -Wert) ein ähnliches Verhalten wie das Wildtyp-Enzym, hier konnte keine Veränderung festgestellt werden.

5.1.2.3. Sättigungsmutagenese der Position 64

Position 64 konnte identifiziert werden, obwohl sie nicht direkt mit der Bindung/Stabilisierung des Cofaktors zu tun hat. Vermutlich hat diese Position einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms, weil diese am Ende eines β_3 -Faltblatts liegt. Das β_3 -Faltblatt bildet das Ende des *Rossmann-folds* bei NADP(H)-abhängigen Enzymen (Kleiger and Eisenberg, 2002). In Abbildung 22 ist dies gut zu erkennen: Der Cofaktor liegt zwischen den Aminosäuren Thr17 und Gly39, wobei Arg64 sich in räumlicher Nähe zur Position 39 befindet. Weil diese Position laut Literaturrecherche bislang nicht Ziel von Mutagenese-Experimenten war, wurde hier eine Sättigungsmutagenese der Position vorgenommen.

Zur Aktivitätsbestimmung wurde der Standardassay benutzt. Alle Aktivitätstests wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden nach Expression mittels Ultraschall aufgeschlossen, Proteingehalt des Rohextraktes bestimmt und die Expression mittels SDS-PAGE überprüft.

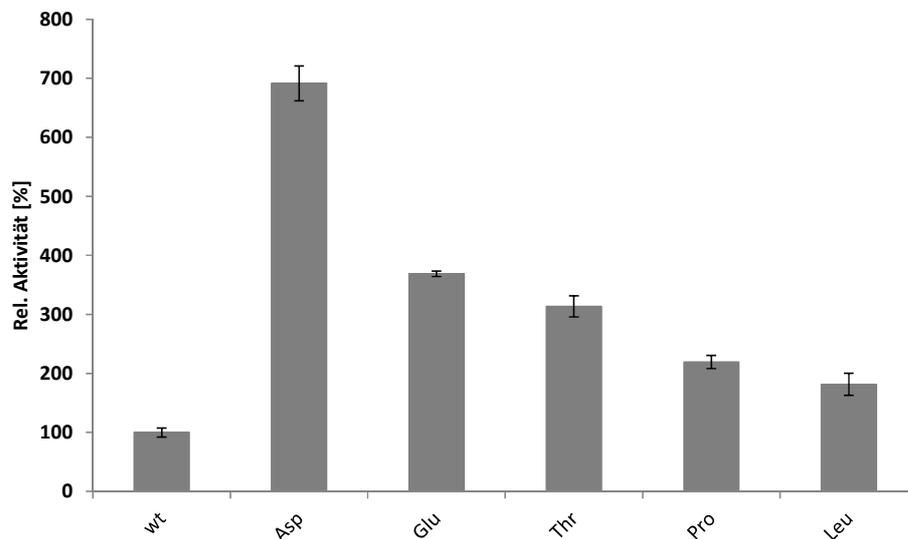


Abb. 20: Vergleich der Aktivitäten von Wildtyp und Mutanten der 7 β -HSDH mit 10 mM DHCA und 0,2 mM NADPH im Aktivitätsassay. Für die Messungen wurde Rohextrakt eingesetzt. Die Aktivität des Wildtyps (ebenfalls mit His-Tag) von 8,7 U mg⁻¹ wurde als 100 % gesetzt. Wt = Wildtyp mit Arg in Position 64.

Betrachtet man die in Abbildung 20 aufgeführten Aktivitätsveränderungen, so fällt auf, dass die aufgezeigten veränderten Mutanten an der Position 64 eine Aktivitätssteigerung von bis zu 700 %

Ergebnisse

aufwiesen. Von den insgesamt 19 Mutanten zeigte lediglich der Asparagineinbau eine niedrigere Aktivität, allerdings wird dieses Enzym nicht gut exprimiert. Hier zeigte die Kontrolle der Expression über ein SDS-Gel keine eindeutige Überexpressionsbande (siehe Anhang Kapitel 17). Alle anderen Mutanten zeigten eine Steigerung der Aktivität.

Tabelle 18: Aktivitäten der verschiedenen 7 β -HSDH-Varianten, die an der Position 64 verändert wurden. Die Messungen des Standardaktivitätsassay wurden mit Rohextrakt durchgeführt. Alle Varianten besaßen einen C-terminalen His-Tag.

erzeugte Mutanten	Volumentrische Aktivität [U ml ⁻¹]	spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]
Wildtyp	97	8,7
R64E	893	60,2
R64D	641	32,1
R64T	451	27,4
R64L	334	20,9
R64S	334	20,1
R64P	402	19,1
R64V	408	15,1
R64K	297	15,1
R64C	270	14,2
R64A	273	13,8
R64G	223	12,4
R64Q	217	12,2
R64F	216	10,5
R64W	214	10,1
R64I	171	9,8
R64Y	221	9,7
R64H	98	5,3
R64N	4	0,6

Die beiden besten Mutanten (Asparagin- und Glutaminsäure) wurden daher auf ihre kinetischen Konstanten charakterisiert.

Um die enzymkinetischen Parameter der 7 β -HSDH [R64D] sowie [R64E] Mutanten zu bestimmen, wurden die Gene der 7 β -HSDH Mutanten unter Verwendung des Plasmids pET28a_7 β -HSDH(C) [R64D] bzw. pET28a_7 β -HSDH(C) [R64E] in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Diese Varianten besitzen einen C-terminalen 6xHis-Tag. Der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen wurde mittels Ni-NTA aufgereinigt und Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 10 μ M und 20 bzw. 25 mM für DHCA bei konstant 0,2 mM NADPH durchgeführt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an DHCA konstant bei 1 mM gehalten und die NADPH-

Ergebnisse

Konzentration zwischen 10 μM und 0,35 mM untersucht. In Abbildung 21 sind die Verlaufsdigramme und in Tabelle 19 die Werte für die 7 β -HSDH Mutanten dargestellt.

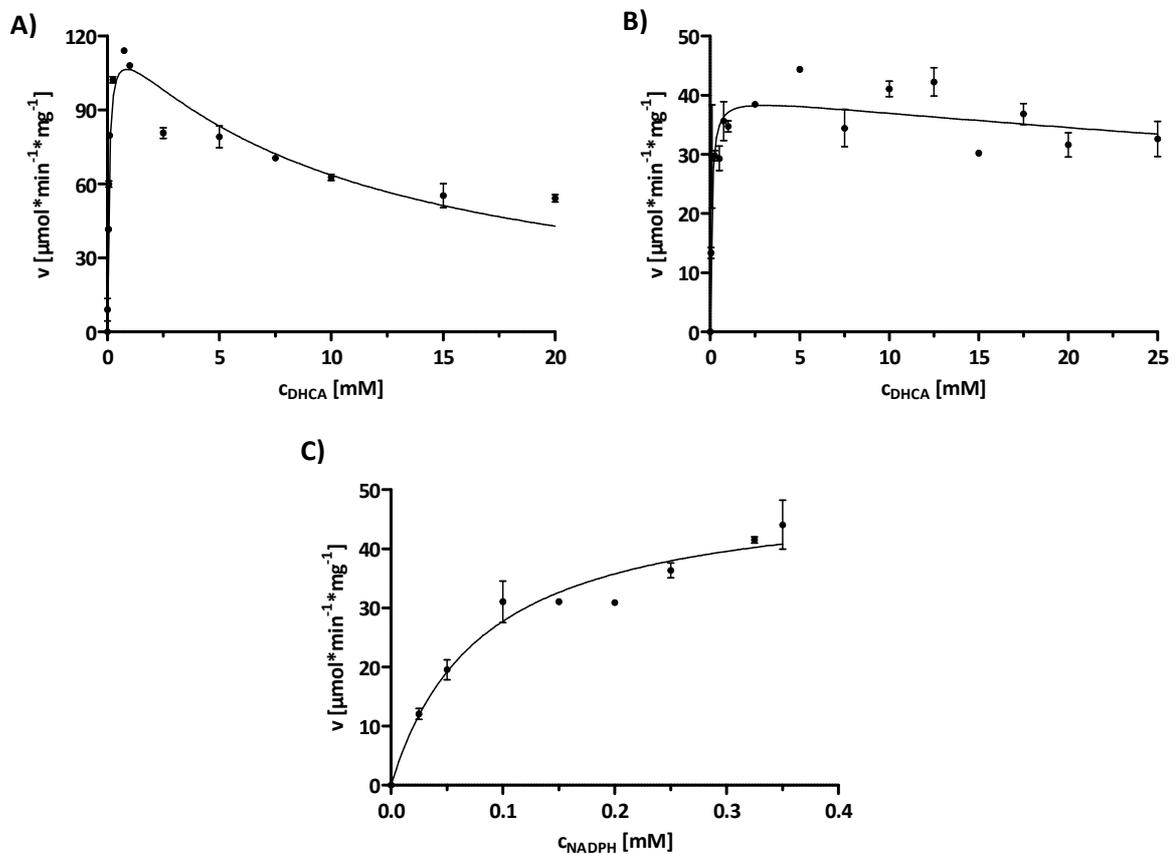


Abb. 21: Michaelis-Menten-Kinetik der 7 β -HSDH Mutanten R64D (Bild A) und R64E (Bild B) für das Substrat DHCA und für die Mutante R64E mit dem Cofaktor NADPH (Bild C). Für die Messungen wurde aufgereinigtes Enzym eingesetzt.

Tabelle 19: Kinetische Konstanten der 7 β -HSDH Mutanten R64D (Bild A) und R64E (Bild B) für das Substrat DHCA. In Bild C ist der Graph der Konstanten für die Mutante R64E mit dem Cofaktor NADPH abgebildet. Für die Messungen wurde aufgereinigtes Enzym eingesetzt. X = keine Inhibierung.

Enzym	Substrat	Cosubstrat	v_{max} [U mg^{-1}]	K_M [μM]	K_I [mM]
R64D	DHCA	NADPH	$124,3 \pm 5,7$	$72,5 \pm 11,2$	$10,6 \pm 1,5$
R64E	DHCA	NADPH	$40,2 \pm 2,0$	$74,2 \pm 19,5$	$125,9 \pm 68,7$
R64E	NADPH	DHCA	$50,3 \pm 2,9$	$81,3 \pm 15,0$	x
Wt	DHCA	NADPH	$8,9 \pm 0,2$	$20,3 \pm 2,9$	$79,8 \pm 16,4$

Die K_M -Werte für die Mutanten sind im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 4 schlechter geworden, aber immer noch deutlich klein. Der Austausch der ursprünglichen Aminosäure (Arginin) zur Glutaminsäure hat den v_{max} , also die mögliche „Maximalgeschwindigkeit“ der 7 β -HSDH, deutlich erhöht. Der Austausch zur Asparaginsäure hat die maximale Geschwindigkeit um das 14-fache und der Austausch zur Glutaminsäure um das 4,5-fache erhöht. Auffällig ist hier, dass der K_I -Wert sowie die

Ergebnisse

Standardabweichung der Glutaminsäure-Mutante bedeutend größer ist. Man kann daher insgesamt sagen, dass diese Substitution die Eigenschaften des Enzyms positiv beeinflusst. Weiterhin zeigt sich, dass jede andere Aminosäure eine Steigerung der Aktivität nach sich zieht, was bedeutet, dass diese Position für die 7 β -HSDH essentiell ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse soll in der Folge versucht werden, die bisher identifizierten positiven Austausche zu kombinieren, d.h. es sollen diverse Mutanten in einer nächsten Runde erstellt werden, die entweder in zwei der identifizierten Positionen oder womöglich in allen drei verändert werden.

5.1.2.4. Kombination der Mutagenesepositionen

Da in der ersten Runde verschiedene Positionen identifiziert werden konnten, die zu Mutanten mit erhöhter Aktivität gegenüber Gallensäuren führen, wurde in einer zweiten Runde geprüft, ob sich die einzelnen Mutationen kombinieren lassen. Überraschenderweise zeigte die Mutante mit allen drei Mutationen [T17F/G39S/R64E] kaum Aktivität, obwohl sie sich sehr gut exprimieren ließ, sie wurde daher nicht weiter charakterisiert. Alle Doppelmutanten, die die Position 17 beinhalteten, zeigten ebenfalls keine Aktivität. Die Doppelmutante G39S/R64E dagegen zeigte im Standardaktivitätstest mit 10 mM DHCA eine erhöhte Aktivität von ca. 60 U mg⁻¹, was im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung der Aktivität um das 6 bis 7-fache bedeutet.

Ein Strukturvergleich der Doppelmutante G39S/R64E mit dem Wildtyp anhand eines Modells zeigt zwei wesentliche Änderungen: Zum einen kann Ser39 mit dem Cofaktor Wechselwirkungen eingehen, zum anderen wird durch Glu64 eine neue ionische Bindung aufgebaut (siehe Abbildung 22), so dass die zwei ausgetauschten Aminosäuren Wechselwirkungen mit dem Cofaktor (Serin an Position 39) bzw. Glutaminsäure an Position 64 eingehen. Die neu entstandenen Wechselwirkungen mit dem Cofaktor sind anhand der blauen Linien verdeutlicht. Beim Wildtyp kann man erkennen, dass hier keine Wechselwirkungen (blaue Linien) vorhanden sind.

Ergebnisse

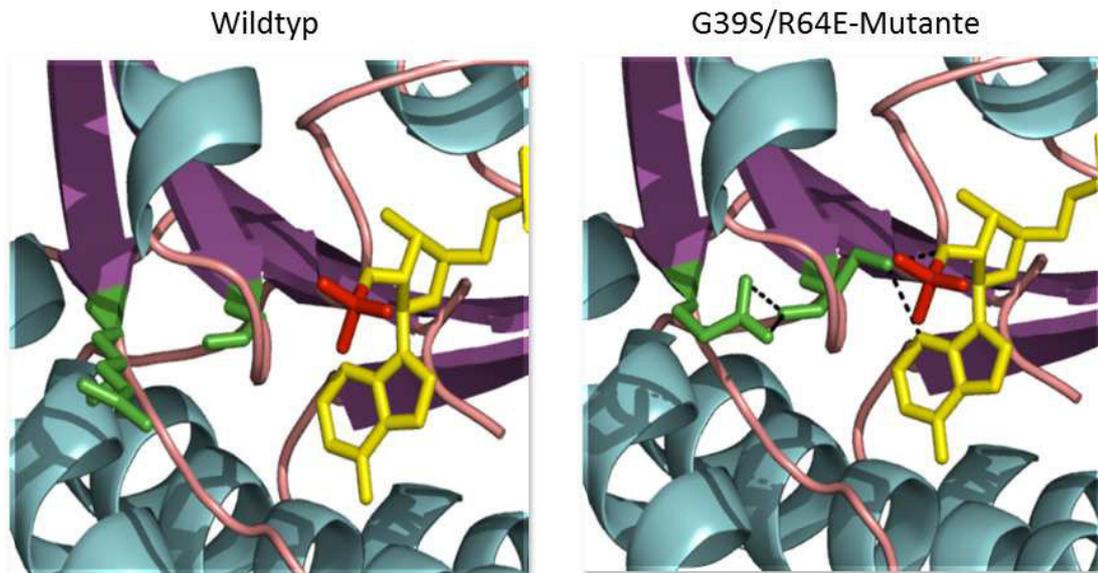


Abb. 22: Strukturvergleich der beiden Varianten G39S/R64E-Mutante und dem Wildtyp zeigt, dass durch die Aminosäure Serin neue Wechselwirkungen (blaue Linien) mit NADPH (gelb) aufgebaut werden (rot = 2'Phosphatgruppe). Die weitere Mutation R64E zeigt, dass hier eine weitere Stabilisierung des Proteins durch intramolekulare Wechselwirkungen stattfindet (blaue Linien). Die entsprechenden Aminosäuren sind in grün dargestellt.

Um die enzymkinetischen Parameter der 7β-HSDH [G39S/R64D] sowie [G39S/R64E] zu bestimmen, wurden die Gene der 7β-HSDH Mutanten unter Verwendung des Plasmids pET28a_7β-HSDH(C) [G39S/R64D] bzw. pET28a_7β-HSDH(C) [G39S/R64E] in *E. coli* BL21(DE3)Δ7α-HSDH exprimiert. Diese Varianten besitzen einen C-terminalen 6xHis-Tag. Der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen wurde mittels Ni-NTA aufgereinigt und Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 10 μM und 20 bzw. 15 mM für DHCA bei konstant 0,2 mM NADPH durchgeführt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an DHCA konstant bei 1 mM gehalten und die NADPH-Konzentration zwischen 10 μM und 0,35 mM untersucht. In Abbildung 23 sind die Verlaufdiagramme und in Tabelle 20 die Werte für die 7β-HSDH Mutanten dargestellt.

Ergebnisse

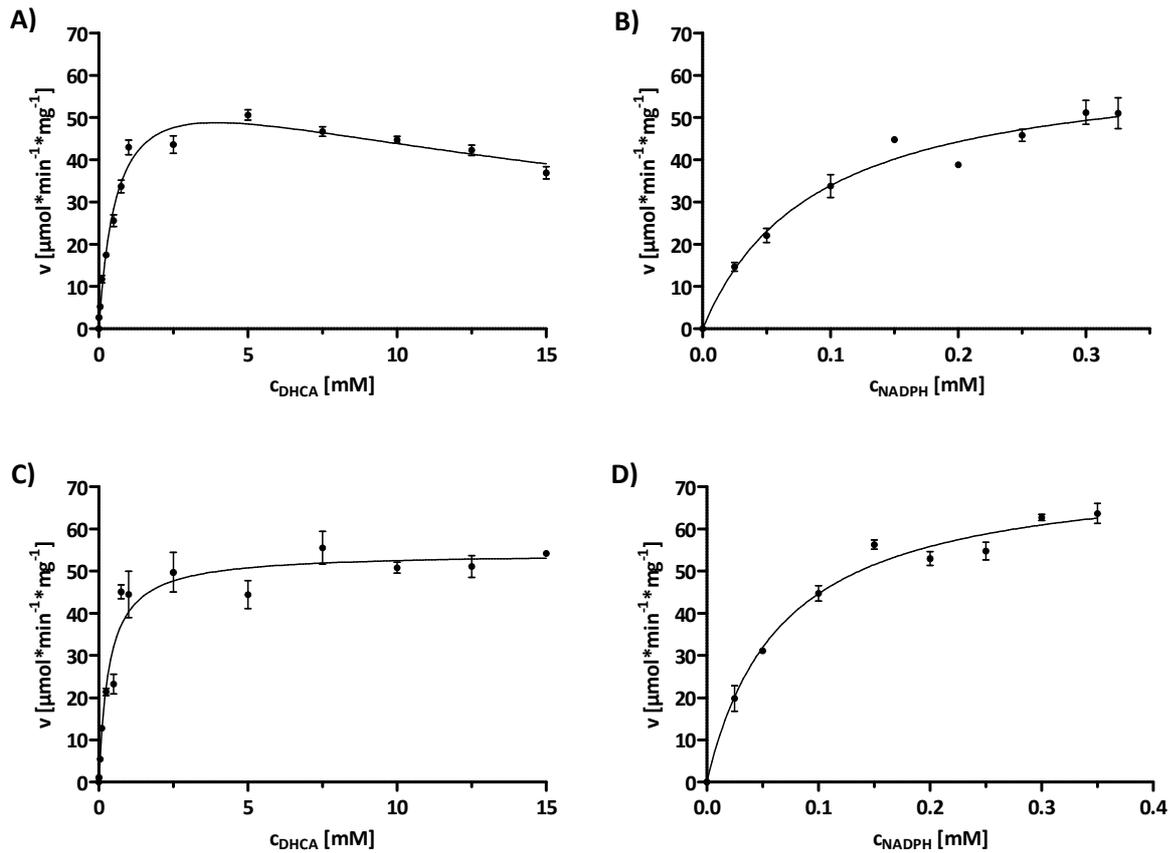


Abb. 23: Michaelis-Menten-Kinetik der Mutante G39S/R64D für das Substrat DHCA (Bild A) und für den Cofaktor NADPH (Bild B) sowie für die Mutante G39S/R64E (Bild C und D).

Tabelle 20: Kinetische Konstanten der 7 β -HSDH Mutanten [G39S/R64D und G39S/R64E] aus Abbildung 23 für das Substrat DHCA und den Cofaktor NADPH. Variiert wurde jeweils die Verbindung, die in der Spalte „Substrat“ aufgeführt ist. Bei DHCA-Variation wurde 0,2 mM NADPH eingesetzt, bei der Variation von NADPH 1 mM DHCA. X = keine Inhibition.

Enzym	Substrat	Cosubstrat	v_{max} [$U^{-1}mg$]	K_M [μM]	K_I [mM]
G39S/R64D	DHCA	NADPH	$64,4 \pm 3,5$	$627,1 \pm 78,4$	$24,7 \pm 4,7$
	NADPH	DHCA	$63,9 \pm 2,9$	$88,6 \pm 11,9$	x
G39S/R64E	DHCA	NADPH	$54,3 \pm 1,6$	$349,3 \pm 5,2$	x
	NADPH	DHCA	$74,6 \pm 2,5$	$67,2 \pm 7,8$	x
Wt	DHCA	NADPH	$8,9 \pm 0,2$	$20,3 \pm 2,9$	$79,8 \pm 16,4$

Bezüglich des v_{max} -Wertes liegen die Werte für beide Mutanten in einer vergleichbaren Größenordnung, die Daten (Tabelle 20) zeigen einen leicht höheren Wert für die Asparaginsäuremutante. Letztere hat zudem auch eine etwas geringere Affinität zu DHCA. Im Vergleich zum Wildtyp ist die Affinität zum Substrat DHCA um einiges schlechter. Die Glutaminsäuremutante hat einen ca. 17,5-fach und die Asparaginsäuremutante einen 30-fach schlechteren K_M -Wert als das Wildtyp-Enzym. Der wesentliche Unterschied liegt aber im Verhalten bei höheren DHCA-Konzentrationen.

Ergebnisse

Während die Asparaginsäuremutante eine leichte, aber deutliche Substratüberschussinhibierung zeigt, weist die Glutaminsäuremutante bis zu einer Konzentration von 15 mM keine Inhibierung auf. Interpoliert man die Kinetik, kann man davon ausgehen, dass auch bei höheren Konzentrationen an DHCA keine Substratinhibierung messbar sein wird. In Abbildung 24 ist die sukzessive Mutagenese zur Eliminierung der Substratinhibierung dargestellt.

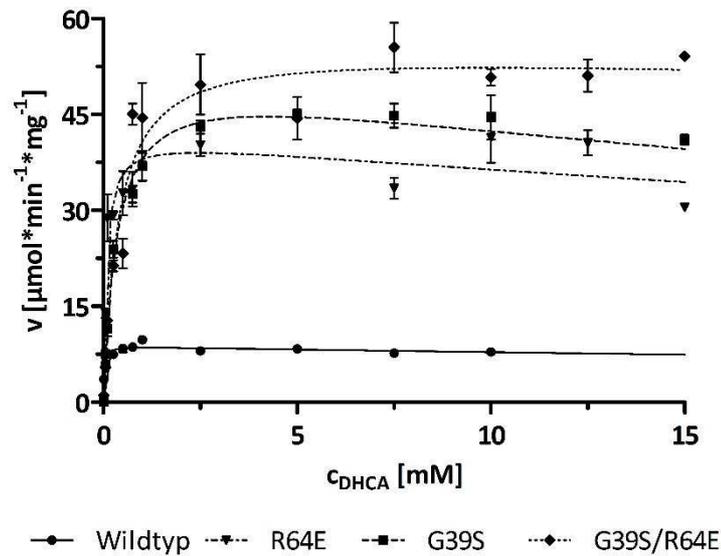


Abb. 24: Vergleich der kinetischen Konstanten der 7 β -HSDH-Varianten R64E, G39S und G39S/R64E mit dem Wildtyp.

Durch Kombinationen der Mutationen an den Positionen G39S und R64E konnte eine 7 β -HSDH erzeugt werden, die zum einen eine um den Faktor 6 höhere Aktivität aufweist, zum anderen konnte gezeigt werden, dass durch die Mutationen die Substratüberschussinhibierung eliminiert wurde.

5.1.3. Änderung der Cofaktorspezifität

Die 7 β -HSDH benötigt NADP(H) als Coenzym. NADPH ist im Vergleich zur unphosphorylierten Form teurer und weist eine geringere Stabilität auf. Die Cofaktorspezifität des Enzyms sollte daher mittels positionsgerichteter Mutagenese geändert werden. Mit einer gut aktiven NAD⁺-abhängigen 7 β -HSDH ergeben sich zudem neue Möglichkeiten in der Kombination mit der 3 α -HSDH bei der doppelten Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA, da die 3 α -HSDH bei der Reduktion von DHCA strikt NAD⁺-abhängig ist.

Ergebnisse

Für die Mutageneseplanung wurden Sequenzvergleiche und Strukturmodelle benutzt. Die 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens* weist alle klassischen Merkmale von *short-chain Dehydrogenasen* (SDR) auf (Filling et al., 2002). Charakteristisch ist beispielsweise das Glycin-reiche Motiv (**G-X-X-X-G-X-G**), das an der Interaktion mit dem Coenzym beteiligt ist und nahe dem N-Terminus liegt (Jörnvall et al., 1987; Sun and Plapp, 1992). 18 bis 20 Aminosäuren downstream von diesem Motiv befindet sich die Aminosäure, die für die Coenzym-Spezifität der SDR ausschlaggebend ist. Es wird angenommen, dass diese Position am Ende des β_2 -Stranges liegt (Persson et al., 2003). Eine negativ geladene Aminosäure an dieser Position steht für ein NAD⁺-abhängiges Enzym, während ein NADP⁺-abhängiges Enzym an der Position ein oder zwei basische Aminosäuren aufweist (Jörnvall et al., 1987; Persson et al., 2003; Wierenga et al., 1985).

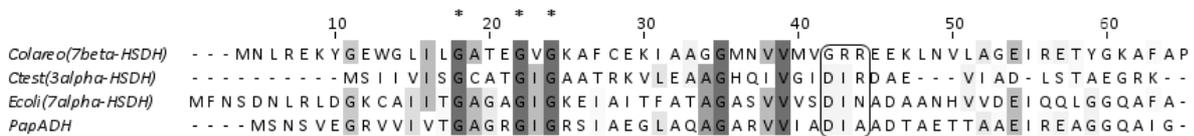


Abb. 25: Partielles Alignment der NADP⁺-abhängigen 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* mit zwei NAD⁺-abhängigen HSDHs (*P. testosteronei* und *E. coli*) sowie einer NAD⁺-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase (*P. pantotrophus*) im Bereich der Aminosäuren 1 bis 65. Konservierte Bereiche sind grau unterlegt, das Glycin-Motiv ist mit Sternen markiert und die Aminosäuren, die die Cofaktorspezifität ausmachen, sind umrandet. Das Alignment wurde mit Hilfe des clustalw2-Algorithmus erstellt.

In Abbildung 25 ist ein partielles Alignment mit der NADP⁺-abhängigen 7 β -HSDH und NAD⁺-abhängigen SDRs abgebildet, aus dem deutlich wird, dass in dem konservierten Bereich zwei Arginine vorliegen. Vor diesen beiden basischen Aminosäuren befindet sich ein Glycin. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren G39, R40 und R41 in der 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens*. Typisch für NADP⁺-abhängige Dehydrogenasen ist, dass ein positiv geladenes Arginin eine Wechselwirkung mit der negativ geladenen Phosphatgruppe des NADPH eingeht. Vermutlich geht nur das erste Arginin (Position 40) eine Interaktion mit dem 2⁻-Phosphat am Adenosin ein. Im Detail kann man das bereits an einem Strukturmodell ersehen. Die aufgelöste Röntgenstruktur zeigt, dass vermutlich das Threonin an Position 17 aufgrund der räumlichen Nähe mit dem Phosphat ebenfalls interagieren kann (siehe Abbildung 26).

Ergebnisse

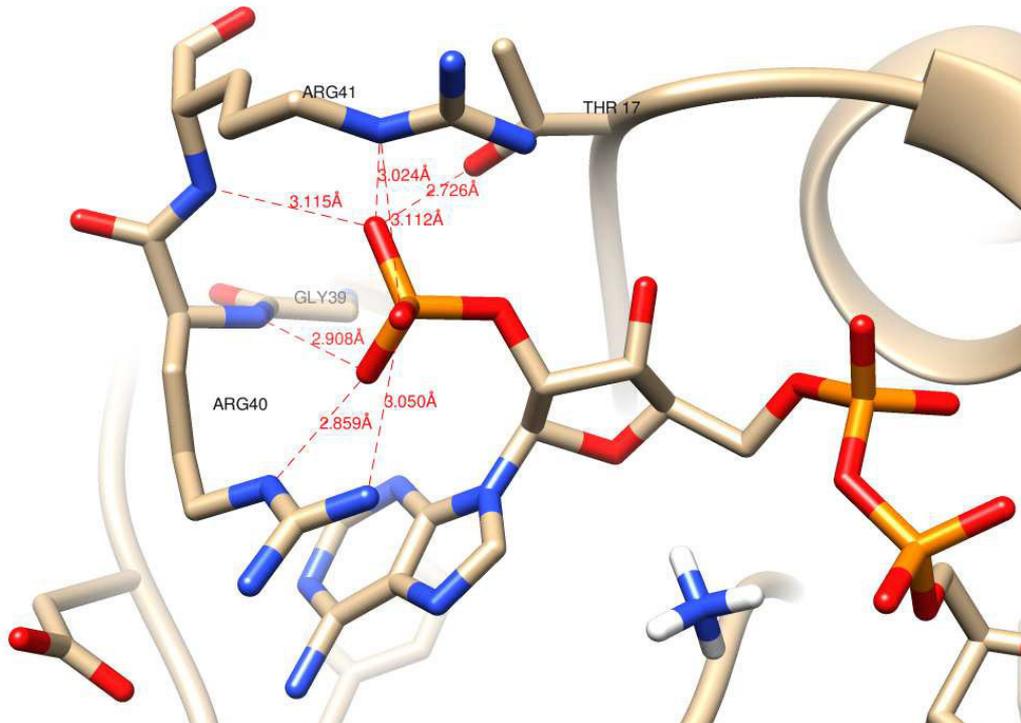


Abb. 26: Beteiligte Aminosäurenreste der 7 β -HSDH und deren Wechselwirkung zwischen dem 2'-Phosphat des Cofaktors NADPH.

Aufgrund des Alignments und des Strukturmodells wurden die Positionen T17, G39, R40 und R41 identifiziert, die für die Cofaktorspezifität verantwortlich sind. Diese Aminosäuren wurden daher mittels positionsgerichteter Mutagenese so verändert, dass das Enzym nur noch NADH als Cofaktor akzeptiert. Zur Aktivitätsbestimmung wurden die Gene der 7 β -HSDH Mutanten ([G39D], [G39E], [G39D/R40I], [G39D/R40L], [G39D/R40W], [G39D/R40I/R42N], [T17F]) unter Verwendung des Plasmids pET28a_7 β -HSDH(C) in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Diese Varianten besitzen einen C-terminalen 6xHis-Tag. Alle Aktivitätstests wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden nach Expression mittels Ultraschall aufgeschlossen, der Proteingehalt des Rohextraktes bestimmt und die Expression mittels SDS-PAGE überprüft. Über das SDS-Gel konnte weiterhin noch der Anteil an gebildetem Enzym an der Gesamtmenge abgeschätzt werden.

Ergebnisse

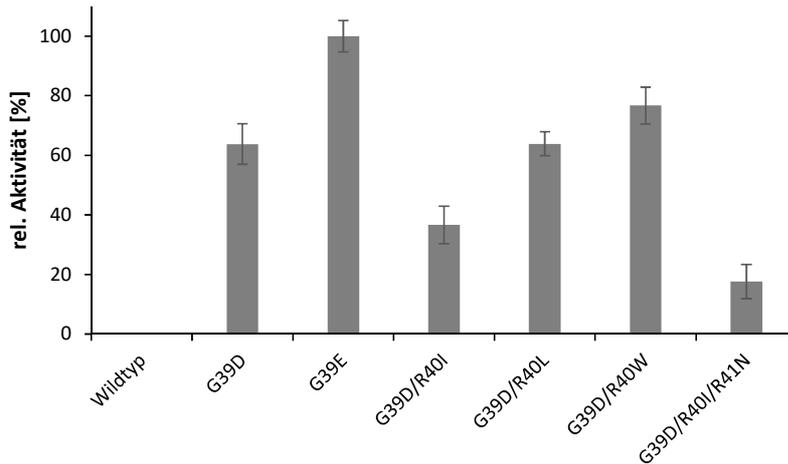


Abb. 27: Vergleich der NADH-abhängigen 7 β -HSDH Mutanten mit dem Wildtyp. Die Standard-Konzentration an Cofaktor betrug 0,2 mM NADH und die Menge an DHCA 10 mM. Die Aktivität (1,7 U mg⁻¹) der G39E-Variante wurde als 100% gesetzt, da beim Wildtyp mit NADH keine Aktivität gemessen werden konnte.

In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass die Mutanten, die an den Positionen 39 eine geladene Aminosäure und an 40 eine aliphatische Aminosäure oder ein Tryptophan besitzen, eine vergleichbare Aktivität aufweisen. Die Aktivität im Vergleich mit dem Wildtyp für NADPH liegt bei ca. 20 bis 25 %. Die Mutante G39E zeigte die höchste Aktivität mit 1,7 U mg⁻¹. Die Einzelmutanten, die an der Position Gly39 verändert wurden, zeigten nur noch eine schwache Aktivität ($\leq 0,05$ U mg⁻¹) mit dem ursprünglichen Cofaktor NADPH. Die Doppelmutanten Gly39 und Arg40 sowie die dreifache Mutante (G39D/R40I/R41N) zeigte dagegen keine Aktivität mehr mit dem Cofaktor NADPH.

Aufgrund des Strukturmodells konnte eine weitere Position identifiziert werden, deren Mutagenese in Kapitel 5.1.2.1. behandelt wird. Hier konnte mit der Mutante T17F eine erhöhte Aktivität mit NADPH gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden, aber auch eine Nebenaktivität mit NADH. Wie bereits erwähnt, kann diese Position nicht mit den anderen Positionen kombiniert werden, um bessere NADH-abhängige Mutanten erzeugen zu können.

Um die enzymkinetischen Parameter der 7 β -HSDH [G39E] zu bestimmen, wurde das Gen der 7 β -HSDH [G39E] unter Verwendung des Plasmids pET21a_7 β -HSDH(C) [G39E] in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Diese Variante besitzt einen C-terminalen 6xHis-Tag. Der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen wurde mittels Ni-NTA aufgereinigt und in Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 50 μ M und 15 mM für DHCA bei konstant 0,2 mM NADH durchgeführt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an DHCA konstant bei 5 mM gehalten und die NADH-Konzentration zwischen 10 μ M und 0,3 mM untersucht. Alle Aktivitätstests wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, der Proteingehalt des aufgereinigten Proteins bestimmt und die Expression/Aufreinigung mittels SDS-PAGE überprüft. In

Ergebnisse

Abbildung 28 sind die Verlaufsdigramme und in Tabelle 21 die Werte für die 7 β -HSDH [G39E] mit C-terminalem His-Tag dargestellt.

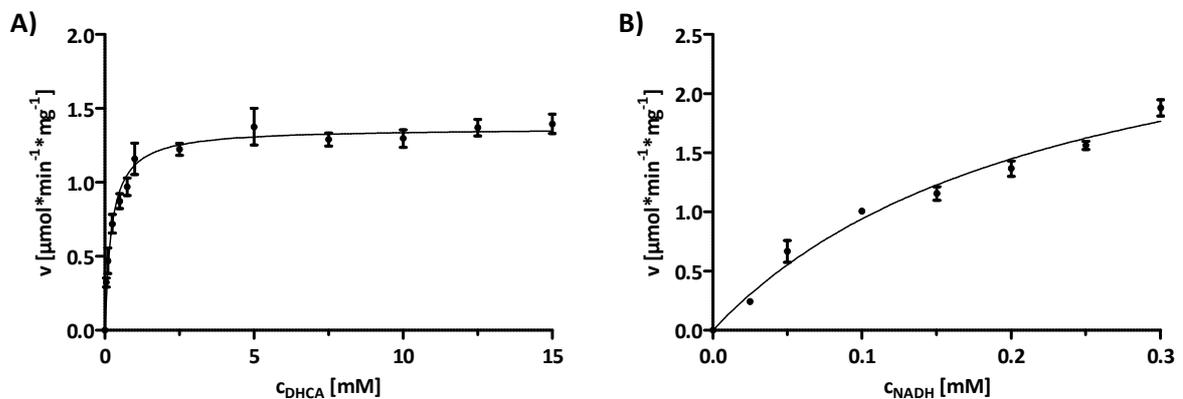


Abb. 28: Michaelis-Menten-Kinetik der Mutante G39E für das Substrat DHCA (Bild A) und für den Cofaktor NADH (Bild B). Die Messungen wurden mit aufgereinigtem Protein durchgeführt.

Tabelle 21: Kinetische Konstanten der 7 β -HSDH [G39E] mit C-terminalem 6xHis-Tag für das Substrat DHCA und NADH.

Substrat	Cosubstrat	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [µM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [mM s ⁻¹]
DHCA	NADH	1,4 ± 0,02	225,4 ± 18,8	0,7 ± 0,0	2,9 ± 0,0
NADH	DHCA	3,14 ± 0,3	233,6 ± 38,7	1,5 ± 0,1	6,5 ± 0,5

Aus Abbildung 28 **A)** ist auffällig, dass die NAD(H)-abhängige Mutante der 7 β -HSDH keine Substratinhibierung aufweist. Weiterhin geht aus Abbildung 28 **B)** sowie aus Tabelle 21 hervor, dass die eingeführte Mutation die Affinität zum Cofaktor deutlich herabgesetzt hat. Der Wildtyp besitzt zu NADPH einen K_M -Wert von ca. 15 µM, die Mutante Gly39Glu dagegen einen von ca. 234 µM, also um den Faktor 15 erhöht.

Anhand des Strukturmodells konnten diejenigen Aminosäurereste identifiziert werden, die mit der 2'-Phosphatgruppe am Adenosinring interagieren und für die Cofaktorpräferenz verantwortlich sind. Es konnten mehrere Mutanten mittels positionsgerichteter Mutagenese erzeugt werden. Die beste Mutante zeigte eine 16 %ige Restaktivität mit NADH im Vergleich zum Wildtyp mit NADPH als Cofaktor.

5.2. 3 α -HSDH

5.2.1. Biochemische Charakterisierung des Wildtyp

Analog zu der Charakterisierung der 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* wurde die Charakterisierung der 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni* erst mit Rohextrakt (Variante ohne His-Tag, mittels Q-Sepharose gereinigt) und dann mit His-Tag (C- als auch N-Terminus) durchgeführt. Um die enzymkinetischen Parameter der 3 α -HSDH-Varianten zu bestimmen, wurden die Gene der 3 α -HSDH unter Verwendung der Plasmids pET21a_3 α -HSDH(-), pET28a_3 α -HSDH(C) oder pET28a_3 α -HSDH(N) in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Die Variante im pET21a besitzt keinen His-Tag, das Protein auf dem Plasmid pET28a_3 α -HSDH(C) einen C-terminalen 6xHis-Tag und das Enzym auf dem Plasmid pET28a_3 α -HSDH(N) einen N-terminalen. Der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen der Varianten mit 6xHis-Tag wurde mittels Ni-NTA aufgereinigt und die Variante ohne wurde über chromatographische Methoden aufgereinigt. Die Messungen wurden bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 10 μ M und 30 mM für DHCA bei konstant 0,2 mM NADH durchgeführt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an DHCA konstant bei 0,1 mM gehalten und die NADH-Konzentration zwischen 10 μ M und 0,35 mM untersucht. In Abbildung 29 sind die Verlaufsdiagramme und in Tabelle 22 die Werte für die 3 α -HSDH Variante ohne 6xHis-Tag (pET21a_3 α -HSDH(-)) dargestellt. Die Messungen erfolgten mit Rohextrakt.

Ergebnisse

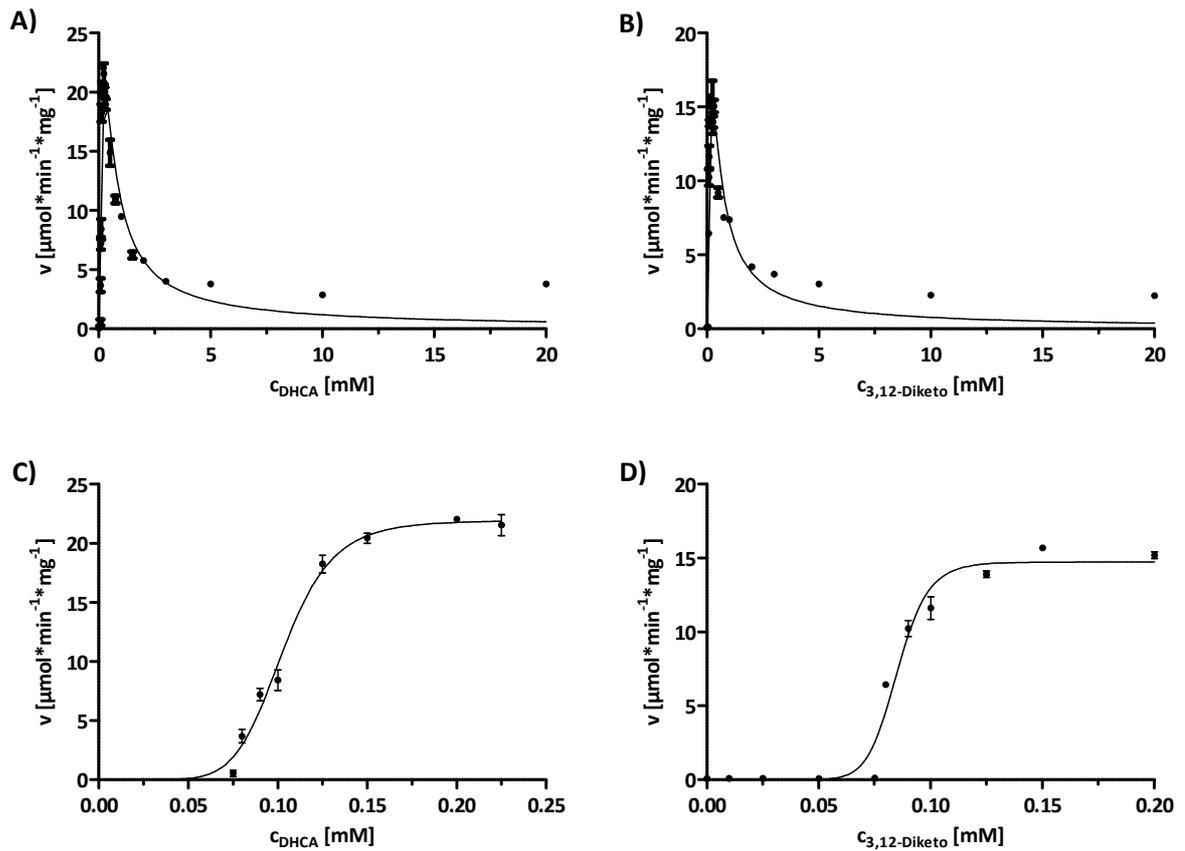


Abb. 29: Michaelis-Menten-Kinetik des Wildtyps für das Substrat DHCA (Bild A) und für das „Intermediat“ 3,12-Diketo-UDCA (Bild B). In den Bildern C und D sind die Konzentrationsbereiche bis 0,2 mM DHCA bzw. 3,12-Diketo dargestellt. Die Messungen wurden mit der Enzymvariante ohne His-Tag (Rohextrakt) aufgenommen.

Tabelle 22: Kinetische Konstanten der 3α -HSDH ohne His-Tag für das Substrat DHCA und 3,12-Diketo-UDCA. Aufgrund der extrem ausgeprägten Substratinhibierung wurden die Werte aus der Abbildung (siehe oben) ausgewertet. Die Messungen wurden mit Rohextrakt durchgeführt.

Substrat	Cosubstrat	v_{max} [U mg^{-1}]	K_M [mM]	K_I [mM]
DHCA	NADH	25	0,12	1,0
3,12-Diketo	NADH	18	0,08	2,5

Aufgrund der starken Substratinhibierung wurden die apparenten Werte ermittelt. Hier wurde der Bereich zwischen 10 und 200 μM für das Substrat 3,12-Diketo-UDCA bzw. 225 μM für DHCA genutzt, in dem die Inhibierung noch nicht festgestellt werden konnte. Die ermittelten Daten sind in Tabelle 23 und die dazugehörigen Grafiken in Abbildung 29 C und D dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 23: Kinetische Konstanten der 3 α -HSDH ohne His-Tag für das Substrat DHCA und 3,12-Diketo-UDCA. Aufgrund der starken Substratüberschussinhibierung wurden die Werte bis 0,2 mM DHCA benutzt, um die apparenten Konstanten zu berechnen.

Substrat	Cosubstrat	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [mM]
DHCA	NADH	22,2 \pm 0,6	0,01
3,12-Diketo	NADH	14,7 \pm 0,5	0,01

Auffällig ist, dass die 3 α -HSDH eine sehr ausgeprägte Substratinhibierung aufweist. Solche kinetischen Charakterisierungen wurden bislang an 3 α - oder 7 β -HSDH nicht durchgeführt. Lediglich in einer Publikation (Ferrandi et al., 2011) wird auf eine Substratinhibierung bei einer 7 β -HSDH hingewiesen, die dort allerdings deutlich schwächer ausfällt.

Anders als bei dem klassischen Michaelis-Menten-Modell sind bei dem Michaelis-Menten-Modell mit Substratinhibierung die v_{\max} Werte nicht als maximal erreichbare spezifische Enzymaktivitäten zu sehen, da sich die spezifischen Enzymaktivitäten mit zunehmender Substratkonzentration nicht asymptotisch an v_{\max} annähern, sondern durch den inhibierenden Einfluss der hohen Substratkonzentrationen wieder abnehmen. Die kinetischen Parameter der 3 α -HSDH sind in Tabelle 23 aufgelistet. Die kinetischen Konstanten für die 3 α -HSDH wurden graphisch ausgewertet, weil die Kinetiken weder dem klassischen Michaelis-Menten-Modell noch dem Modell mit Substratinhibierung entsprechen. Um verwertbare Ergebnisse zu bekommen, wurden aufgrund der genannten Substratinhibierung apparante Konstanten bis 0,2 mM Substrat aufgenommen. Hier zeigt sich, dass der Verlauf in den geringen Konzentrationsbereichen sigmoidal ist. Das deutet darauf, dass das Enzym zwei Bindestellen besitzt, da hier das Substrat ebenfalls an das zweite, nicht-katalytische Zentrum binden kann und als Inhibitor fungiert. In Tabelle 23 sind die Konstanten aufgeführt. Die v_{\max} -Werte der apparenten Werte für DHCA sind ca. 10 % und für das Intermediat 3,12-Diketo-UDCA ca. 20 % geringer.

Um die Daten aus dem vorigen Kapitel zu überprüfen, wurde der Wildtyp ohne einen 6xHis-Tag chromatographisch über eine Q-Sepharose gereinigt. Diese Arbeiten wurden von Simone Rath im Rahmen Ihrer Bachelorarbeit durchgeführt. Hierfür wurde das Gen 3 α -HSDH über das Konstrukt pET21a_3 α -HSDH(-) in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α exprimiert. Nach Zellaufschluss in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 9) wurde das zellfreie Rohextrakt photometrisch auf Aktivität getestet. Zur Proteinaufreinigung der 3 α -HSDH wurde ein „Äkta-Purifier“-Chromatographiesystem benutzt. Es wurde eine Säule mit einem Volumen von 30 ml Q-Sepharose (fast flow) verwendet und mit 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 9) äquilibriert. Für die Elution der Proteine wurde ein Salz-Gradient benutzt. Startbedingung war 100% 50 mM Tris-HCl (pH 9), die Endbedingung betrug 100% 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl (pH 9). Gesamtvolumen Gradient: 300 ml. Die Flussgeschwindigkeit betrug 4 ml/min.

Ergebnisse

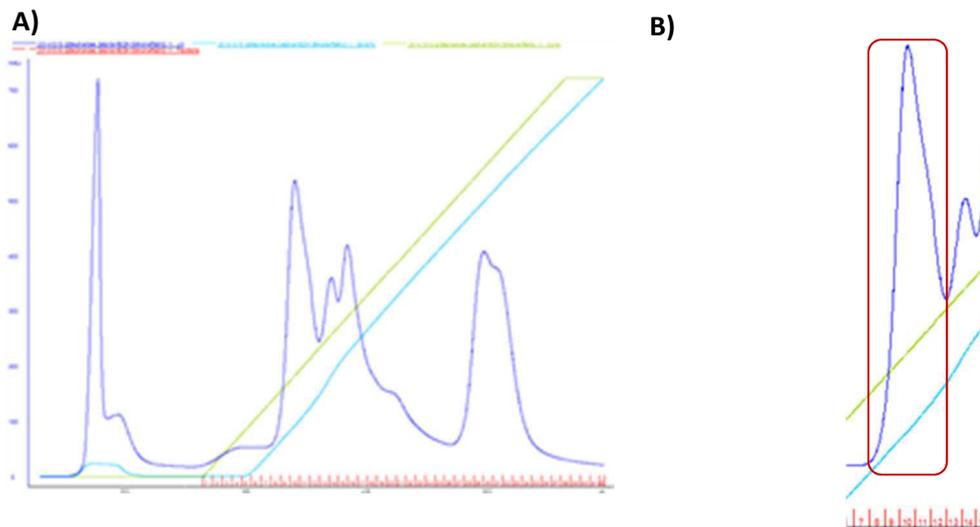


Abb. 30: Chromatogramm der Aufreinigung der 3 α -HSDH über eine Q-Sepharose-Säule (Bild A). In Bild B ist der Ausschnitt mit dem Proteinpeak der 3 α -HSDH dargestellt, der photometrisch ermittelt werden konnte. Die blaue Linie zeigt die mittels Absorption bei 280 nm gemessenen Proteinpeaks. Die hellgrüne Linie zeigt den Verlauf des Gradienten, die türkise die Leitfähigkeit. In Rot dargestellt sind die einzelnen Fraktionsnummern.

Die Aufreinigung wurde über eine SDS-Page überprüft, wie sie in Abbildung 30 dargestellt ist. Hier zeigte sich, dass durch die Aufreinigung über eine Q-Sepharose ein Großteil an *E. coli* eigenen Proteinen entfernt werden und der relative Anteil an dem gewünschten Zielprotein 3 α -HSDH bezogen auf den Gesamtproteingehalt auf ca. 80 % erhöht werden konnte. Das Enzympräparat besaß nach einem Aufreinigungsschritt einen ausreichenden Reinheitsgrad, um es in der Bestimmung der kinetischen Konstanten einzusetzen.

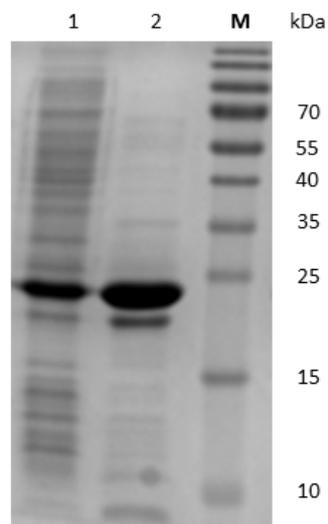


Abb. 31: SDS-Page der chromatographischen Aufreinigung des Wildtypenzym der 3 α -HSDH ohne 6xHis-Tag über Q-Sepharose. Aufgetragen wurden ca. 10 μ g Protein.

1 = Rohextrakt; 2 = aufgereinigte Fraktion.

Das so aufgereinigte Protein ohne His-Tag wurde in den Messungen bei unterschiedlichen DHCA Konzentrationen zwischen 10 μ M und 20 mM bei konstant 0,2 mM NADH eingesetzt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an DHCA konstant bei 0,1 mM gehalten und die NADH-Konzentration zwischen 10 μ M und 0,3 mM untersucht.

Ergebnisse

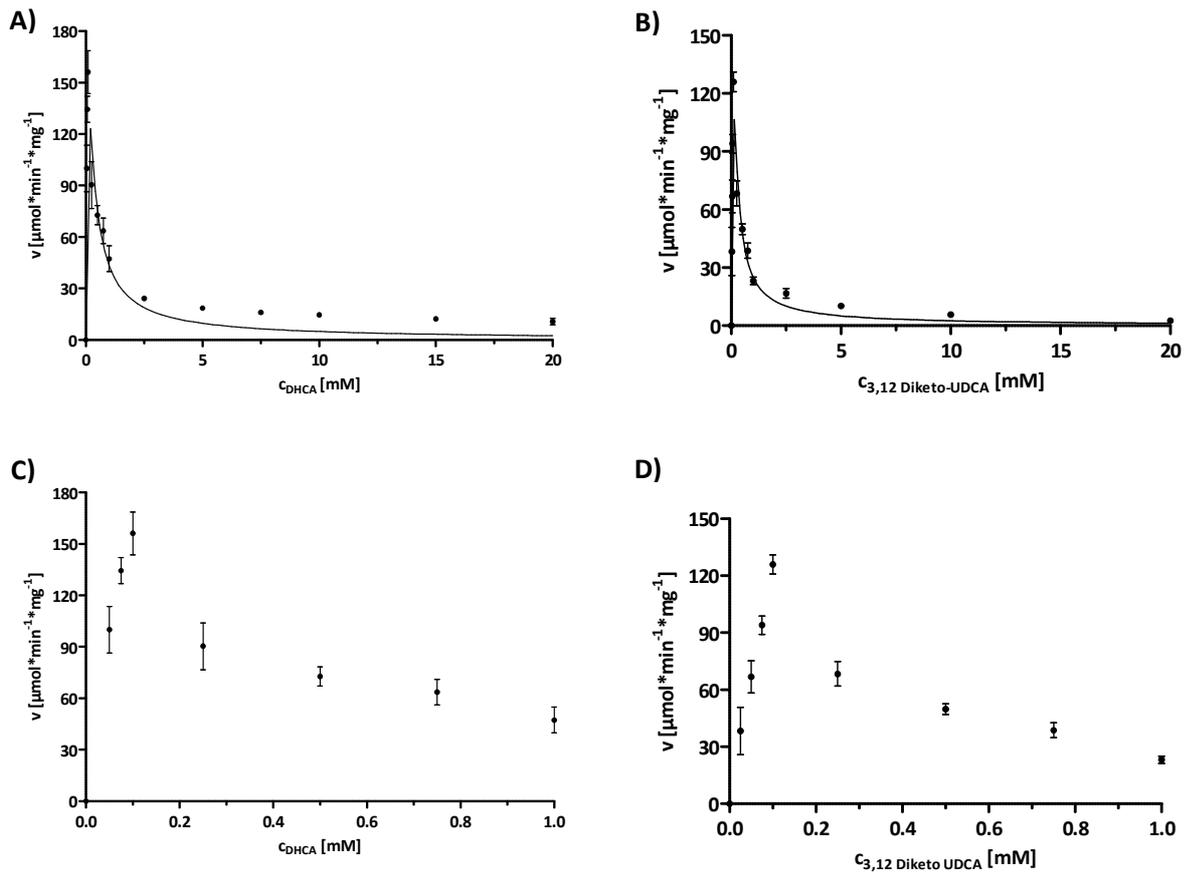


Abb. 32: Michaelis-Menten-Kinetik des Wildtyps für das Substrat DHCA (Bild A) und für das „Intermediat“ 3,12-Diketo-UDCA (Bild B). In Bild C bzw. D ist der Konzentrationsbereich bis 1 mM Substrat dargestellt. Für die Messungen wurde aufgereinigtes Protein eingesetzt, welches über keinen His-Tag verfügt.

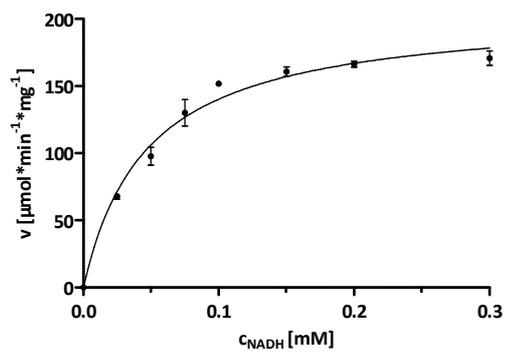


Abb. 33: Michaelis-Menten-Kinetik der 3 α -HSDH ohne His-Tag (nativ) für das Substrat NADH. Als Cosubstrat wurde eine konstante Konzentration von 0,1 mM DHCA gewählt.

Ergebnisse

Tabelle 24: Kinetische Konstanten der 3 α -HSDH ohne His-Tag für das Substrat DHCA und 3,12-Diketo-UDCA. Die Werte für DHCA sowie 3,12-Diketo-UDCA (*) wurden aufgrund der extrem ausgeprägten Substratinhibierung aus der Abbildung (siehe oben) ausgewertet. Die Messungen wurden mit aufgereinigten nativen Protein durchgeführt. X = keine Substratinhibierung

Substrat	Cosubstrat	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	K_I [mM]
*DHCA	NADH	134,3 \pm 3,8	50	< 1
*3,12-Diketo-UDCA	NADH	130	60	< 1
NADH	DHCA	168,2 \pm 6,7	47,0 \pm 6,9	x

Die Werte für Tabelle 24 mussten wie für die Messungen der Variante ohne His-Tag, also nicht aufgereinigtem Protein, aus den Michaelis-Menten Grafiken abgelesen werden, da die Substratinhibierung für den Berechnungsalgorithmus zu stark ist. Weiterhin zeigte sich, dass die maximale Geschwindigkeit (v_{\max}) um das ca. 10-fache höher liegt, als bei der Messung im Rohextrakt.

Nachfolgend werden die kinetischen Konstanten mit gereinigtem Enzympräparaten gezeigt, die über einen C-terminalen 6xHis-Tag verfügen und mittels IMAC an Ni²⁺-NTA-Material gereinigt wurden.

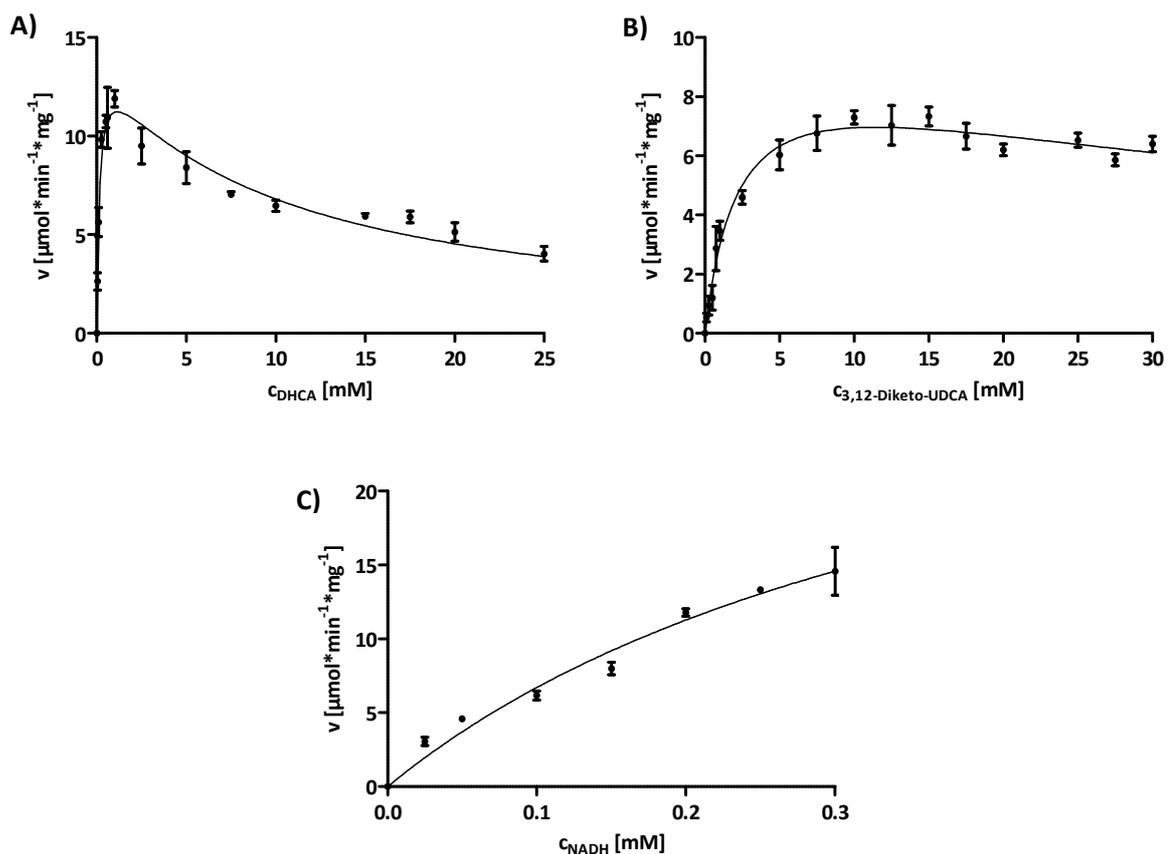


Abb. 34: Michaelis-Menten-Kinetik des Wildtyp-Enzyms mit C-terminalem His-Tag für das Substrat DHCA (Bild A) und für das „Intermediat“ 3,12-Diketo-UDCA (Bild B) sowie für den Cofaktor NADH (Bild C). Das Enzym wurde über den Hexahistidin-Rest mit C-Terminus aufgereinigt und eingesetzt.

Ergebnisse

Tabelle 25: Kinetische Konstanten der 3 α -HSDH mit C-terminalem His-Tag für das Substrat DHCA und 3,12-Diketo-UDCA sowie für den Cofaktor NADH. Die Messungen wurden mit aufgereinigtem Protein durchgeführt. X = keine Substratinhibierung.

Substrat	Cosubstrat	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	K_I [mM]
DHCA	NADH	13,9 \pm 0,8	134,3 \pm 25,6	9,8 \pm 1,4
3,12-Diketo-UDCA	NADH	9,7 \pm 0,8	2235 \pm 434	58,7 \pm 18,7
NADH	DHCA	35,4 \pm 8,0	427,2 \pm 146,3	x

Vergleicht man die jetzt vorliegenden Enzymkinetiken mit den Daten zum Wildtyp-Enzym ohne His-Tag, fällt eine interessante Veränderung auf: Anfangs wurde ein Enzym hergestellt und im Rohextrakt charakterisiert, das noch keinen His-Tag enthielt. Es hat sich aber gezeigt, dass das Enzym zumindest C-terminal mit Einbuße an Aktivität mit einem His-Tag versehen werden kann. Weiterhin sieht die Michaelis-Menten-Kinetik jetzt deutlich anders aus (siehe Abbildung 34). Charakteristisch für das Wildtyp-Enzym ohne C-terminalen His-Tag ist, dass es zwar eine hohe Affinität zum Substrat aufweist und bereits bei ca. 1 mM maximale Aktivität erreicht hat, allerdings fällt die Aktivität bei weiterer Erhöhung von DHCA drastisch ab (Abbildung 32, Bild A - Rohextrakt, Enzym ohne His-Tag). Schon bei ca. 2 mM werden offensichtlich nur ca. 50 % der Aktivität erreicht, ab ca. 3 mM dann nur noch ein Basis-Aktivitätslevel von 20 % Restaktivität. Die His-Tag-Variante am C-Terminus zeigt dagegen ein deutlich anderes Verhalten. Die Aktivität steigt mit zunehmender DHCA-Konzentration nicht ganz so stark an, d.h., die Affinität ist etwas erniedrigt. Dafür zeigt dieses Enzym aber nicht mehr die starke Substratüberschußinhibierung (Abbildung 34). Weiterhin konnte auch der sigmoidale Verlauf im Bereich niedriger Konzentrationen nicht festgestellt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse, die den Einfluss des His-Tags auf die Enzymkinetik für DHCA zeigen, wurden die kinetischen Parameter für das His-Tag-Enzym (Wildtyp) auch für die Zwischenverbindung 3,12-Diketo-UDCA aufgenommen. Die Konstanten sind in Tabelle 25 aufgeführt, das Diagramm (Abbildung 34) zeigt die Michaelis-Menten-Kinetik für die Zwischenverbindung. Anhand der Grafik und Tabelle fällt auf, dass das Enzym eine deutlich geringere Affinität zur Zwischenverbindung 3,12-Diketo-UDCA gegenüber DHCA besitzt. Der K_M -Wert ist um den Faktor 16 höher bzw. schlechter. Weiterhin ist der K_I -Wert für das Intermediat sehr hoch, was bedeutet, dass man eigentlich nicht mehr von einer Substratinhibierung sprechen kann.

Diese Versuche haben gezeigt, dass ein C-terminaler His-Tag positive Veränderungen kinetischer Eigenschaften der 3 α -HSDH ergeben. Für technische Anwendungen des Enzyms ist der Einsatz möglichst hoher Substratkonzentrationen wünschenswert, insofern stellt die starke Substratinhibierung ein signifikantes Problem dar. Dieses Problem besteht mit den Enzymvarianten mit C-terminalem His-Tag nicht mehr.

Ergebnisse

Nach diesen doch sehr positiven Veränderungen durch den C-terminalen Tag wurde in der Folge der Einfluss des N-terminalen His-Tags auf kinetische Eigenschaften des Enzyms untersucht werden.

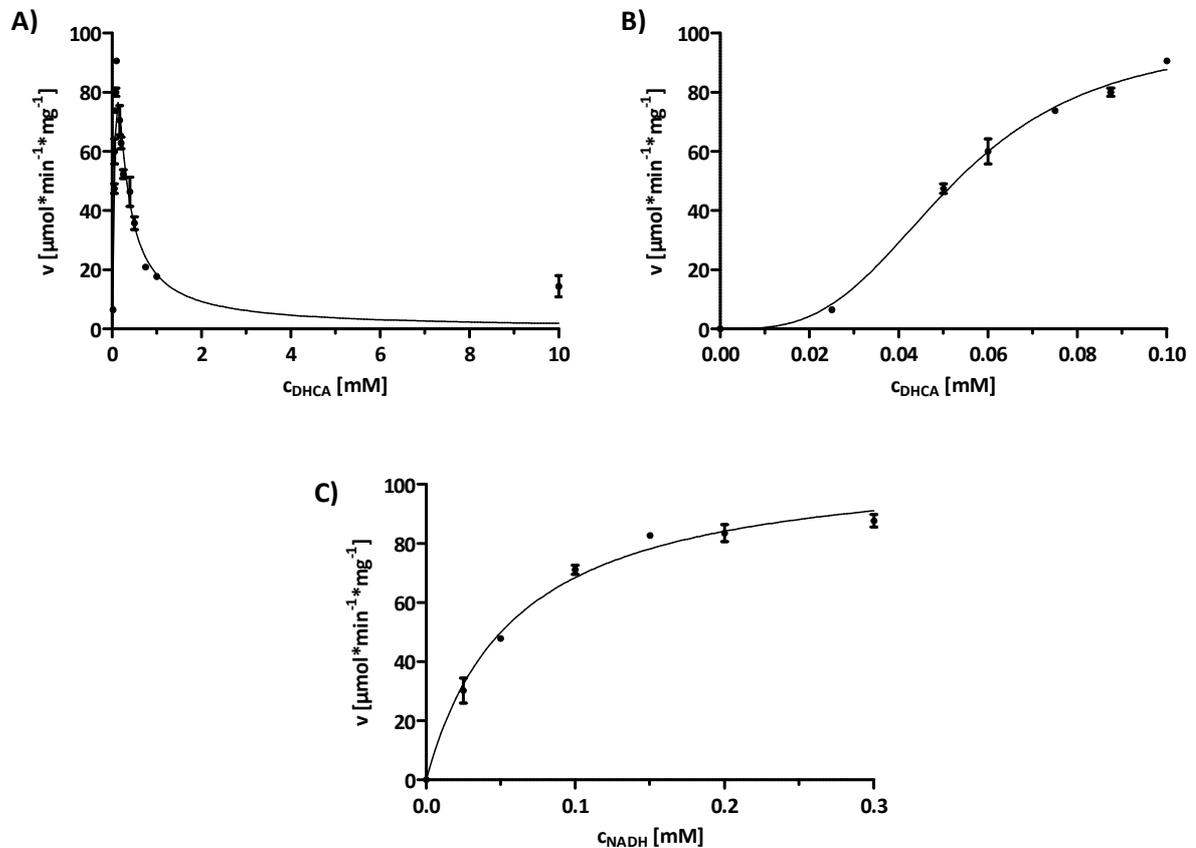


Abb. 35: Michaelis-Menten-Kinetik des Wildtyps für das Substrat DHCA (Bild A) und den Cofaktor NADH (Bild C). In Bild B ist der Konzentrationsbereich bis 0,1 mM DHCA dargestellt. Das Enzym wurde über einen N-terminalen Hexahistidin-Rest aufgereinigt und eingesetzt.

Tabelle 26: Kinetische Konstanten der 3 α -HSDH mit N-terminalem His-Tag für das Substrat DHCA und NADH. Die Messungen wurden mit aufgereinigtem Protein durchgeführt. Aufgrund der starken Substratüberschussinhibition wurden die Werte bis 0,1 mM DHCA benutzt, um die apparenten konstanten zu berechnen. X = keine Substratinhibition.

Substrat	Cosubstrat	v_{max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	K_i [mM]H
DHCA	NADH	98,7 \pm 4,8	50*	< 1
NADH	DHCA	109,0 \pm 3,7	59,2 \pm 6,4	x

Die Enzymvariante mit N-terminalem His-Tag zeigt ein ähnliches Verhalten wie das Enzympräparat ohne His-Tag. Allerdings resultiert der im Vergleich zum nicht getaggten gereinigten Wildtyp-Enzym niedrigere v_{max} -Wert daraus, dass für die Messungen mit dem N-terminalen His-Tag aufgereinigtes Protein eingesetzt wurde. Bei den Messungen mit den Proteinpräparaten ohne Hexahistidinanhang zeigt sich insbesondere bei dem Substrat 3,12-Diketo-UDCA eine stärkere Ausprägung der sigmoidalen

Ergebnisse

Kurve. Bei einer hohen Konzentration an DHCA zeigt sich auch der starke Aktivitätsverlust zwischen 0,5 und 2,0 mM mit der dann gleichbleibenden Restaktivität von rund 20 %.

Die biochemische Charakterisierung der 3 α -HSDH hat gezeigt, dass das Enzym eine sehr ausgeprägte Substratinhibierung aufweist, die mit bisher keinem bekannten Enzym vergleichbar ist. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass ein Hexahistidinrest am C-Terminus des Proteins die Eigenschaft in Bezug auf die Substratinhibierung beeinflusst. Die Inhibierung ist in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 2,5 mM weniger ausgeprägt. Eine weitere Eigenschaft des Enzyms ist, dass sowohl die Affinität als auch der v_{\max} für das Intermediat 3,12-Diketo-UDCA bedeutend schlechter sind.

5.2.2. Einfluss des His-Tags

5.2.2.1. Biochemische Untersuchung

In Abschnitt 4.2.1. konnte ein Einfluss des C-terminalen His-Tag auf die biochemischen Eigenschaften des Proteins festgestellt werden. Dieser geht soweit, dass die Substratinhibierung in Anwesenheit von DHCA in einem niedrigeren Konzentrationsbereich weniger ausgeprägter ist. In Abbildung 36 ist das Verhalten der 3 α -HSDH ohne His-Tag und je eine Variante mit Hexahistidin am C- bzw. N-Terminus vergleichend dargestellt.

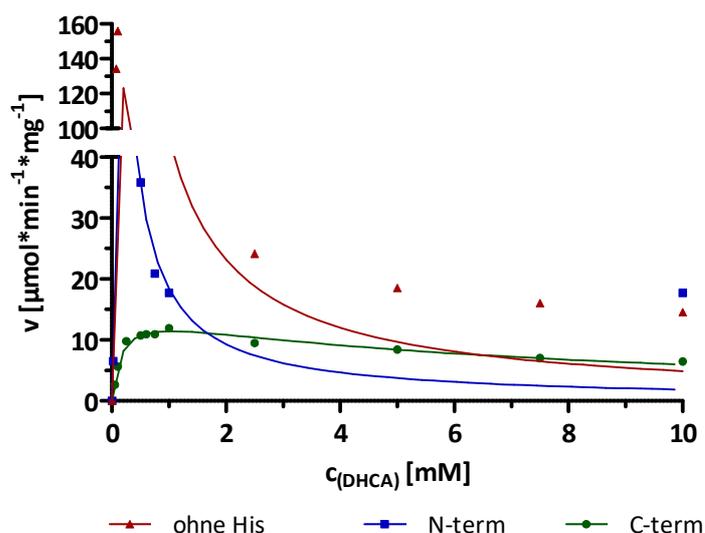


Abb. 36: Einfluss des His-Tags auf die Enzymeigenschaften der 3 α -HSDH. Die Variante ohne His-Tag ist in rot, die Variante mit N-terminalem His-Tag ist in blau und die mit dem C-terminalen ist in grün dargestellt. Für die Messungen wurde aufgereinigtes Protein eingesetzt.

Ergebnisse

Die Abbildung 36 zeigt, dass sich die Enzymvarianten mit einem N-terminalen 6xHistidin-Tag und dem Wildtyp-Enzym ohne His-Tag nicht allzu sehr unterscheiden. Die gemeinsame Charakteristik liegt in der hohen Affinität zum Substrat, die bereits bei ca. 0,2 mM Substrat maximale Aktivität erreicht, allerdings fällt die Aktivität bei weiterer Erhöhung von DHCA drastisch ab. Die Variante mit einem C-terminalen His-Tag dagegen weist diese Eigenschaft nicht auf. Hier wird zwar auch die maximale Aktivität in Gegenwart von DHCA in einem niedrigen Konzentrationsbereich erzielt, aber v_{\max} ist im Vergleich zu der Variante ohne His-Tag um die Hälfte geringer.

Dies lässt vermuten, dass der Histidinanhang am C-Terminus Einwirkungen auf die katalytische Aktivität hat. Um das zu überprüfen, wurde mittels QuikChange™-PCR der Histidinanhang am C-Terminus auf 3 Histidine verkürzt bzw. auf einen Rest mit 9 Histidinen erweitert. Diese zwei Varianten wurden mittels Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigt, umgepuffert, ihre kinetischen Parameter und der Proteingehalt bestimmt. Die Expression sowie die Aufreinigung wurden mittels SDS-PAGE überprüft. Über das SDS-Gel konnte weiterhin noch der Anteil an gebildetem Enzym an der Gesamtmenge abgeschätzt werden.

Tabelle 27: Vergleich der kinetischen Konstanten der 3 α -HSDH mit unterschiedlicher Anzahl an Histidinresten am C-Terminus. Die Konstanten wurden mit DHCA-Konzentration zwischen 10 μ M und 10 mM aufgenommen. Die Konzentration an NADH betrug 0,2 mM. Für die Messungen wurde aufgereinigtes Protein eingesetzt.

Länge des His-Tag	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	K_i [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]
3	14,3 \pm 4,8	997,9 \pm 483	1,3 \pm 0,6	6,5 \pm 2,1	6,5 \pm 2,1
6	14,6 \pm 0,9	134,3 \pm 25,6	9,8 \pm 1,4	6,3 \pm 0,7	47,2 \pm 5,4
9	19,2 \pm 1,1	70,5 \pm 14,2	4,2 \pm 0,8	8,9 \pm 0,5	126,3 \pm 4,9

Die kinetischen Konstanten, die in Tabelle 27 dargestellt sind, bestätigen die Vermutung, dass der C-terminale Histidinrest die katalytische Eigenschaft beeinflusst. Aus der Tabelle geht sehr deutlich hervor, dass zum einen die Affinität steigt, je länger der His-Tag ist. Die Enzymvariante mit einem Anhang von 9 Histidinen zeigt einen 14-fach besseren K_M -Wert gegenüber der Variante mit 3 Histidinen am C-Terminus. Weiterhin steigt die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) mit Länge der Histidinkette signifikant an. Die Variante mit 9 Histidinen hat eine 19-fache höhere Effizienz als die Variante mit nur 3 Histidinen.

Die Aminosäure Histidin zählt sowohl zu den aromatischen als auch zu den basischen Aminosäuren. Zu den basischen gehört weiterhin die Aminosäure Lysin. Lysin besitzt im Vergleich zu Histidin eine stärkere Basizität. Aufgrund dieser Eigenschaft sollte eine 3 α -HSDH Variante mit einem Hexalysinrest konstruiert werden, um den Einfluss auf die Aktivität des Enzyms zu testen. Diese Variante wurde

Ergebnisse

ebenfalls einer Aktivitätsmessung mit einer Konzentration von 0,2 mM NADH als Coenzym unterzogen. Alle Aktivitätstests wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden nach Expression mittels Ultraschall aufgeschlossen, Proteingehalt bestimmt und die Expression mittels SDS-PAGE überprüft. Das SDS-Bild zeigte, dass hier, wie bei den Varianten mit oder ohne His-Tag, eine sehr gute Expression stattfand. Hier konnte eine Aktivität von 0,7 U mg⁻¹ bestimmt werden, d.h. dass aufgrund der höheren Basizität des Lysinrests am C-Terminus die katalytische Aktivität deutlich nachteilig beeinflusst wird. In Abbildung 37 wurden die Aktivitäten des Rohextraktes der 3 α -HSDH Varianten im Standardassay verglichen. Die Aktivität der 3 α -HSDH mit N-terminalem His-Tag wurde als 100 % (5,3 U mg⁻¹) gesetzt.

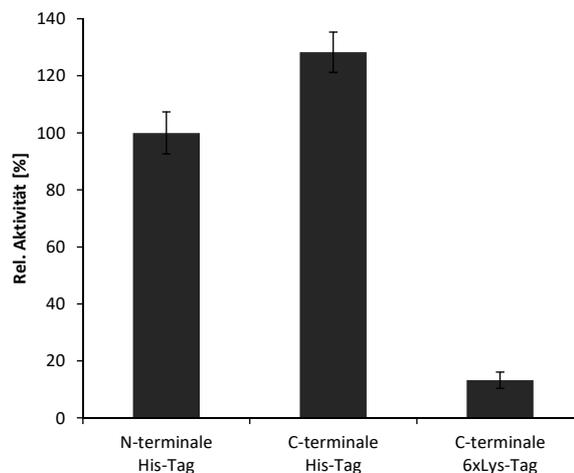


Abb. 37: Vergleich der Aktivitäten der 3 α -HSDH mit verschiedenen Tags. Als 100 % wurde die Aktivität im Standardassay (10 mM DHCA, 0,2 mM NADH) die Variante mit N-terminalen 6xHis-Tag gewählt. Die Aktivität betrug 5,3 U mg⁻¹.

Anhand der Abbildung 37 zeigt sich, dass beim Standard Aktivitätsassay (10 mM DHCA) die C-terminale Variante eine um ca. 39 % höhere Aktivität aufweist als das Enzym mit dem N-terminalen His-Tag bzw. ohne His-Tag. Weiterhin ist erkennbar, dass die Aktivität der Variante mit Hexalysin-Anhang geringer ist. Die Aktivität sinkt im Vergleich mit der N-getaggten Variante auf ca. 10 % der eigentlichen Aktivität.

5.2.2.2. Thermoflourscreen

Eine weitere Methode der Proteincharakterisierung ist der „thermal shift assay“, oder auch besser bekannt als Thermofluor-Screen (Boivin et al., 2013; Lavinder et al., 2009; Pantoliano et al., 2001). Der Assay erlaubt es, in Gegenwart von verschiedenen Additiven als auch Puffersystemen mit verschiedenen pH-Werten einen spezifischen Schmelzpunkt des jeweiligen Proteins zu ermitteln. Wie stabil ein Protein ist, hängt von vielen Faktoren ab. Diese kann durch Zugabe von Additiven erhöht werden, kann aber auch durch das verwendete Puffersystem als auch den verwendeten pH-Wert

Ergebnisse

beeinflusst werden. Eine erhöhte oder auch erniedrigte Stabilität äußert sich in einer veränderten Thermostabilität. Diese Eigenschaft macht man sich in der Kristallographie zu Nutze, um die besten Bedingung zu finden, unter denen ein Protein kristallisiert (Ericsson et al., 2006). Diese Methode beruht auf der Interaktion eines Farbstoffes, der an den hydrophoben Bereichen des Proteins bindet und dadurch fluoresziert. Durch die graduelle Erhöhung der Temperatur werden bei beginnender Denaturierung hydrophobe Bereiche des Proteins frei, die im nativen Zustand im Inneren der Proteinstruktur liegen. Durch die Wechselwirkung mit den offengelegten hydrophoben Regionen bzw. Strukturen erhöht sich die Fluoreszenz, die vorher durch das wässrige Milieu abgefangen wurde. Die Änderung der Fluoreszenz kann als relative Fluoreszenzintensität (RFU) detektiert werden und daraus der Schmelzpunkt (T_M) des Proteins bestimmt werden. Mithilfe des Thermofluorescreens wurde der Einfluß des His-Tags auf die 3 α -HSDH in 50 mM KPi-Puffer im Bereich von 6,0 bis 8,0 untersucht.

Die verschiedenen Varianten (N- und C-terminaler 6xHis-tag als auch 9xHis am C-Terminus) wurden exprimiert (Kapitel 4.1.2.), aufgereinigt (Kapitel 4.2.6.) und in 50 mM KPi-Puffer in einem pH-Bereich von 5,8 bis 8,0 in 0,2er Schritten untersucht. In Abbildung 38 ist das Ergebnis in KPi-Puffer mit einem pH-Wert 8,0 dargestellt.

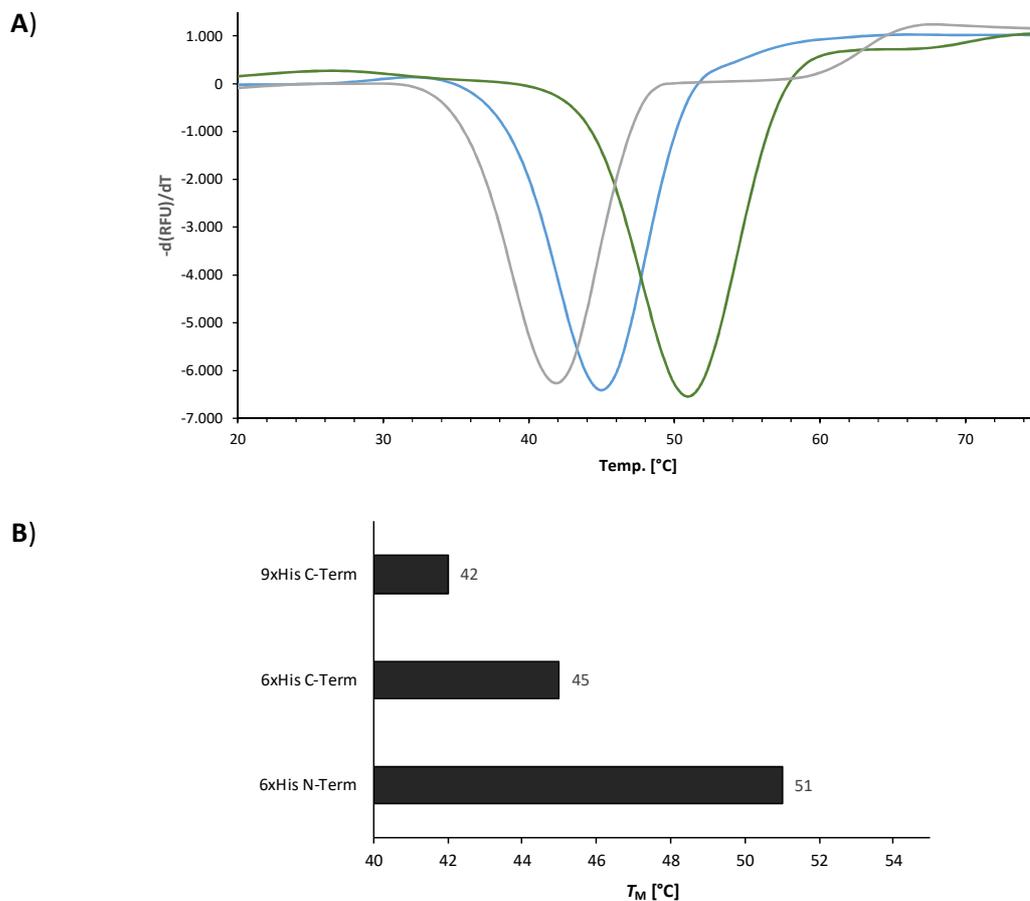


Abb. 38: Ergebnis der Thermostabilität aus dem Thermofluorescreen für die verschiedenen Varianten der getaggen 3 α -HSDH in 50 mM KPi (pH 8,0). In Bild **A**) ist die Ableitung dargestellt (grau = 9xHis C-term; blau = 6xHis C-term; grün = 6xHis N-term). In Bild **B**) ist der jeweils ermittelte T_m -Wert in einem Balkendiagramm dargestellt.

Ergebnisse

Aus der Messung ging hervor, dass der pH-Bereich von 5,8 bis 8,0 keinen Einfluss auf die Thermostabilität der 3 α -HSDH hat. Hier wurde immer der gleiche T_M -Wert für die jeweilige Variante ermittelt (Daten nicht gezeigt). Aus Abbildung 38 ist deutlich zu erkennen, dass bei den verschiedenen Varianten unterschiedliche Schmelzpunkte ermittelt wurden, obwohl es sich immer um dasselbe Protein handelt. Das bedeutet, dass der His-Tag am C-Terminus einen Einfluss auf das Protein hat. Aus den ermittelnden Konstanten für die am N-Terminus getaggte Variante und die nicht getaggte kann man sagen, dass dieser keinen Einfluss besitzt. Daher ist zu vermuten, dass der Schmelzpunkt der nicht getaggten Variante ähnlich dem der N-terminalen Variante ist. Ein weiterer Punkt ist die Länge des Tags am C-Terminus. Eine Variante besitzt einen 9xHis-Tag und diese Variante besitzt einen Schmelzpunkt von ca. 42 °C, welcher gegenüber der Standardlänge von 6 Histidinen um ca. 3°C niedriger ist.

Es konnte ein Einfluss des C-terminalen His-Tags am Protein nachgewiesen werden, der die Eigenschaften insbesondere des Verhaltens bei niedriger Substratkonzentration gegenüber Gallensäuren verändert. Die katalytische Effizienz wurde sukzessiv mit der Verlängerung des His-Tags gesteigert. Die Variante mit einem 9xHis-Tag besitzt gegenüber der Variante mit nur 3xHis-Tag eine 20-fach höhere katalytische Aktivität. Dagegen besitzt die Variante mit dem 9xHis-Tag den niedrigsten Schmelzpunkt.

5.2.3. Mutanten mit verbesserter Aktivität

Wie die 7 β -HSDH gehört auch die 3 α -HSDH zur Klasse der SDR. Damit sollte nach der Theorie von Charlier und Plapp die Aktivität durch Veränderung der Cofaktor-Bindestelle gesteigert werden können. Charlier und Plapp postulieren, dass die Bindung des Cofaktors am aktiven Zentrum des Enzyms der limitierende Schritt sei (Charlier and Plapp, 2000). Bei der 7 β -HSDH konnten drei Positionen für diese Wechselwirkung identifiziert werden. Analog dazu wurden die Positionen der 3 α -HSDH, die für die Coenzym-Bindung verantwortlich sind, mutagenisiert und charakterisiert.

Ergebnisse

5.2.3.1. Mutagenese der Position 34

Analog zur Optimierung der Cofaktorspezifischen Region der 7 β -HSDH zur Aktivitätssteigerung wurde die Optimierung der 3 α -HSDH durchgeführt. Die Position 34, welches ein Arginin ist, wurde daher Ziel der Mutagenese. Das Arginin wurde im Folgenden durch ein Asparagin, Cystein, Serin, Leucin und Glutamin ersetzt. Eine Aktivitätssteigerung konnte mit den Mutanten Cystein, Serin sowie Asparagin erzielt werden, wobei letztere die Mutante mit der höchsten Steigerung der Aktivität darstellt.

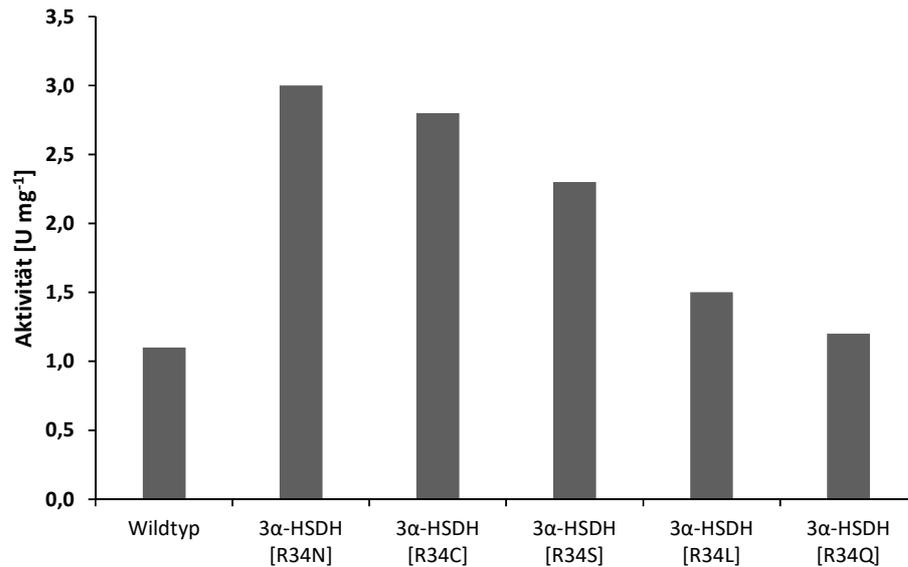


Abb. 39: Vergleich der Aktivitäten der Mutanten mit dem Wildtyp der 3 α -HSDH, die an der Position R34 verändert wurden. Die Standardaktivitätsmessung (10 mM DHCA, 0,2 mM NADH in 50 mM KPi pH 8,0) wurde mit Rohextrakt durchgeführt.

Um die enzymkinetischen Parameter der 3 α -HSDH [R34N] zu bestimmen, wurde das Gen der 3 α -HSDH(C)[R34N] unter Verwendung des Plasmids pET28a_3 α -HSDH(C) [R34N] in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Diese Variante besitzt einen C-terminalen 6xHis-Tag. Der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen wurde mittels Ni-NTA aufgereinigt und Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 10 μ M und 25 mM für DHCA bei konstant 0,2 mM NADPH durchgeführt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an DHCA konstant bei 1 mM gehalten und die NADPH-Konzentration zwischen 10 μ M und 0,25 mM untersucht. In Abbildung 40 sind die Verlaufsdiagramme und in Tabelle 28 die Werte für die 3 α -HSDH Mutante dargestellt.

Ergebnisse

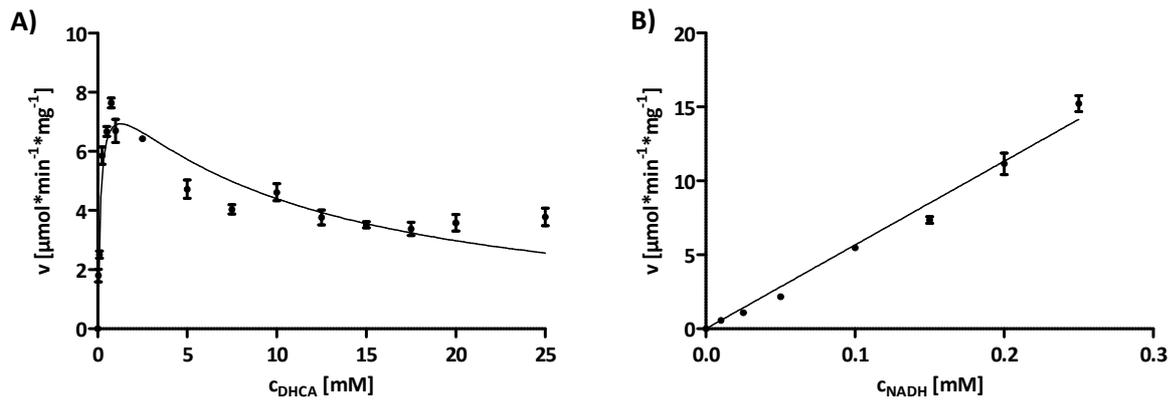


Abb. 40: Michaelis-Menten-Kinetik der Mutante R34N für das Substrat DHCA (Bild A) und für den Cofaktor NADH (Bild B).

Tabelle 28: Kinetische Konstanten der 3α -HSDH [R34N] für das Substrat DHCA und den Cofaktor NADH. n.b. = nicht bestimmt; X = keine Substratinhibierung.

Enzym	Substrat	Cosubstrat	v_{max} [U mg^{-1}]	K_M [μM]	K_I [mM]
R34N	DHCA	NADH	$8,6 \pm 0,5$	$154,1 \pm 30,0$	$10,6 \pm 1,5$
	NADH	DHCA	n.b.	n.b.	x
Wt	DHCA	NADH	$13,9 \pm 0,8$	$134,3 \pm 25,6$	$9,8 \pm 1,4$

Die Mutation R34N für die Modifikation der Cofaktorspezifitätsequenz hat gezeigt, dass keine Verbesserung der Aktivität erzielt werden konnte. Es fällt weiterhin auf, dass die kinetischen Konstanten für den Cofaktor nicht bestimmt werden konnten, weil die Messung zeigt, dass eine lineare und keine typische hyperbolische Beziehung zwischen NADH-Konzentration und Reaktionsgeschwindigkeit besteht. Ein solcher Zusammenhang nach Michaelis-Menten besteht offenbar erst bei deutlich höheren Konzentrationen, die hier messtechnisch nicht erreicht wurden.

5.2.3.2. Mutagenese der Position 68

Die Position 68 der 3α -HSDH wurde analog zu dieser Position der 7β -HSDH (Position 64) durchgeführt. Das Leucin befindet am Ende eines β_4 -Faltblattes im *Rossmann fold* bei NAD(H)-abhängigen SDRs (Grimm et al., 2000; Hoffmann et al., 2007) und wurde daher gegen verschiedene Aminosäuren ausgetauscht. In Tabelle 29 sind alle Mutanten aufgeführt, die Aktivität zeigten. Die Mutanten mit einer sauren Aminosäure (L68E, L68D) zeigten keine Aktivität, die Mutanten L68K sowie L68Q wiesen eine schwache Aktivität von ca. $0,1 \text{ U mg}^{-1}$ im Rohextrakt.

Ergebnisse

Tabelle 29: Aktivität der verschiedenen 3 α -HSDH-Varianten, die an der Position 68 verändert wurden. Die Messungen des Standardaktivitätsassay wurden mit Rohextrakt durchgeführt.

erzeugte Mutanten	Volumetrische Aktivität [U ml ⁻¹]	spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]
3 α -HSDH (WT)	45	2,1
3 α -HSDH [L68A]	157	6,4
3 α -HSDH [I68C]	58	3,4
3 α -HSDH [L68K]	40	3,1
3 α -HSDH [L68S]	40	3,1
3 α -HSDH [L68V]	60	2,3

Die L68A Mutante zeigte die höchste Aktivität und wurde daher zur Bestimmung der kinetischen Konstanten herangezogen.

Um die enzymkinetischen Parameter der 3 α -HSDH [L68A] zu bestimmen, wurde das Gen der 3 α -HSDH(C)[L68A] unter Verwendung des Plasmids pET28a_3 α -HSDH(C)[L68A] in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Diese Variante besitzt einen C-terminalen 6xHis-Tag. Der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen wurde mittels Ni-NTA-Chromatografie aufgereinigt und in Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 10 μ M und 25 mM für DHCA bei konstant 0,2 mM NADPH eingesetzt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an DHCA konstant bei 1 mM gehalten und die NADPH-Konzentration zwischen 10 μ M und 0,3 mM untersucht. In Abbildung 41 sind die Verlaufsdigramme und in Tabelle 30 die Werte für die 3 α -HSDH Mutante dargestellt.

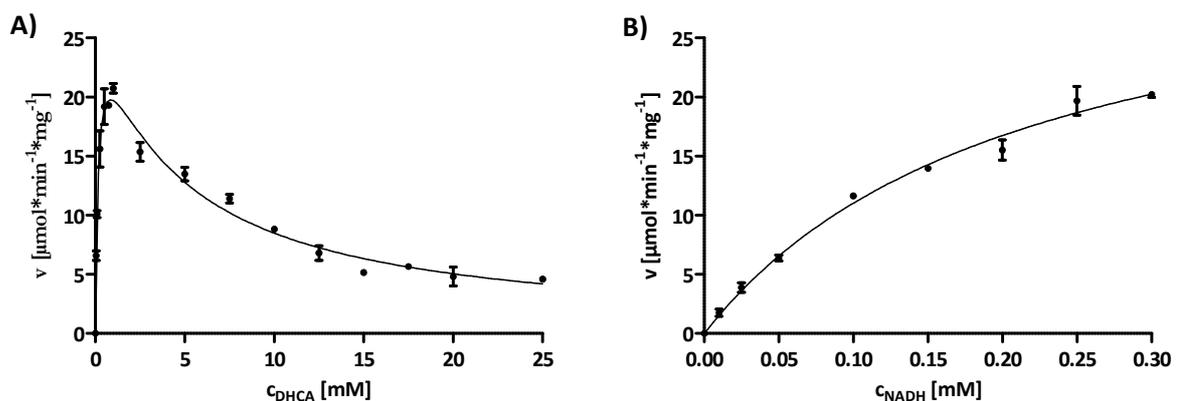


Abb. 41: Michaelis-Menten-Kinetik der 3 α -HSDH Mutante L68A für das Substrat DHCA (Bild A) und für den Cofaktor NADH (Bild B). Es wurde aufgereinigtes Protein eingesetzt, welches über einen C-terminalen 6xHis-Tag verfügt.

Ergebnisse

Tabelle 30: Kinetische Konstanten der 3 α -HSDH [L68A] für das Substrat DHCA und den Cofaktor NADH. X = keine Inhibierung.

Enzym	Substrat	Cosubstrat	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	K_I [mM]
L68A	DHCA	NADH	27,3 \pm 1,2	165,2 \pm 20,6	4,6 \pm 0,4
	NADH	DHCA	34,8 \pm 2,8	215,4 \pm 32,8	x
Wt	DHCA	NADH	13,9 \pm 0,8	134,3 \pm 25,6	9,8 \pm 1,4

Anhand der Abbildung 41 und Tabelle 30 erkennt man, dass der Austausch des Leucins zu einem kleineren Alanin die maximale Geschwindigkeit um ca. 100 % gesteigert hat. Der K_M -Wert hat sich ebenfalls um den Faktor 2 verbessert.

Die Mutagenese des Leucins an Position 68 hat gezeigt, dass diese Position im *Rossmann fold* eine essentielle Rolle in der katalytischen Aktivität des Proteins einnimmt. Wie bei der 7 β -HSDH konnten hier die Eigenschaften verbessert werden.

Für die vorab gezeigten Daten wurde das Enzym mit einem C-terminalen 6xHis-Tag eingesetzt. Da vorab bereits gezeigt wurde, dass sich die kinetischen Eigenschaften deutlich mit der Länge des His-Tags verbessern, wurden die kinetischen Daten für die L68A-Mutante mit C-terminalem 9xHis-Tag aufgenommen. Diese Variante wurde durch QuikChange[®]-PCR erzeugt; für die Charakterisierung wurde das Gen des Enzyms unter Verwendung des Plasmids pET28a_3 α -HSDH(9his)[L68A] in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen wurde mittels Ni-NTA aufgereinigt und Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 10 μ M und 10 mM für DHCA bei konstant 0,2 mM NADPH durchgeführt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an DHCA konstant bei 1 mM gehalten und die NADPH-Konzentration zwischen 10 μ M und 0,3 mM untersucht. In Abbildung 42 sind die Verlaufsdigramme und in Tabelle 31 die Werte für die 3 α -HSDH Mutante dargestellt.

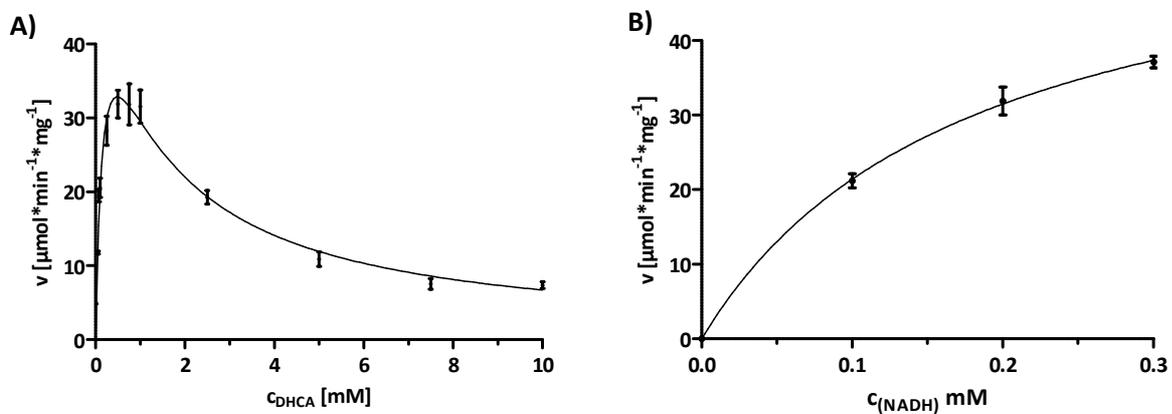


Abb. 42: Michaelis-Menten-Kinetik der Mutante L68A mit einem 9xHistidinrest am C-Terminus für das Substrat DHCA (Bild A) und für den Cofaktor NADH (Bild B). Für die Messungen wurde aufgereinigtes Protein eingesetzt.

Ergebnisse

Tabelle 31: Kinetische Konstanten für die 3 α -HSDH [L68A] mit einem 9fachen Histidin-Anhang für das Substrat DHCA und den Cofaktor NADH. X = keine Substratinhibierung.

Enzym	Substrat	Cosubstrat	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	K_i [mM]
L68A (9xHis)	DHCA	NADH	56,5 \pm 4,8	175,0 \pm 27,9	1,35 \pm 0,23
	NADH	DHCA	59,5 \pm 5,5	177,7 \pm 35,8	x
Wt	DHCA	NADH	13,9 \pm 0,8	134,3 \pm 25,6	9,8 \pm 1,4

Tabelle 32: Kinetische Konstanten der Enzymvariante 3 α -HSDH [L68A] mit einem 6xHis-Tag bzw. 9xHis-Tag am C-Terminus.

Variante	Substrat	Cosubstrat	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ /mM]
3 α -HSDH [L68A] 6xHis	DHCA	NADH	165,2 \pm 20,6	12,5 \pm 0,5	75,6 \pm 5,5
3 α -HSDH [L68A] 9xHis	DHCA	NADH	175,0 \pm 27,9	26,3 \pm 2,2	150,0 \pm 9,7

Anhand Tabelle 32 geht hervor, dass die maximale Geschwindigkeit der 3 α -HSDH [L68A] durch das Anbringen eines 9xHis-Tags gegenüber dem Standard-Tag mit 6xHis verdoppelt werden konnte, dies trifft auch für die katalytische Effizienz zu.

5.2.3.3. Mutagenese der Position 188

Das Threonin an Position 188 befindet sich in einer flexiblen Schleife, welche von Hwang *et. al.* als Substrat-Binde-Domäne identifiziert werden konnte (Hwang et al., 2013). Das Threonin an Position 188 als auch an Position 185 gehen eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Cofaktor NAD(H) ein und sind daher für das Protein von Bedeutung in der katalytischen Aktivität. Durch Substitution des Threonins in ein kleineres Glycin (Position 188) bzw. Alanin (Position 185) konnte laut Hwang eine erhöhte Aktivität mit dem Substrat Androsteron festgestellt werden. Die Position 188 wurde in der Bachelorarbeit von S. Rath ebenfalls mutagenisiert, da im Vergleich zur Änderung der Position 185 eine deutlich erhöhte Aktivität an Position 188 festgestellt werden konnte, und mit dem Substrat DHCA getestet (Rath, 2015). Im Folgenden wurden die beiden Mutanten T188A und T188G übernommen und in der Abbildung 43 die Michaelis-Menten Kinetik dargestellt.

Ergebnisse

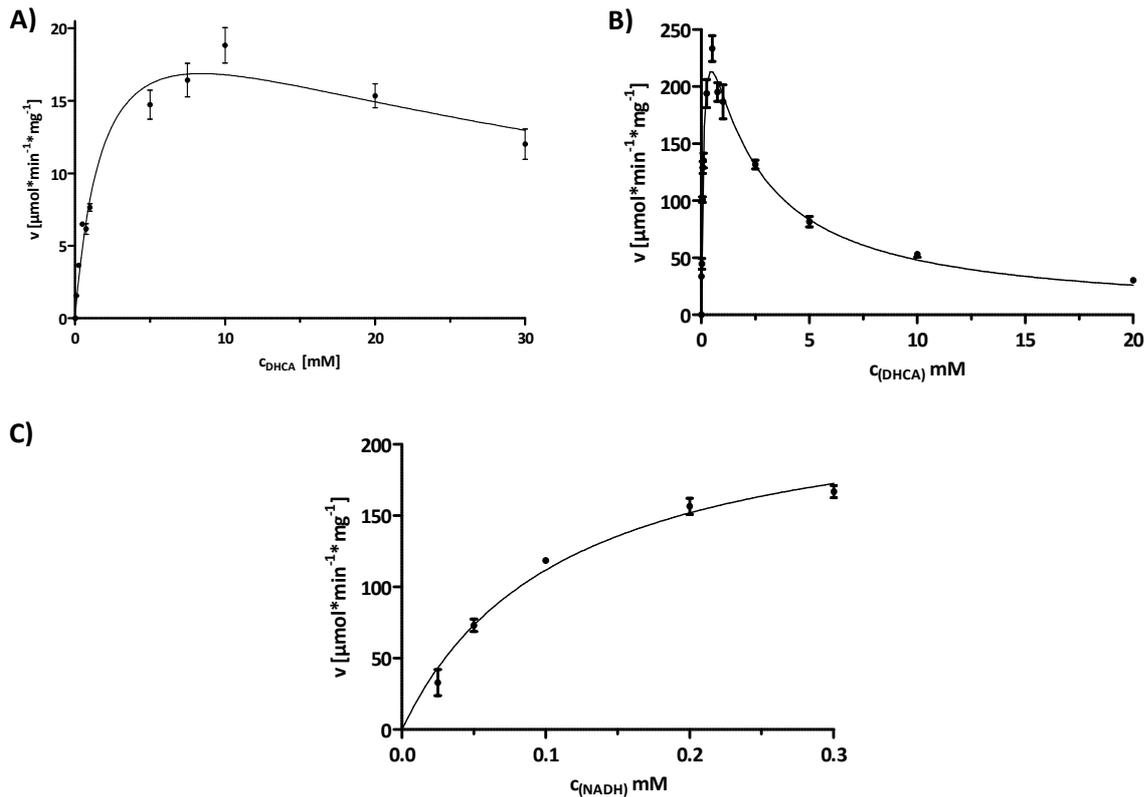


Abb. 43: Michaelis-Menten-Kinetik der Mutanten T188G (Bild A) und T188A (Bild B und C) mit einem 6xHistidinrest am N-Terminus für das Substrat DHCA (Bild A und B) und für den Cofaktor NADH (Bild C). Für die Messungen wurde aufgereinigtes Protein eingesetzt.

Tabelle 33: Kinetische Konstanten für die 3 α -HSDH [T188G] sowie [T188A] mit einem 6xHistidin-Tag am N-Terminus für das Substrat DHCA und den Cofaktor NADH. X = keine Substratinhibierung; a = Manuel berechnet.

Enzym	Substrat	Cosubstrat	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	K_I [mM]
T188G	DHCA	NADH	25,0 \pm 2,3	2022 \pm 376,3	34,9 \pm 9,5
T188A	DHCA	NADH	327,4 \pm 18,9	122,0 \pm 14,8	1,73 \pm 0,2
Wt	DHCA	NADH	98,7 \pm 4,8	50 \pm 10 ^a	1,0 \pm 0,5 ^a

Anhand der Abbildung 43 und der Tabelle 33 kann man erkennen, dass der Austausch zu einem Glycin die Aktivität drastisch verringert. Das liegt vermutlich daran, dass das bedeutend kleinere Glycerin keine Wasserstoffbrückenbindung zum Cofaktor bilden kann. Das wird aus dem sehr hohen K_M -Wert ersichtlich, dieser ist zur Alanin-Mutante um den Faktor 19 höher. Das im Vergleich zum Glycin etwas größere Alanin besitzt nicht nur einen ähnlichen K_M -Wert wie das Wildtyp Enzym, sondern auch eine um den Faktor 13 höhere Aktivität. Im Vergleich zum Wildtyp ist der v_{\max} doppelt so hoch, aber es zeigt sich eine weniger ausgeprägte Substratinhibierung, was bedeutet, dass in Biotransformationen mit hohen Substratkonzentrationen das Protein eine höhere Aktivität im gesamten Verlauf besitzt.

Ergebnisse

5.2.3.4. Kombination der Mutagenesepositionen

Die Einzelmutante L68A zeigte eine erhöhte Aktivität gegenüber Gallensäuren und R34N zeigte ein verbessertes Verhalten gegen den Cofaktor. Im Nachfolgenden soll geprüft werden, ob sich die einzelnen Mutationen kombinieren lassen und damit zu einem weiter verbesserten Enzym führen.

Um die enzymkinetischen Parameter der 3 α -HSDH [R34N/L68A] zu bestimmen, wurde das Gen der 3 α -HSDH(C)[R34N/L68A] unter Verwendung des Plasmids pET28a_3 α -HSDH(C)[R34N/L68A] in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Diese Variante besitzt einen C-terminalen 6xHis-Tag. Der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen wurde mittels Ni-NTA aufgereinigt und in Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 10 μ M und 30 mM für DHCA bei konstant 0,2 mM NADPH eingesetzt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an DHCA konstant bei 1 mM gehalten und die NADPH-Konzentration zwischen 10 μ M und 0,3 mM untersucht. In Abbildung 44 sind die Verlaufsdiagramme und in Tabelle 34 die Werte für die 3 α -HSDH Mutante dargestellt.

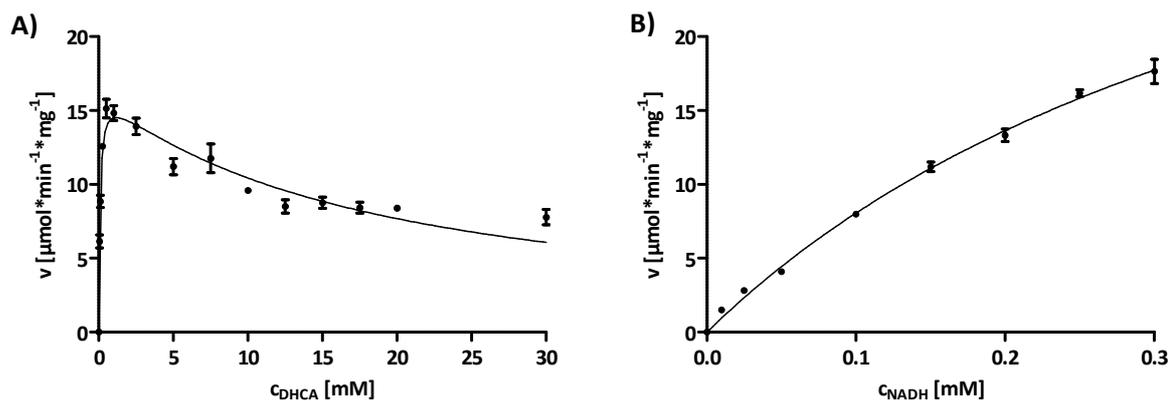


Abb. 44: Michaelis-Menten-Kinetik der Mutante R34N/L68A für das Substrat DHCA (Bild A) und für den Cofaktor NADH (Bild B). Es wurde aufgereinigtes Protein eingesetzt, welches über einen C-terminalen 6xHis-Tag verfügt.

Tabelle 34: Kinetische Konstanten der 3 α -HSDH [R34N/L68A] für das Substrat DHCA und den Cofaktor NADH. X = keine Substratinhibierung.

Enzym	Substrat	Cosubstrat	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	K_I [mM]
R34N/L68A	DHCA	NADH	16,5 \pm 0,6	77,5 \pm 10,9	17,6 \pm 1,9
	NADH	DHCA	44,4 \pm 4,4	450,4 \pm 65,6	x
Wt	DHCA	NADH	13,9 \pm 0,8	134,3 \pm 25,6	9,8 \pm 1,4

Gegenüber der Einzelmutante L68A zeigt die Doppelmutante R34N/L68A eine um ca. 50 % geringere Aktivität und einen ähnlichen K_M -Wert. Im direkten Vergleich mit dem Wildtyp zeigt die Doppelmutante aber ebenfalls eine um 50 % höhere Aktivität und einen um den Faktor 2 besseren K_M -Wert.

Es konnten mehrere Mutanten der 3 α -HSDH erzeugt werden, die in Anwesenheit von DHCA eine um den Faktor 2 höhere Aktivität aufweisen. Weiterhin konnte eine Doppelmutante kreiert werden, deren K_M -Wert ebenfalls um den Faktor 2 verbessert wurde

5.3. 7 α -HSDH aus *E. coli*

Aus der Literatur ist bekannt, dass *E. coli* eine 7 α -HSDH besitzt (Tanaka et al., 1996). Dieses Gen wurde im Folgenden kloniert, biochemisch charakterisiert und mit den gewonnenen Ergebnissen zur neu identifizierten 7 α -HSDH aus *Clostridium difficile* (Kapitel 5.4.) verglichen. Die 7 α -HSDH aus *C. difficile* ist sehr gut geeignet für den Einsatz mit dem Cofaktor NADP⁺, ein wesentlicher Vorteil ist dabei, dass dieses Enzym in Verbindung mit NADP⁺ keine Substratinhibierung aufweist. Überraschenderweise zeigen aber Mutanten, deren Aktivität gegenüber NAD⁺ deutlich verbessert wurde, mit NAD⁺ eine ausgeprägte Substratinhibierung, so dass ein wesentlicher Vorteil der Cd7 α -HSDH entfällt. Andererseits ist die 7 α -HSDH aus *E. coli* hochspezifisch für NAD⁺; möglicherweise ist dieses Enzym daher für Biotransformationen in Verbindung mit dem Coenzym NAD⁺ besser geeignet.

5.3.1. Bestimmung von v_{max} und K_M

Um die enzymkinetischen Parameter der 7 α -HSDH aus *E. coli* (Ec7 α -HSDH) zu bestimmen, wurden die Gene der 7 α -HSDH mit verschiedenen His-Tag Varianten unter Verwendung des Plasmids pET28a_7 α -HSDH(-) (Variante ohne His-Tag), pET28a_7 α -HSDH(C) (Variante mit C-terminalen 6xHis-Tag) bzw. pET28a_7 α -HSDH(N) (Variante mit N-terminalem 6xHis-Tag) in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen wurde mittels Ni-NTA aufgereinigt und Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 10 μ M und 30 mM für CDCA bei konstant 0,5 mM NAD⁺ durchgeführt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an CDCA konstant bei 1 mM gehalten und die NAD⁺-Konzentration zwischen 10 μ M und 5 mM (N-terminale Variante) bzw. 10 mM (C-terminale Variante) untersucht. Für die Messungen der Variante ohne 6xHis-Tag wurde Rohextrakt (SDS-Gele siehe Anhang, Kapitel 17 Abbildung 106) eingesetzt. In Abbildung 45 sind die Verlaufsdiagramme und in Tabelle 35 die Werte für die 7 α -HSDH Varianten dargestellt.

Ergebnisse

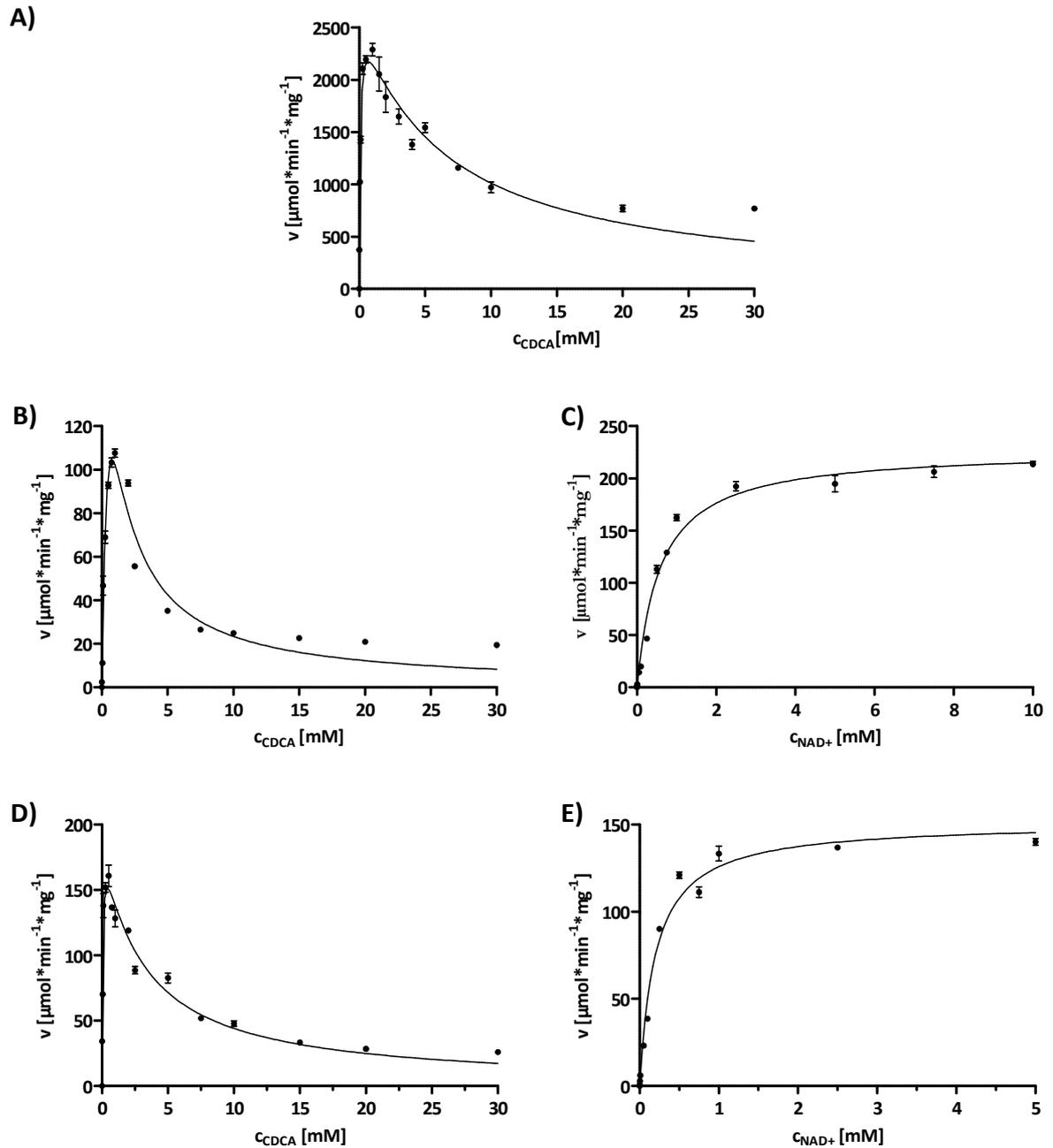


Abb. 45: Verlaufsdigramme der Michaelis-Menten-Kinetik der 7α -HSDH mit dem Substrat CDCA und NAD^+ . In Bild **A** ist das Verlaufsdigramm des Wildtyps ohne His-Tag (Rohextrakt) für CDCA dargestellt. In Bild **B** bis **E** wurde aufgereinigtes Protein eingesetzt. In Bild **B** und **C** befindet sich der His-Tag am C-Terminus und in Bild **D** bis **E** am N-Terminus.

Die Michaelis-Menten-Auftragungen zeigen, dass die starke Substratinhibierung für CDCA in allen drei Enzymvarianten ziemlich gleichartig vorhanden ist, das Enzym zeigt bei relativ niedrigen CDCA-Konzentrationen im Bereich von 1-2 mM maximale Aktivität, die dann aber schon durch geringfügige

Ergebnisse

Erhöhungen der Substratkonzentration stark inhibiert wird. Für NAD^+ als Substrat wurde weder für das N- noch das C-terminal getaggte Enzym eine Substratinhibierung beobachtet.

Tabelle 35: Kinetische Konstanten der 7α -HSDH aus *E. coli* für das Substrat CDCA (10 μM bis 30 mM) und den Cofaktor NAD^+ (konstant 0,5 mM). Die kinetischen Konstanten für das Enzym ohne His-Tag wurden mit Rohextrakt durchgeführt. Alle anderen Enzympräparate wurden über den vorhandenen His-Tag aufgereinigt. X = keine Substratinhibierung.

Substrat	Cosubstrat	v_{\max} [U mg^{-1}]	K_M [μM]	K_I [mM]	His-Tag
CDCA	NAD^+	$2644 \pm 101,4$	$73,1 \pm 10,1$	$6,2 \pm 0,7$	ohne
CDCA	NAD^+	$291,1 \pm 56,7$	$705,6 \pm 205,7$	$0,9 \pm 0,2$	C-Term
NAD^+	CDCA	$227,6 \pm 4,1$	$582,4 \pm 41,2$	x	C-Term
CDCA	NAD^+	$193,3 \pm 7,9$	$56,1 \pm 7,8$	$3,0 \pm 0,3$	N-Term
NAD^+	CDCA	$151,3 \pm 3,1$	$202,3 \pm 17,5$	x	N-Term

Beim Vergleich der kinetischen Daten der verschiedenen Enzymvarianten (Tabelle 35) fällt der große Aktivitätsunterschied zwischen den Präparaten mit und ohne His-Tag auf. Die Aktivität der 7α -HSDH mit dem His-Tag am C-Terminus im Vergleich zum Enzym ohne His-Tag beträgt ca. 11 % respektive 7 % zum His-Tag am N-Terminus. Anscheinend hat der His-Tag wie bei der 3α -HSDH einen großen mindernden Einfluss auf die Enzymaktivität. Dieser Unterschied wird sicher noch höher ausfallen, wenn man das native Enzym in gereinigter Form einsetzen würde. Der K_M -Wert für CDCA wird nur durch den C-terminalen His-Tag beeinflusst, hier verschlechtert sich die Affinität um ungefähr den Faktor 10. Für die Variante mit N-terminalem Tag liegt der K_M -Wert in der Größenordnung des nativen Enzyms.

Für die weiteren Versuche zur Änderung der Cofaktorspezifität wurde daher die Enzymvariante mit N-terminalem His-Tag verwendet.

Der Hexahistidinrest am C- oder N-Terminus der 7α -HSDH bewirkt, dass die maximale Geschwindigkeit deutlich vermindert wird. Der K_M -Wert der C-terminalen Variante wurde im Gegensatz zur N-terminalen Variante ebenfalls vermindert.

5.3.2. Änderung der Cofaktorspezifität der NAD⁺-abhängigen Ec7 α -HSDH

Die neu entdeckte NADP⁺-abhängige 7 α -HSDH aus *C. difficile* weist zwar keine Substratinhibierung auf und besitzt mit ca. 3,1 U mg⁻¹ eine relativ gute Aktivität, aber im Vergleich zur 7 α -HSDH aus *E. coli* mit ca. 47,8 U mg⁻¹ ist diese deutlich geringer. Wenn man in Betracht zieht, dass die Restaktivität des *E. coli*-Enzyms mit dem Cofaktor NADP⁺ vermutlich bei ca. 10 bis 20 % liegt, ist dieses Enzym bedeutend aktiver und somit kostengünstig. Für den Cofaktorswitch konnte auf eine bereits aufgelöste Kristallstruktur zurückgegriffen werden, die von Tanaka et al., publiziert wurde (PDB ID: 1AHH). Anhand dieser Struktur wird die Cofaktorbindung sehr gut erläutert, so dass ersichtlich wird, dass für die Cofaktorspezifität die Asparaginsäure an Position 42 verantwortlich ist (siehe Abbildung 46).

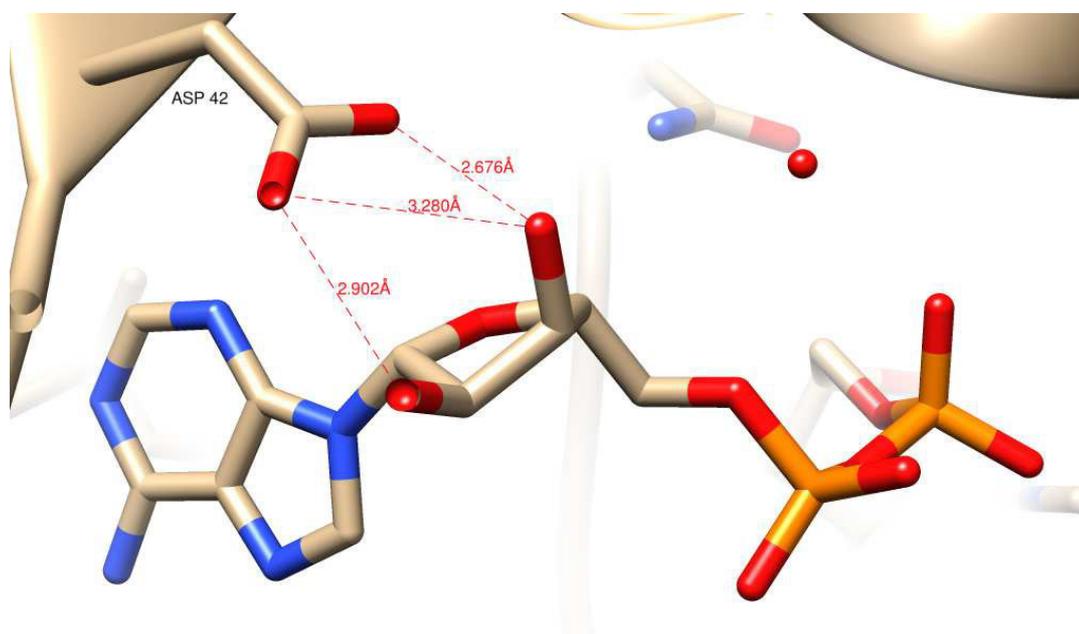


Abb. 46: Wechselwirkung der Asparaginsäure an Position 42 mit dem Adenosin-Ring, der für die Cofaktorspezifität verantwortlich ist.

Für den erfolgreichen Cofaktorswitch wurde anhand der Struktur die Position Asp42 identifiziert, hierfür wurden kleinere Aminosäuren wie Glycin oder Alanin eingebaut, die mehr Raum für das 2'-Phosphat des Adenosin-Ring ermöglichen. Weiterhin wurden basische Aminosäuren wie Arginin oder Lysin, wie sie üblicherweise in NADP⁺-abhängigen Dehydrogenasen vorkommen, downstream der Position 42 eingefügt, die dann mit dem 2'-Phosphat des Adenosin-Ring Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können.

Zur Aktivitätsbestimmung wurden die Gene des nativen Enzyms und der 7 α -HSDH Mutanten ([D42G], [I43R] und [D42G/I43R]) unter Verwendung der Plasmide pET28a_7 α -HSDH(N), pET28a_7 α -HSDH(N) [D42G], pET28a_7 α -HSDH(N) [I43R] und pET28a_7 α -HSDH(N) [D42G/I43R] jeweils in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Alle Varianten besitzen also einen N-terminalen 6xHis-Tag. Alle Aktivitätstests wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden nach

Ergebnisse

Expression mittels Ultraschall aufgeschlossen, Proteingehalt des Rohextraktes bestimmt und die Expression mittels SDS-PAGE überprüft. Über das SDS-Gel konnte weiterhin noch der Anteil an gebildetem Enzym an der Gesamtmenge abgeschätzt werden (siehe Anhang Kapitel 17).

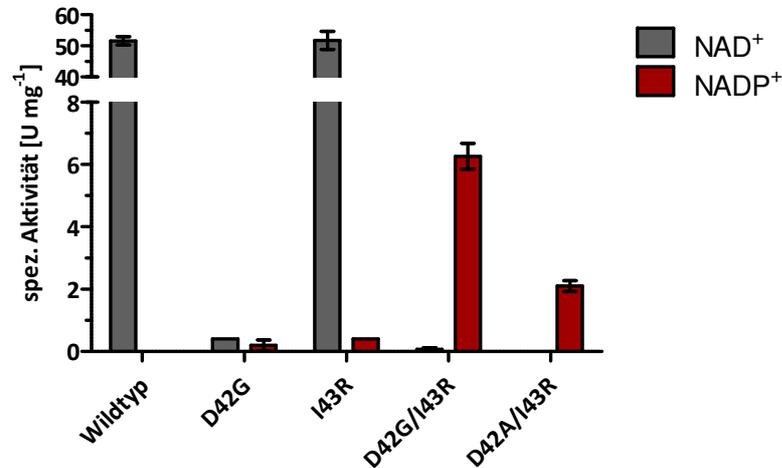


Abb. 47: Vergleich der Aktivitäten der NADP⁺-abhängigen Mutanten mit dem Wildtyp der 7 α -HSDH aus *E. coli*. Für die Messungen im Standard Aktivitätsassay wurde Rohextrakt eingesetzt.

Die Abbildung 47 zeigt, dass die Mutante D42G/I43R mit dem ursprünglichen Cofaktor NAD⁺ keine Aktivität mehr zeigt, während mit NADP⁺ ca. 12 % Aktivität, bezogen auf die Aktivität des nativen Enzyms mit NAD⁺, gemessen wurde. Die anderen Enzymvarianten sind weniger interessant: D42G ist mit beiden Coenzymen inaktiv, I43R verhält sich weitgehend wie das native Enzym und D42A/I43R entspricht tendenziell der Doppelmutante D42G/I43R, allerdings ist die Aktivität mit NADP⁺ deutlich geringer.

Die D42G/I43R-Mutante wurde im Folgenden biochemisch bezüglich der kinetischen Parameter (K_M und v_{max}) näher charakterisiert. Die Messungen wurden mit aufgereinigtem Protein (Variante mit N-terminalem 6xHis-Tag) durchgeführt. Alle Messungen wurden in einem Substratbereich zwischen 10 μ M und 30 mM bei konstant 0,5 mM NADP⁺ durchgeführt. Für die Bestimmung der Konstante für den Cofaktor wurde die Konzentration an CDCA konstant bei 1 mM gehalten und die NADP⁺-Konzentration zwischen 10 μ M und 2,5 mM variiert. In Abbildung 48 sind die Verlaufsdiagramme und in Tabelle 36 die Werte für die D42G/I43R-Mutante dargestellt.

Ergebnisse

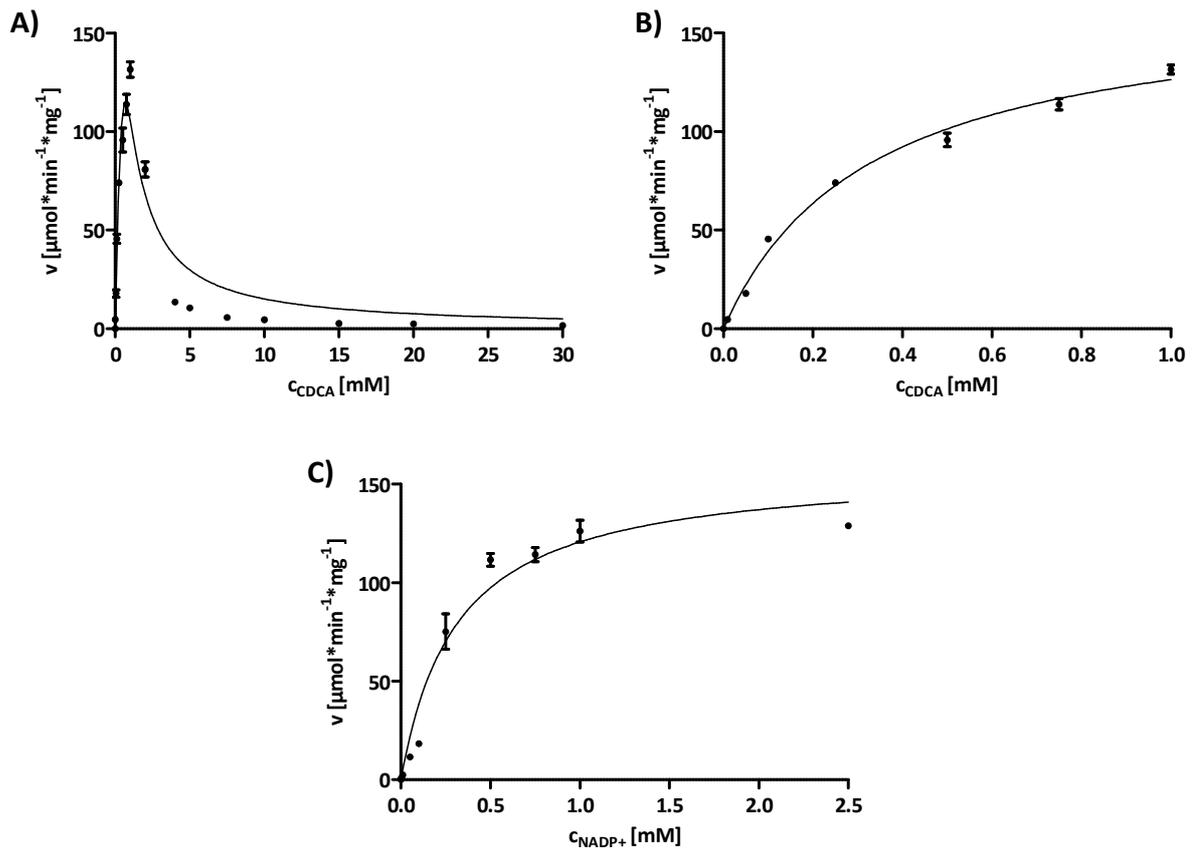


Abb. 48: Michaelis-Menten-Kinetik der D42G/I43R-Mutante mit dem Substrat CDCA (Bild A) und für den Cofaktor NADP⁺ (Bild C). Bild B stellt den Verlauf im Bereich niedriger CDCA-Konzentration dar, dieser Bereich wurde zur Bestimmung der apparenten Michaelis-Menten-Daten herangezogen.

Die Michaelis-Menten-Auftragungen zeigen, dass sich die Doppelmutante, mit NADP⁺ gemessen, wie das native Enzym bzw. die Varianten mit den beiden His-Tags verhält. Mit CDCA beobachtet man eine starke Substratinhibierung, durch die eine direkte Bestimmung des K_M -Werts nicht möglich ist, für NADP⁺ dagegen findet man im Bereich bis 2,5 mM keine Inhibierung.

Tabelle 36: Kinetische Konstanten der 7 α -HSDH [D42G/I43R] Mutante für das Substrat CDCA und für den Cofaktor NADP⁺. * = Aufgrund der ausgeprägten Substratüberschussinhibierung ausgehend von einer Konzentration von 1 mM CDCA, wurden die apparenten kinetischen Konstanten bestimmt.

Substrat	Cosubstrat	v_{max} [U mg^{-1}]	K_M [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$]
*CDCA	NADP ⁺	$167,8 \pm 6,3$	$327,8 \pm 32,2$	$74,8 \pm 2,8$	$228,3 \pm 12,6$
NADP ⁺	CDCA	$158,7 \pm 7,2$	$314,5 \pm 45,0$	$70,8 \pm 3,2$	$225,1 \pm 19,3$

Wie man in Abbildung 48 (Bild A) erkennen kann, zeigt die NADP⁺-abhängige Mutante eine sehr ausgeprägte Substratüberschussinhibierung. Durch die zwei neu eingeführten Aminosäuren, die zu einer Änderung der Cofaktorspezifität geführt haben, haben sich die Eigenschaften des Enzyms gegenüber Gallensäuren in hohen Konzentrationen nachteilig verändert, da die Substratinhibierung im

Ergebnisse

Vergleich zum NAD⁺-abhängigen Wildtyp-Enzym deutlich zugenommen hat. Damit sind zwei Aminosäurepositionen identifiziert worden, die für die Cofaktorspezifität verantwortlich sind.

Anhand der Aminosäuresequenz und einem Strukturvergleich konnten Aminosäurereste in der 7 α -HSDH aus *E. coli* identifiziert werden, die für die Cofaktorpräferenz verantwortlich sind. Es konnten mehrere Mutanten mittels positionsgerichteter Mutagenese erzeugt werden. Die D42G/I43R-Mutante zeigte mit dem Cofaktor NADP⁺ die höchste Aktivität. Das ursprüngliche akzeptierte NAD⁺ wird dagegen kaum noch angenommen. Es konnte somit eine weitere NADP⁺-abhängige 7 α -HSDH erzeugt werden, die für die Biotransformation von CDCA eingesetzt werden kann.

Im Vergleich zur natürlicherweise NADP⁺-abhängigen 7 α -HSDH aus *C. difficile* zeigt diese Mutante eine mehr als 10-fach höhere Aktivität mit NADP⁺.

5.4. 7 α -HSDH aus *Clostridium difficile*

5.4.1. Identifizierung einer NADP⁺-abhängigen 7 α -HSDH

Ziel der Klonierung einer NADP⁺-abhängigen 7 α -HSDH ist es, das Enzym für die einstufige Synthese von CDCA zu UDCA entsprechend der Abbildung 82 (Kapitel 9.2) zu nutzen. Der Vergleich der Aminosäuresequenz von bekannten 7 α -HSDHs wie der aus *Clostridium sordellii* (Coleman et al., 1994) mit Einträgen in den Datenbanken von EMBL und UniProt zeigte relativ hohe Sequenzhomologien zu putativen 7 α -HSDHs aus verschiedenen Stämmen wie z.B. aus anderen *Clostridien*. Da die vollständige Sequenz des Genoms von *Clostridium difficile* in den genannten Datenbanken zur Verfügung steht, wurde das Gen für die 7 α -HSDH (Cd7 α -HSDH) aus dem genannten Mikroorganismus als Ziel identifiziert (Tabelle 37).

Ergebnisse

Tabelle 37: Ergebnis der Suche nach einer putativen NADP⁺-abhängigen 7 α -HSDH in der UniProt Datenbank. Aufgeführt sind die ersten 25 Treffer basierend auf Sequenzvergleichen mit dem BLAST-Algorithmus.

Entry	Entry name	Status	Protein names	Organism	Length	Identity	Score	E-value	Gene names
P50200	HDHA_CLOSO	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium sordellii	267	100.0%	1,356	0.0	
T0CRU3	T0CRU3_CLOSO	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium sordellii VPI 9048	266	99.0%	1,327	0.0	H476_2317
T2RG81	T2RG81_CLOSO	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium sordellii ATCC 9714	213	99.0%	1,045	6.0×10 ⁻¹⁴¹	H477_3593
D4W5I5	D4W5I5_9FIRM	★	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/red...	Turicibacter sanguinis PC909	268	74.0%	1,046	3.0×10 ⁻¹⁴⁰	CUW_0217
F0HB99	F0HB99_9FIRM	★	Putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] red...	Turicibacter sp. HGF1	268	74.0%	1,036	9.0×10 ⁻¹³⁹	HMPREF9402_0667
B0ABX4	B0ABX4_9FIRM	★	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/red...	Clostridium bartlettii DSM 16795	267	71.0%	1,004	6.0×10 ⁻¹³⁴	CLOBAR_01874
R5X3G3	R5X3G3_9CLOT	★	Oxidoreductase short chain dehydrogenase/redu...	Clostridium bartlettii CAG-1329	267	72.0%	1,003	9.0×10 ⁻¹³⁴	BN488_01267
R6GP45	R6GP45_9CLOT	★	Oxidoreductase short chain dehydrogenase/redu...	Clostridium sp. CAG-221	266	69.0%	938	6.0×10 ⁻¹²⁴	BN542_00107
G5HJB9	G5HJB9_9CLOT	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium citroniae WAL-17108	262	66.0%	920	3.0×10 ⁻¹²¹	HMPREF9469_02670
T3DSB3	T3DSB3_CLODI	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium difficile CD160	262	57.0%	747	4.0×10 ⁻⁹⁵	QEW_0073
U3W7G9	U3W7G9_CLODI	★	Putative NADP-dependent deshydrogenase	Clostridium difficile CD002	262	57.0%	744	1.0×10 ⁻⁹⁴	BN168_70008
U3VTD9	U3VTD9_CLODI	★	Putative NADP-dependent deshydrogenase	Clostridium difficile E13	262	57.0%	744	1.0×10 ⁻⁹⁴	BN167_60008
T4V5A6	T4V5A6_CLODI	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium difficile P74	262	57.0%	744	1.0×10 ⁻⁹⁴	QW3_0083
T4UG92	T4UG92_CLODI	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium difficile P71	262	57.0%	744	1.0×10 ⁻⁹⁴	QUY_3828
T3KVH3	T3KVH3_CLODI	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium difficile DA00065	262	57.0%	744	1.0×10 ⁻⁹⁴	QIG_3822
T3JCQ7	T3JCQ7_CLODI	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium difficile 824	262	57.0%	744	1.0×10 ⁻⁹⁴	QGW_0082
T2YYG8	T2YYG8_CLODI	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium difficile CD44	262	57.0%	744	1.0×10 ⁻⁹⁴	QCL_0065
G6BH31	G6BH31_CLODI	★	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/red...	Clostridium difficile 050-P50-2011	262	57.0%	744	1.0×10 ⁻⁹⁴	HMPREF1123_01313
G6B9Y9	G6B9Y9_CLODI	★	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/red...	Clostridium difficile 002-P50-2011	262	57.0%	744	1.0×10 ⁻⁹⁴	HMPREF1122_02670
Q18CF0	Q18CF0_CLOD6	★	Putative NADP-dependent deshydrogenase	Clostridium difficile (strain 630)	262	57.0%	743	2.0×10 ⁻⁹⁴	CD630_00650
C9YHL8	C9YHL8_CLODR	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium difficile (strain R20291)	262	57.0%	743	2.0×10 ⁻⁹⁴	CDR20291_0059
C9XII2	C9XII2_CLODC	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium difficile (strain CD196)	262	57.0%	743	2.0×10 ⁻⁹⁴	CD196_0071
U4ZJK0	U4ZJK0_CLODI	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium difficile P68	262	57.0%	743	2.0×10 ⁻⁹⁴	QUQ_3772
U4ZH56	U4ZH56_CLODI	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium difficile F665	262	57.0%	743	2.0×10 ⁻⁹⁴	C678_3823
U4ZD04	U4ZD04_CLODI	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium difficile P53	262	57.0%	743	2.0×10 ⁻⁹⁴	QUG_0082
U4YV95	U4YV95_CLODI	★	NADP-dependent 7-alpha-hydroxysteroid dehydro...	Clostridium difficile DA00130	262	57.0%	743	2.0×10 ⁻⁹⁴	QIQ_0069

Die *C. difficile* 7 α -HSDH (Cd7 α -HSDH) weist eine Homologie von 57 % zum Gen aus *C. sordellii* und 30 % Homologie zur *E. coli* 7 α -HSDH auf. Weiterhin konnte aufgrund der Aminosäuresequenz erkannt werden, dass die Cd7 α -HSDH ein NADP(H)-abhängiges Enzym ist (Abbildung 49). Ca. 17 Aminosäuren downstream des Glycin-Motivs besitzt das Protein eine kurzkettige Aminosäure, das Alanin an Position 37, das benachbart die basische Aminosäure Arginin hat. Diese Kombination ist ein sicherer Hinweis darauf, dass das Protein NADP(H)-abhängig ist. Das Ziel war es, ein neues NADP(H)-abhängiges Enzym zu klonieren, das für die einstufige Biotransformation in Kombination mit der NADP⁺-abhängigen 7 β -HSDH eingesetzt werden kann. Die aufgeführten Einträge werden in der Datenbank aufgrund der Sequenz- und Strukturähnlichkeiten den Hydroxysteroid-Dehydrogenasen zugeordnet. Ein Alignment soll mehr Informationen darüber geben, ob es sich um eine HSDH handelt.

Ergebnisse

	(G)	AxxxGxG	
<i>Clodiff</i>	1	-----MEKLGKIAVVTAATKGI GLASAEILAKNGATVYLAARSEELAHEVINKISA	52
<i>Ecoli</i>	1	MFNSDNLRLDGKCAIITGAGAGIGKEIAITFATAGASVVVSDINADAANHVVDEIQQ	57
<i>Cloperf</i>	1	-----MKRLDEKIAIVTAASRGIGFACAHTLAMNGALVYIAGIEEEG---AIEKILE	49
<i>Bacfrag</i>	1	-----MNRFENKIIIIITGAAGGIGASTTRRIVSEGGKVVADYSREKADQFAAELSN	52
<i>Closord</i>	1	-----MNKLENKVALVTSATRGI GLASAIKLAQNGAIVYMGVRRLEATQEICDKYKE	52
<i>Clodiff</i>	53	EGGCAKFVYFNAREEETFTSMIEEVVKKEGKIDILVNNFGSTNPSLDKDLVTGDTDN	109
<i>Ecoli</i>	58	LGGQAFACRCDITSEQELSALADFAISKLGKVDILVNNAGGGGPKP----FDMPMAD	110
<i>Cloperf</i>	50	DGGQAKFIYFNAKERDSYFKMIDTVYENEGKIDILVNNYGATNVKLDNRNLVDGDTDA	106
<i>Bacfrag</i>	53	SGADVRPVYFSATELKSCKEKITFTMKEYGQIDVLVNNVGGTNPRRDTNIETLDMDY	109
<i>Closord</i>	53	EGLILKPVFFDAYNIDIKEMIDTIKNEGKIDILVNNFGTGRPEKDLDLVNGDEDT	109
<i>Clodiff</i>	110	FFDTVNTNLKSVYLPCKAAIPHMIKNGKGSIVNISSIGSVLPDLSRIAYCVSKAAIN	166
<i>Ecoli</i>	111	FRRAYELNVFSFFHLSQLVAPEMEKNGGGVILTITSMAAENKINIMTSYASSKAAAS	167
<i>Cloperf</i>	107	FFDILKSNIESVYLTSKRTVPYMIKNGGGSIIINISSVGSIVPDLSRMAYCVSKSAIN	163
<i>Bacfrag</i>	110	FDEAFHLNLSCMYLSQLVIPIMSTQGGGNIVNVASISGITADSNGTLYGASKAGVI	166
<i>Closord</i>	110	FFELFNYNVGSVYRLSKLIIIPHMIEKNGKGSIVNISSVGGSPIDISRIYGVSKSGVN	166
<i>Clodiff</i>	167	SLTQNIATQYAKDNVRCNAVL PGLIATKAALDNMSPEFIKEFLKHVPLNRI GEPDDI	223
<i>Ecoli</i>	168	HLVRNMAFDLGEKNIRVNGIAPGAILTDALKSVITPEIEQKMLQHTPIRRLGQPQDI	224
<i>Cloperf</i>	164	SLTQNIALQYAKQNI RCNAVL PGLIATKAALNNMSDEFRESFVKHVPLNRYGDPQDI	220
<i>Bacfrag</i>	167	NLTKYIATQTGKKNIRCNVAAPGLILTPAALNNLNNEEVRKIFLGQCATPYLGEPQDV	223
<i>Closord</i>	167	NITKQIAIQYAKYGI RCNAVL PGLIATDAAMNSMPDEFKRSFLSHVPLNRI GNPEDI	223
<i>Clodiff</i>	224	AKAVLFYA-SDDSSFITGDILLEVAGGFGLPTPQFADNILG----	262
<i>Ecoli</i>	225	ANAALFLC-SPAASWVSGQILTVSGGGVQELN-----	255
<i>Cloperf</i>	221	ANTVLYYA-SDESNYVTGMIHEVAGGFALGTPQYAEYMYLMGK-	262
<i>Bacfrag</i>	224	AATIAFLA-SEDARYITGQTI VVDGGLTIHNPTINLV-----	259
<i>Closord</i>	224	ANSVLFVPS-EDSSYITGSILEVSGGYNLGTPQYAEFVGSKVVE	267

Abb. 49: Alignment der 7 α -HSDH aus *C. difficile* (Clodiff), NADP⁺-abhängig, *E. coli* (*E. coli*), NAD⁺-abhängig, *C. perfringens* (Cloperf), NAD⁺-abhängig, *B. fragilis* (Bacfrag), NAD⁺-abhängig und *C. sordellii* (Closord), NADP⁺-abhängig. Unterlegte Bereiche zeigen homologe Aminosäuren an, das Glycin-Motiv ist mit GxxxGxG und die katalytische Triade ist mit Punkten markiert. Die Aminosäuren für die Cofaktorspezifität sind umrandet.

In Abbildung 49 ist zu erkennen, dass mehrere typische Merkmale einer HSDH gefunden wurden, insbesondere der Cofaktorbindebereich (Glycin-Motiv mit der Abfolge G(A)-X₍₃₎-G-X-G, wobei X für jede andere Aminosäure steht) sowie die katalytische Triade (**Ser**-X₍₁₂₎-**Tyr**-X-X-X-**Lys**). Die katalytische Aktivität des putativen Gens ist trotz der identifizierten Merkmale einer HSDH unbekannt und soll durch Klonierung und biochemische Methoden ermittelt werden.

Durch einen Vergleich mit anderen HSDHs konnte eine NADP⁺-abhängige 7 α -HSDH in *Clostridium difficile* identifiziert werden.

Ergebnisse

5.4.2. Klonierung, heterologe Expression und Enzymaktivität der Cd7 α -HSDH

Nach der Identifizierung und Isolierung wurde das Gen der 7 α -HSDH aus *C. difficile* in den pET28a(+) kloniert, in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH transformiert und heterolog exprimiert. Der Erfolg der Expression wurde mittels SDS-Page überprüft. Das klonierte Konstrukt mit N-terminalem His-Tag hat eine molekulare Masse von 30,1 kDa, das Enzym mit C-terminalem His-Tag eine von ca. 29,1 kDa. Die beiden Varianten haben unterschiedliche Molmassen aufgrund der verschiedenen Linker-Peptide zwischen Enzym und His-Tag. In Abbildung 50 ist zu erkennen, dass die Expressionsbanden aus beiden Konstrukten etwas niedriger laufen (bei ca. 26 kDa) als die kalkulierte molekulare Masse es vermuten ließe.

Der Hexa-Histidin-Tag ermöglicht eine Reinigung des Proteins mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie, die sich an die Präparation des zellfreien Rohextrakt anschließen kann. Zuvor wurden jedoch die Enzymaktivitäten der löslichen Proteinfractionen überprüft.

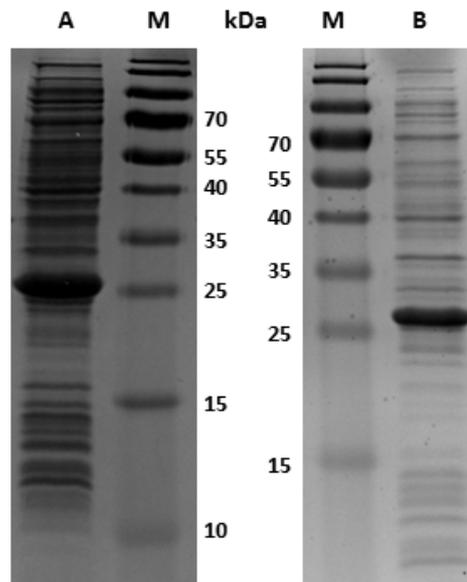


Abb. 50: SDS-Gel der Cd7 α -HSDH nach Expression in Schüttelkolben-Fermentation in LB-Medium. Als lösliche Fraktion ist der zellfreie Rohextrakt aufgetragen. Die Cd7 α -HSDH mit N-terminalem His-Tag (A) hat eine Größe von ca. 30,1 kDa und mit C-terminalem His-Tag (B) eine Größe von 29,1 kDa. Aufgetragen wurden ca. 10 μ g Protein. M = Marker (prestained Ladder von Thermo Scientific)

Die Klonierung des Gens aus *C. difficile* wurde einmal mit einem Hexahistidin-Tag am C- und einmal am N-Terminus durchgeführt. Zur Aktivitätsbestimmung wurde der Standardassay benutzt. Alle Aktivitätstests wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden nach Expression mittels Ultraschall aufgeschlossen, Proteingehalt des Rohextraktes bestimmt und die Expression mittels SDS-PAGE überprüft.

Ergebnisse

Tabelle 38: Aktivitäten der Cd7 α -HSDH jeweils mit 6xHis-Tag am N- bzw. C-Terminus. Für die Aktivitätsmessung wurde Rohextrakt eingesetzt.

His-Tag	Vol.-Aktivität [U ml ⁻¹]	spez.-Aktivität [U mg ⁻¹]
N-Term	37,2	3,2
C-Term	53,0	5,8

Nach dem Aufschluss wurde von beiden Varianten die Aktivität ermittelt (siehe Tabelle 38). Hier zeigte sich, dass die C-terminale Variante im Rohextrakt nahezu doppelt so aktiv ist, wie die Variante mit dem N-terminalen His-Tag. Allerdings konnte das Enzym mit dem C-terminalen-Tag nicht mittels Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigt werden kann. Das Protein wurde nicht an das Chromatographiematerial gebunden, man kann vermuten, dass der Hexahistidinrest im Inneren des Proteins lokalisiert ist.

5.4.3. Testumsetzung mit Cd7 α -HSDH

Weiterhin wurde eine Testumsetzung mit CDCA zur Überprüfung der Stereoselektivität der Cd7 α -HSDH durchgeführt. Zur Regenerierung von NADP⁺ wurde die NADP(H)-Oxidase aus *L. sanfranciscensis* eingesetzt. Nach 21 Stunden wurde eine HPLC-Probe genommen (Abbildung 51).

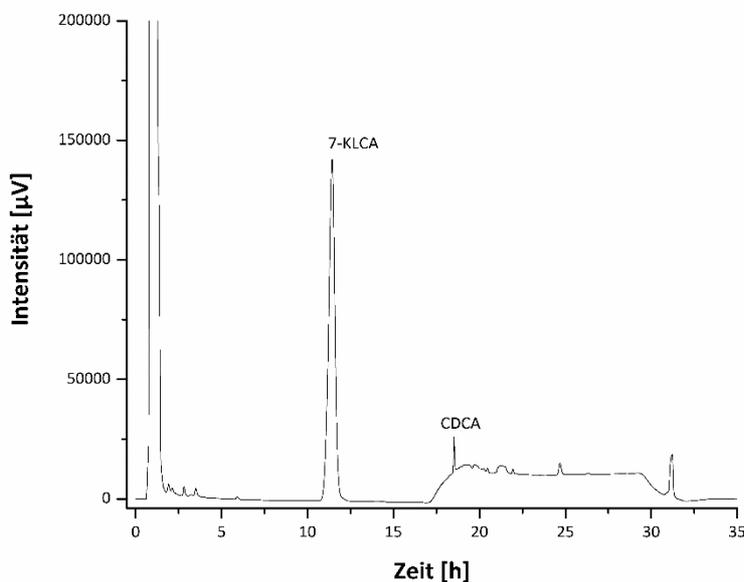


Abb. 51: HPLC-Chromatogramm der Testumsetzung von CDCA zu 7-KLCA mit der NADP⁺-abhängigen Cd7 α -HSDH. Es wurde eine Probe nach 16 Stunden mittels HPLC analysiert und es konnte ca. 99 % 7-KLCA nachgewiesen werden. Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus: 10 mM CDCA, 1 U ml⁻¹ Cd7 α -HSDH, 10 U ml⁻¹ NOX in 50 mM KPI pH 7,0.

Ergebnisse

Die Cd7 α -HSDH oxidiert die α -ständige OH-Gruppe an Position 7 von CDCA, dabei wird die Verbindung 7-Ketolithocholsäure (7-KLCA) gebildet. Das HPLC-Chromatogramm zeigt eine nahezu vollständige Umsetzung, nach 21 Stunden konnte nur noch ca. 1 % CDCA nachgewiesen werden.

5.4.4. Bestimmung der kinetischen Daten K_M und v_{max}

Um die enzymkinetischen Parameter der Cd7 α -HSDH zu bestimmen, wurde das Gen der Cd7 α -HSDH unter Verwendung des Plasmids pET28a_Cd7 α -HSDH(N) in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Diese Variante besitzt einen N-terminalen 6xHis-Tag. Der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen wurde mittels Ni-NTA aufgereinigt und in Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 10 μ M und 30 mM für CDCA als auch CA bei konstant 0,5 mM NADP⁺ durchgeführt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an CDCA konstant bei 1 mM gehalten und die NADP⁺-Konzentration zwischen 10 μ M und 15 mM untersucht. Für die Reduktion wurde 7-KLCA in einem Substratkonzentrationsbereich von 10 μ M bis 25 mM untersucht (bei konstant 0,2 mM NADPH). In Abbildung 52 sind die Verlaufsdiagramme und in Tabelle 39 die Werte für die Cd7 α -HSDH dargestellt.

Ergebnisse

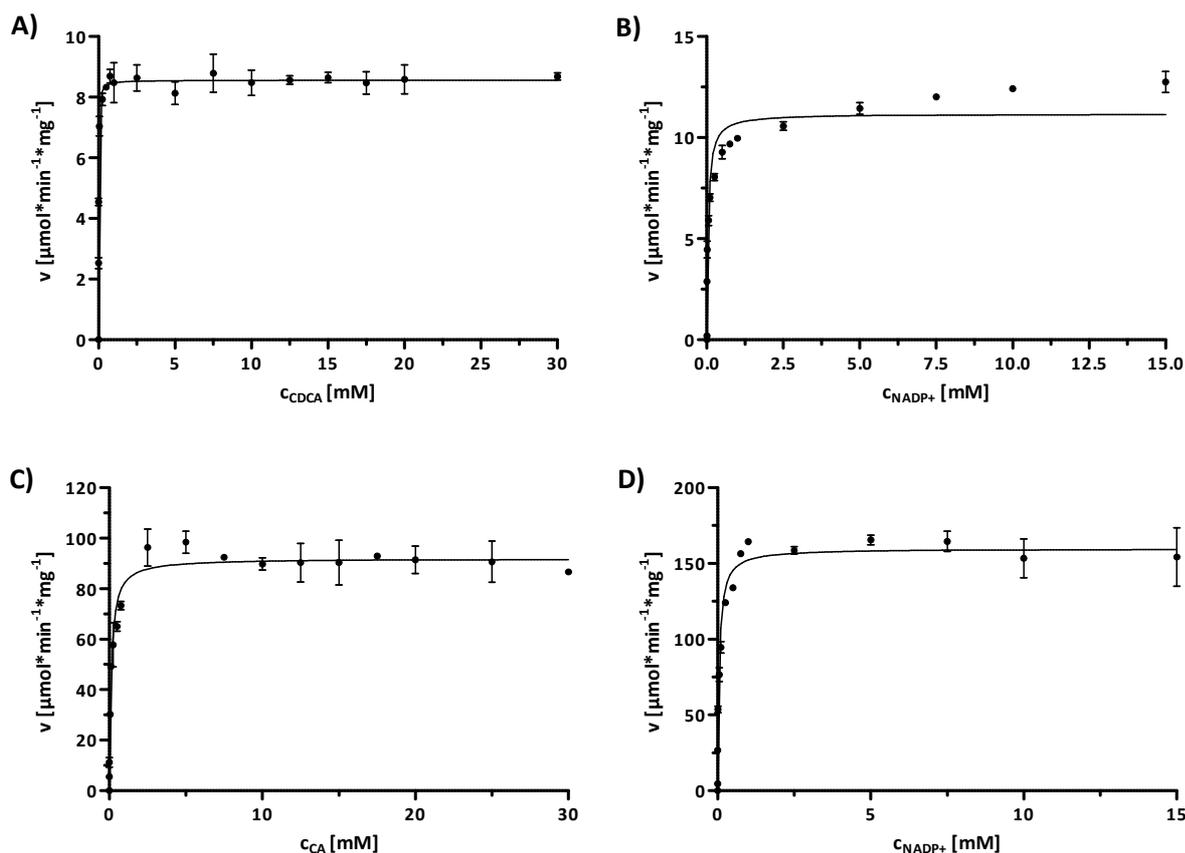


Abb. 52: Michaelis-Menten-Kinetik der Cd7 α -HSDH für das Substrat CDCA (Bild A) als auch für das Substrat CA (Bild C) mit dem jeweiligen Cofaktor NADP⁺ bei einer Konzentration von 5 mM CDCA bzw. CA (Bild B und D). Für die Messungen wurde aufgereinigtes Protein verwendet, das über einen N-terminalen His-Tag verfügt.

Tabelle 39: Kinetische Konstanten der Cd7 α -HSDH für verschiedene Gallensäuren, die an Position 7 oxidiert bzw. reduziert werden können. Die Cofaktorkonzentration für die Oxidation betrug 0,5 mM NADP⁺ und für die Reduktion 0,2 mM NADPH. Die kinetischen Daten wurden für diejenigen Verbindungen bestimmt, die in der Spalte „Substrat“ aufgeführt sind, die Konzentration des Cosubstrates wurde dabei konstant gehalten. Bei der Bestimmung der Daten für NADP⁺ wurde eine CDCA-Konzentration von 5 mM bzw. eine CA-Konzentration von 1 mM eingesetzt.

Substrat	Cosubstrat	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]
CDCA	NADP ⁺	8,5 ± 0,1	10,1 ± 1,0	4,3	422
NADP ⁺	CDCA	11,2 ± 0,4	42,9 ± 9,1	5,6	131
CA	NADP ⁺	91,9 ± 1,4	117,3 ± 13,4	46,1	391
NADP ⁺	CA	159,7 ± 3,2	49,5 ± 7,2	80,1	1618
7-KLCA	NADPH	1,1 ± 0,02	27,7 ± 6,4	33,2	1342

Aus Tabelle 39 kann man erkennen, dass die oxidativen Reaktionsschritte für CDCA und CA bevorzugt werden. Die maximale Geschwindigkeit für die Reduktion von 7-Ketolithocholsäure beträgt nur 1,1 U mg⁻¹. Für die Oxidation von CDCA bzw. CA ist die Aktivität 8-fach bzw. 83-fach höher. Weiterhin

Ergebnisse

erkennbar ist, dass das Enzym Trihydroxyverbindungen gegenüber Dihydroxyverbindungen bevorzugt. Die Aktivität mit CA ist um den Faktor 11 höher als mit CDCA als Substrat. Dies könnte vermutlich auch ein weiterer Grund sein, dass die Aktivität für die Reduktion der 7-KLCA so gering ist. Diese Verbindung besitzt nur eine Hydroxylgruppe an der Position 3 des A-Ring. Die hier beobachtete höhere Aktivität in der oxidativen Richtung ist für Nicotinamid-abhängige Dehydrogenasen sehr ungewöhnlich, üblicherweise verläuft die Reduktion der Ketoverbindung mit ca. 6-8-fach höherer Aktivität gegenüber der Oxidation.

Es konnte außerdem festgestellt werden, dass das Enzym mit dem Coenzym NADP⁺ keine Substratinhibierung aufweist. Alle anderen literaturbekannten 7 α -HSDHs weisen ansonsten eine solche Inhibierung auf, wie z.B. das Enzym aus *E. coli* (siehe Kapitel 5.3.) oder aus *C. absonum* (Ferrandi et al., 2011). Da das Enzym auch eine Nebenaktivität in der Größenordnung von 75 % mit NAD⁺ aufweist, wurden hier ebenfalls kinetische Konstanten aufgenommen. Hier zeigte sich, dass diese Nebenaktivität einer sehr starken Substratinhibierung unterliegt. Dies ist sehr ungewöhnlich, da eine Substratinhibierung bei Enzymen, die beide Cofaktoren annehmen können, bislang nur bei NADP⁺ bekannt ist, wie bei der 17 β -HSDH (Gangloff et al., 2001). Der apparente v_{\max} -Wert für die Cd7 α -HSDH mit NAD⁺ beträgt $6,4 \pm 0,3$ U mg⁻¹ und der K_M -Wert beträgt $124,9 \pm 0,8$ μ M für das Substrat CDCA (siehe im Vergleich Abbildung 52 und Tabelle 39 für die NADP⁺-Werte).

Die 7 α -HSDH aus dem Mikroorganismus *Clostridium difficile* kann sowohl NADP(H) als auch NAD(H) als Cofaktor annehmen. Das präferierte Coenzym ist NADP(H). Weiterhin weist das Enzym mit NADP(H) keine Substratüberschussinhibierung auf.

5.4.5. Änderung der Cofaktorspezifität

Wie in Kapitel 5.4.4. beschrieben, nimmt die Cd7 α -HSDH natürlicherweise beide Cofaktoren an. Eine Änderung zu NAD⁺, welches nicht nur kostengünstiger, sondern auch stabiler als NADP⁺ ist, wäre für Biotransformationen ein bedeutender Vorteil.

Analog zur Vorgehensweise bei der Änderung der Cofaktorspezifität der 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens* erfolgte ein Sequenz- und Strukturvergleich mit NAD⁺-abhängigen 7 α -HSDHs aus anderen Mikroorganismen sowie einer NAD⁺-abhängigen 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni* (siehe Abbildung 53).

Ergebnisse

	10	20	30	40	50	60	70
<i>Cdiff</i>	1	MEK L Q G K I A V V T A A T K G I	GL A S A E I L A K N G A T V Y L A R	S E E L A H E V I N K I S A E G G	C A K F V Y		
<i>Ecoli</i>	1	M F N S D N L R L D G K C A I I T G A G A G I	G K E I A I T F A T A G A S V V V S D I	N A D A A N H V V D E I Q Q L G G Q			
<i>Bfrag</i>	1	M N R F E N K I I I I T G A A G G I	G A S T T R R I V S E G G K V V I A D Y	S R E K A D Q F A A E L S N S G A D V R P V			
<i>Ctest(3alpha)</i>	1	M S I I V I S G C A T G I	G A A T R K V L E A A G H Q I V G I D I	R D	A E V I A D L S T A E G R K Q A I A D V L A K C S K		

Abb. 53: Partielles Alignment mit drei NAD⁺-abhängigen HSDHs im Vergleich mit der NAD⁺-abhängigen 7 α -HSDH aus *Clostridium difficile* im Bereich der Aminosäuren 1 bis 61. Konservierte Bereiche sind grau unterlegt, das Glycin-Motiv ist mit Sternen markiert und die Aminosäuren, die die Cofaktorspezifität bestimmen, sind umrandet. Das Alignment wurde mit Hilfe des clustalw2-Algorithmus erstellt. *Cdiff* = *C. difficile*; *Ecoli* = *E. coli*; *Bfrag* = *B. fragilis*; *Ctest* = *C. testosteroni*.

Das Alignment zeigt, dass der Austausch des Alanins an Position 36 (in Bild 51 Position 42 und 43) vermutlich die Cofaktorakzeptanz beeinflusst. Durch den Austausch des Alanins in eine größere und negativ geladene Aminosäure wird das 2'-Phosphat des Coenzym NAD⁺ sterisch daran gehindert, eine Wechselwirkung mit dem Enzym einzugehen. Um genaueres sagen zu können, wurde ein Strukturmodell (Swiss-model) des Enzyms erstellt, welches in Abbildung 54 zu sehen ist.

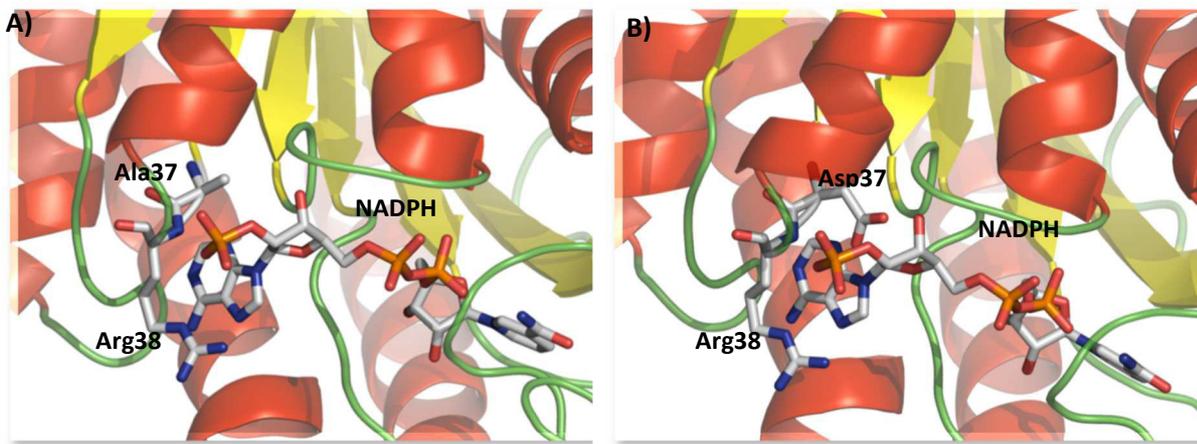


Abb. 54: Strukturvorhersage der Interaktion des Cofaktors NADPH mit der 7 α -HSDH aus *C. difficile*. Die 2'-Phosphatgruppe (Kreis) am Adenosin kann mit den Aminosäuren Ala37 und Arg38 (im Alignment Abb. 62 Positionen 42 und 43) interagieren (Bild A). In Bild B ist die Mutante A37D dargestellt. Hier steht die Seitenkette der Asparaginsäure so, dass das NADPH weiterhin gebunden werden kann.

Wichtige Faktoren für die Cofaktor-Spezifität von Dehydrogenasen sind Aminosäuren, die die Cofaktor-Bindung durch ionische Wechselwirkungen oder durch sterische Gründe beeinflussen. So sollte die negativ geladene Aminosäure Asparaginsäure an Position 37 die Phosphatgruppe nicht nur sterisch stören, sondern auch aufgrund der Ladung abstoßen. Offensichtlich wird in dem Fall der Mutante A37D die Bindung des Cofaktors weniger durch sterische Wechselwirkung als durch die Ladung beeinflusst. Die erstellte Mutante A37D zeigt gegenüber NAD⁺ eine 7-fach höhere Aktivität (siehe Abbildung 55) als der Wildtyp, allerdings zeigt die Mutante weiterhin auch die ausgeprägte Substratüberschussinhibierung.

Aus dem Strukturmodell konnte weiterhin auch erkannt werden, dass das Lysin an der Position 16, welches im konservierten Glycin-haltigen Bereich lokalisiert ist, eine wichtige Rolle in der

Ergebnisse

Wechselwirkung mit dem Cofaktor eingehen kann. Daher wurde diese Position einer Mutagenese unterzogen und der Einfluss mittels Aktivitätsassay untersucht.

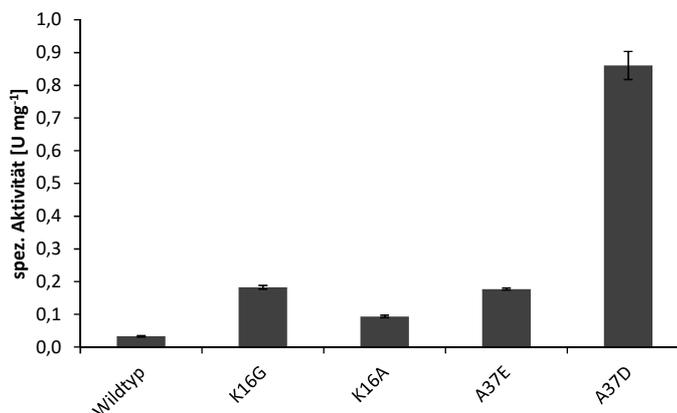


Abb. 55: Vergleich der NAD⁺-abhängigen Mutanten mit dem Wildtyp der 7 α -HSDH aus *C. difficile*. Dargestellt ist die Akzeptanz für den Cofaktor NAD⁺. Für die Messungen mit 10 mM CDCA und 0,5 mM NAD⁺ wurde Rohextrakt eingesetzt (Standard-Aktivitätstest).

Aus der Abbildung 55 geht hervor, dass durch den Austausch des Alanins an Position 37 zu einer Asparaginsäure die Aktivität mit NAD⁺ als Cofaktor um das 22,5-fache gesteigert werden konnte. Die Aktivität der Mutante mit NADP⁺ als Coenzym führte dagegen im Vergleich zum Wildtyp zu einer Senkung auf ca. 13 % (Daten nicht gezeigt). Die Austausche von Lysin-16 gegen Glycin, Alanin oder Glutamat ergeben allerdings nur geringfügige Steigerungen der spezifischen Aktivitäten.

Der Austausch eines Alanins an Position 37 zur Asparaginsäure führte dazu, dass das Enzym weiterhin beide Coenzyme annehmen kann, jedoch wird NAD⁺ bevorzugt angenommen. Die Aktivität konnte um das 22,5-fache mit dem Cofaktor NAD⁺ gesteigert werden.

5.4.5.1. Bestimmung von K_M und v_{max} der NAD⁺-abhängigen Mutante

Um die enzymkinetischen Parameter der Cd7 α -HSDH(N) [A37D] zu bestimmen, wurde das Gen der Cd7 α HSDH(N) [A37D] unter Verwendung des Plasmids pET28a_(N) [A37D] in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Diese Variante besitzt einen N-terminalen 6xHis-Tag. Der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen wurde mittels Ni-NTA aufgereinigt und in Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 10 μ M und 10 mM für CDCA bei konstant 0,5 mM NAD⁺ eingesetzt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an CDCA konstant bei 0,1 mM gehalten und die NAD⁺-Konzentration zwischen 10 μ M und 7,5 mM untersucht. In Abbildung 56 sind die Verlaufsdigramme und in Tabelle 40 die Werte für die Cd7 α -HSDH Mutante dargestellt.

Ergebnisse

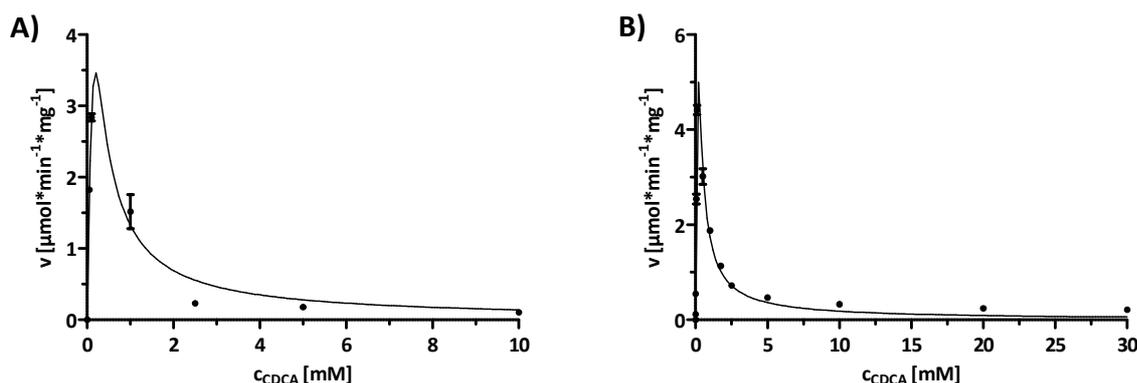


Abb. 56: Verlaufsdiagramme der Michaelis-Menten-Kinetiken für den Wildtyp (Bild **A**) und die Mutante A37D (Bild **B**) für CDCA in einem Konzentrationsbereich von 01 μM und 30 mM bei konstant 0,5 mM NAD^+ . Die Messungen wurden mit aufgereinigtem Protein durchgeführt.

Tabelle 40: Kinetische Konstanten für den Wildtyp und die NAD^+ -abhängige Mutante mit dem Substrat CDCA (Konzentrationsbereich zwischen 10 μM und 30 mM), die mit NAD^+ (konstant 0,5 mM) als Cosubstrat aufgenommen wurden. * = Aufgrund der ausgeprägten Substratüberschussinhibierung ausgehend von einer Konzentration von 0,1 mM CDCA, wurden die apparenten kinetischen Konstanten bestimmt.

Variante	v_{\max} [U mg^{-1}]	K_M [μM]	K_I [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$]
*Wildtyp	$6,4 \pm 0,3$	$124,9 \pm 8,3$	$27,0 \pm 69,2$	$3,2 \pm 0,1$	$25,7 \pm 9,7$
*A37D	$19,5 \pm 3,7$	$341,2 \pm 80,3$	$4,9 \pm 24,7$	$9,8 \pm 1,8$	$28,8 \pm 1,1$

Aus der Tabelle 40 geht hervor, dass die Cofaktoränderung von NADP^+ zu NAD^+ erfolgreich war. Wie beim Cofaktorswitch der $7\beta\text{-HSDH}$ konnten drei Positionen, K16, A37 und R38 aus dem Alignment identifiziert werden, die für die Cofaktorspezifität verantwortlich sind. Dabei erwies sich die Position 37 am effektivsten, während Kombinationen mit weiteren Aminosäuren-Positionen nur einen geringen Einfluss auf die Akzeptanz von NAD^+ hatten. Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die Mutante A37D eine 3-fach höhere maximale Geschwindigkeit. Die NAD^+ -abhängige Aktivität konnte auf ca. 20 U mg^{-1} (apparenter Wert) gesteigert werden. Im direkten Vergleich mit der Aktivität gegenüber NADP^+ als Cofaktor, wo der v_{\max} 8,5 U mg^{-1} beträgt, konnte hier die Aktivität um das 2,3-fache gesteigert.

Auffällig ist auch, dass die Substratüberschussinhibierung bei der Mutante einen ähnlich ausgeprägten Charakter aufweist. Die Mutation hat somit in dieser Hinsicht keinen Einfluss auf die Enzymeigenschaften.

Anhand der Aminosäuresequenz und der Tertiärstruktur konnten in der $7\alpha\text{-HSDH}$ aus *C. difficile* diejenigen Aminosäurereste identifiziert werden, die für die Cofaktorpräferenz verantwortlich sind. Es konnten mehrere Mutanten mittels positionsgerichteter Mutagenese erzeugt werden. Die A37D-Mutante zeigte wie der Wildtyp für beide Cofaktoren Aktivität, wobei hier nun NAD^+ das präferierte Coenzym ist.

5.4.6. Steigerung der Aktivität

An Position 16 der Cd7 α -HSDH befindet sich, innerhalb des Glycin-Motivs, die Aminosäure Lysin, die eine wichtige Rolle in der Cofaktorbindung einnimmt (Jörnvall et al., 1987; Sun and Plapp, 1992). Anhand des Strukturmodells, das mit Hilfe von SWISS-Model (Arnold et al., 2006; Biasini et al., 2014; Guex et al., 2009; Kiefer et al., 2009) erstellt wurde, kann gezeigt werden, dass sich das Lysin in räumlicher Nähe zum Cofaktor befindet. Eine analoge Position konnte auch bei der 7 β -HSDH ermittelt werden (siehe Kapitel 5.1.2.1.), die durch einen Austausch der vorhandenen Aminosäure eine Steigerung der Aktivität zur Folge hatte. Wie bei der 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* wurde die Aminosäure mutagenisiert, um eine Aktivitätssteigerung zu erzielen. An Stelle der relativ großen basischen Aminosäuren Lysin wurden die kleineren neutralen Aminosäuren Glycin oder Alanin eingebaut, um eine mögliche sterische Hinderung des 2'-Phosphat des Coenzym zu verhindern.

Zur Aktivitätsbestimmung wurden die Gene der CD7 α -HSDH Mutanten ([K16G] und [K16A]) sowie der Wildtyp unter Verwendung der Plasmide pET28a_Cd7 α -HSDH(N), pET28a_Cd7 α -HSDH(N) [K16G] und pET28a_Cd7 α -HSDH(N) [K16A] jeweils in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Diese Varianten besitzen einen N-terminalen 6xHis-Tag. Alle Aktivitätstests wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden nach Expression mittels Ultraschall aufgeschlossen, Proteingehalt des Rohextraktes bestimmt und die Expression mittels SDS-PAGE überprüft. Über das SDS-Gel konnte weiterhin noch der Anteil an gebildetem Enzym an der Gesamtmenge des intrazellulären löslichen Proteins abgeschätzt werden.

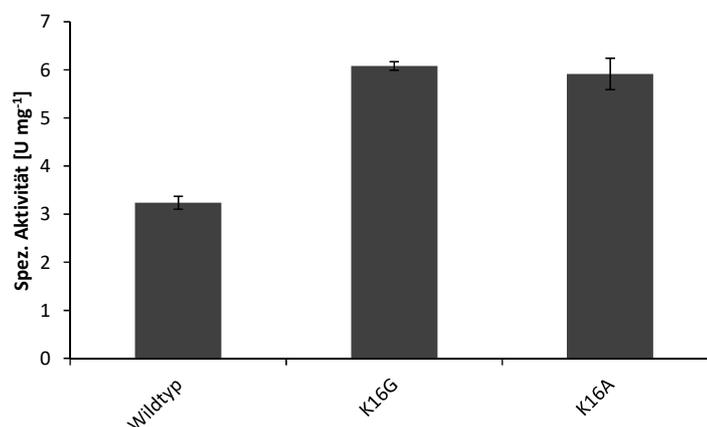


Abb. 57: Vergleich der Mutanten an Position K16 mit dem Wildtyp der 7 α -HSDH aus *C. difficile*. Dargestellt ist die Akzeptanz für den Cofaktor NADP⁺. Für die Messungen mit 10 mM CDCA und 0,5 mM NADP⁺ wurde Rohextrakt eingesetzt.

Aus Abbildung 57 geht hervor, dass die Einführung einer kleinen Aminosäure wie Glycin oder Alanin gegen das sperrige Lysin an Position 16 eine Steigerung der Aktivität um ca. 90 % zur Folge hat. Die Lage der kleineren Aminosäure ermöglicht vermutlich, dass das Enzym flexibler und dadurch die Einbringung des Cofaktors NADP(H) besser ermöglicht wird. Weiterhin wurde durch den Austausch die

Ergebnisse

negative Ladung des Lysins entfernt, so dass keine ionische Wechselwirkung mehr mit der 2'-Phosphatgruppe stattfinden kann.

Analog zur Aktivitätssteigerung der anderen HSDHs konnte die Aktivität der 7 α -HSDH aus *C. difficile* mittels positionsgerichteter Mutagenese um nahezu 100 % gesteigert werden.

6. Entwicklung der Cofaktorregenerierung

Nach der Charakterisierung der einzelnen HSDHs wurde die Biotransformation zu Ursodesoxycholsäure bzw. zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure durchgeführt. Für die enzymatischen Synthesen wurde weiterhin eine Cofaktorregenerierung benötigt, da es sich bei diesen Schritten um ausschließlich ADH-katalysierte Redoxreaktion handelt. Dabei kann für die Reduktion auf etablierte Regenerierungssysteme zurückgegriffen werden, wie z.B. die Glucose- oder auch Alkohol-Dehydrogenasen. Um solche Prozesse ökonomisch durchzuführen, müssen die Cofaktoren wegen ihres hohen Preises in einer weiteren Redoxreaktion regeneriert werden. In der Literatur sind eine Reihe von Möglichkeiten der enzymatischen Coenzym-Regenerierung beschrieben (Weckbecker et al., 2010).

Für die enzym-katalysierte Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA bzw. 3,7-Diketo-UDCA zu UDCA muss man allerdings berücksichtigen, dass die 3 α -HSDH NAD⁺-abhängig ist, während es sich bei der 7 β -HSDH um ein NADP⁺-abhängiges Enzym handelt. Das bedeutet, dass man entweder zwei Regenerierungsenzyme mit verschiedener Coenzym-Spezifität einsetzt oder ein Enzym, das beide Coenzyme akzeptiert. Zwei Enzyme würde in aller Regel auch die Verwendung von zwei verschiedenen Regenerierungssubstraten beinhalten, was die Produktaufarbeitung prinzipiell aufwändiger gestalten würde. Günstiger wäre es daher, ein Enzym mit dualer Coenzym-Spezifität einsetzen zu können. Die meisten Dehydrogenasen zeigen allerdings eine hohe Präferenz für nur ein Coenzym. Unter den bekannten natürlicherweise vorkommenden Dehydrogenasen weist lediglich die Glucose-Dehydrogenase (GDH) eine duale Coenzym-Spezifität auf, daneben beobachtet man eine solche Unspezifität lediglich noch bei durch Mutagenese hergestellten Varianten. Die GDH hat zudem den Vorteil, dass die Reaktion irreversibel ist, da Glucose zu Gluconolacton oxidiert wird (Abbildung 58). Durch nachfolgende chemische Ringöffnung des Lactons wird die Regenerierungsreaktion irreversibel. Ein weiterer Vorteil der GDH besteht darin, dass dieses Enzym sowohl NAD⁺ als auch NADP⁺ mit hoher

Ergebnisse

Aktivität reduziert. Die Anwendung von GDHs für die Regenerierung von NAD(P)H wurde schon in vielen Beispielen dokumentiert (Eguchi et al., 1992; Hanson et al., 1999; Kataoka et al., 1997).

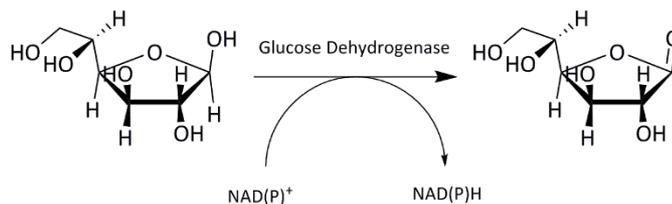


Abb. 58: Schematische Darstellung der enzymatischen Umsetzung von Glucose zu Glucono-1,5-lactone. Das Gluconolacton wird durch die anschließende Ringöffnung zur Gluconsäure gebildet und steht somit einer Rückreaktion nicht mehr zur Verfügung, was die Reaktion irreversibel macht.

Das Gen der hier verwendeten Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* wurde derart modifiziert, dass die Halbwertszeit deutlich gesteigert wurde (bei 25 °C von ca. 20 min auf 3,5 Tage bei einer Temperatur von 65 °C) (Vázquez-Figueroa et al., 2007). Weiterhin wurde die GDH in die Vektoren pETDuet1 und pACYCDuet1 so kloniert, dass das Gen entweder allein oder in die Multi-cloning-site 1 für eine Coexpression mit den HSHDs eingesetzt werden konnte. Die erstellten Konstrukte besitzen keinen His-Tag.

Für die Biotransformation von DHCA zu 12-Keto-UDCA werden ausschließlich reduktive Schritte benötigt. Daher wird hier eine Regenerierung der reduzierten Form des Cofaktors (NAD(P)H) benötigt, die mittels der GDH gewährleistet ist. Der Vorteil dieses Enzyms ist, dass es sowohl NADH als auch NADPH regenerieren kann. Für die Biotransformation von CDCA zu UDCA wird für den ersten Schritt der Epimerisierung der C₇ Position ein oxidativer Schritt benötigt. Hier muss der oxidierte Cofaktor regeneriert werden. Für die Oxidation sind allerdings nur einige wenige enzymatische Methoden der Regenerierung bekannt (Weckbecker et al., 2010). Für die Synthese von 12-Ketochenodesoxycholsäure ausgehend von CA wurde eine Glutamat-Dehydrogenase (GluDH) gewählt (Carrea et al., 1983; Weckbecker et al., 2010). Eine wesentlich ökonomischere Methode zur Wiederherstellung des oxidierten Cofaktors ist die Verwendung einer NAD(P)H-Oxidase (NOX). Eine oxidative Biotransformation mit Gallensäuren in Kombination mit einer NOX wurde bisher noch nicht publiziert. NADH-Oxidasen katalysieren die irreversible Oxidation von NAD(P)H zu NAD(P)⁺ bei gleichzeitiger Reduktion des molekularen Sauerstoffs (Geueke et al., 2003; Nowak et al., 2015; Park et al., 2011). Die Reduktion des Luftsauerstoffs kann hier durch eine Zwei-Elektronenreduktion zu Wasserstoffperoxid oder in einer Vier-Elektronenreduktion zu Wasser führen. Wenn es sich um NAD⁺ handelt, kann hierfür die NADH-Oxidase (NOX) aus *Lactobacillus brevis* eingesetzt werden, die nur NADH akzeptiert. Für die Regenerierung von NADP⁺ kann zum einen die NOX aus *L. sanfranciscensis* eingesetzt werden, da das Protein als Wildtyp beide Cofaktoren akzeptiert oder die G178K/L179K-Mutante aus *L. plantarum*, die die phosphorylierte Form der Adenosinnukleotide präferiert (Park et al., 2011). In Abbildung 59 ist das Reaktionsschema der wasserbildenden NOX dargestellt.

Ergebnisse

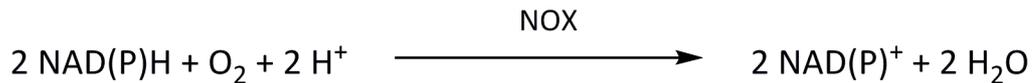


Abb. 59: Reaktionsschema der irreversiblen Oxidation von NAD(P)H zu NAD(P)⁺ der wasserbildenden NAD(P)H-Oxidase.

Für den zweiten Schritt der Epimerisierung wird die Ketogruppe zur β -ständigen Hydroxylgruppe reduziert. Für die Regenerierung des reduzierten Cofaktors im selben Topf bietet sich für die Regenerierung eine Alkohol-Dehydrogenase aus *L. kefir* (LkADH) oder eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) an, da beide Proteine keine duale Spezifität aufweisen. Die Verwendung einer Dehydrogenase mit dualer Spezifität wie z.B. eine Glucose-Dehydrogenase würde in diesen Prozessen zu Kreuzreaktionen führen.

7. Biotransformation von DHCA zu 12-Keto-UDCA

Für die Biotransformation von DHCA zu 12-Keto-UDCA wird DHCA durch eine chemische Oxidation von CA bereitgestellt, so dass enzymatisch die jeweilige Ketogruppe, also die C₃- und C₇-Ketogruppe, stereoselektiv in die entsprechende Hydroxylgruppe umgesetzt werden kann. Hierfür werden HSDHs benötigt, die an der entsprechenden Position des Sterangerüst die Ketogruppe erkennen. Die 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* und die 3 α -HSDH aus *C. testosteroni* sind die Proteine, die im Folgenden für die Biotransformationen eingesetzt werden.

7.1. Expression der 7 β -HSDH, 3 α -HSDH und Glucose-Dehydrogenase

Für die Expression der rekombinanten Dehydrogenasen wurde das T7-Expressionssystem ausgewählt, das den T7-Promotor besitzt und deutlich aktiver ist als ein lac-Promotor basiertes Expressionssystem. Nach der Transformation der Vektorkonstrukte in die Expressionzellen wurde die Expression mittels SDS-PAGE überprüft. Abbildung 60 zeigt, dass in allen Fällen kaum Anteile an unlöslichem Enzym (*inclusion bodies*) nachweisbar sind, lediglich bei der 7 β -HSDH ist eine schwache Bande in der unlöslichen Fraktion zu erkennen. Bei weiteren Analysen mittels SDS-PAGE konnte hier keine Bande nachgewiesen werden, wahrscheinlich handelt es sich um Verschleppung von Probenmaterial.

Ergebnisse

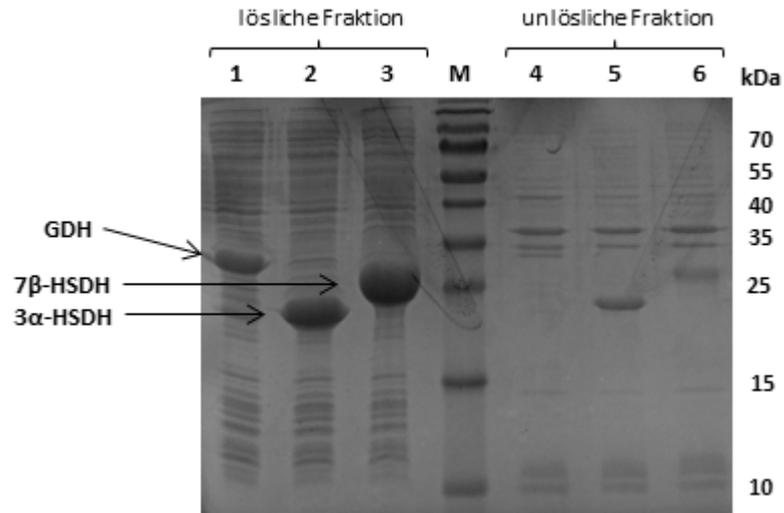


Abb. 60: SDS-PAGE der Expression von 3 α -, 7 β -HSDH und GDH, jeweils differenziert in den löslichen (1-3) und unlöslichen Anteil (4-6). Als lösliche Fraktion ist der zellfreie Rohextrakt aufgetragen. Die 3 α -HSDH hat eine Größe von 26,4 kDa, die 7 β -HSDH von 28,7 und die Glucose-DH von ca. 28 kDa. Aufgetragen wurden 15 μ g. 1 (4) = Glucose-Dehydrogenase; 2 (5) = 3 α -HSDH; 3 (6) = 7 β -HSDH; M = Marker (prestained Ladder)

Üblicherweise lagen die Aktivitäten (Rohextrakten) der 3 α -HSDH bei 35 U ml⁻¹ (1,8 U mg⁻¹), für die 7 β -HSDH 110 U ml⁻¹ (9,5 U mg⁻¹) und für die GDH 300 U ml⁻¹ (17,2 U mg⁻¹). Auffällig hierbei ist die geringe Aktivität der 3 α -HSDH im Vergleich zur 7 β -HSDH. Die Aktivität der 3 α -HSDH ist dennoch hoch genug, um damit Umsetzungen und weitere biochemische Analysen durchzuführen.

Sowohl die Hydroxysteroid- als auch die Glucose-Dehydrogenase lassen sich unter den Standard-Bedingungen (25 °C; 0,5 mM IPTG; 20 Stunden) sehr gut exprimieren. Der Anteil des Zielproteins beträgt bis zu 80 % des gesamten intrazellulären löslichen Proteins.

7.2. Synthese von 12-Keto-UDCA mit isolierten Enzymen

Für die Synthese von 12-Keto-UDCA wurden sowohl Ansätze mit Wildtyp-Enzymen verwendet (NAD⁺-abhängige 3 α -HSDH und NADP⁺-abhängige 7 β -HSDH) als auch Ansätze mit der NAD⁺-abhängigen Mutante der 7 β -HSDH. Die Biotransformationen mit isolierten Enzymen (Rohextrakt) wurden mit Konzentrationen von DHCA zwischen 10 und 100 mM DHCA durchgeführt. Die GDH wurde im Verhältnis zu den HSDHs im doppelten oder 4-fachen Überschuss hinzugegeben. Alle Ansätze enthielten die 2,5-fache Menge Glucose in Bezug auf die Menge an eingesetzter Gallensäure. Die Durchführung der Umsetzungen erfolgte unter Rühren in KPi-Puffer bei 25 °C.

Ergebnisse

7.2.1. Synthese mit Wildtypenzymen

Für die Synthese von 12-Keto-UDCA wurden die Wildtyp-Enzyme exprimiert und aufgeschossen. Nach dem Standard Aktivitätsassay wurde in der Umsetzung die gleiche Volumen-Aktivität der beiden HSDHs eingesetzt. Der Ansatz (10 ml) enthielt 0,4 g (100 mM) DHCA, 0,5 g (250 mM) Glucose, 0,2 mM NADP⁺, 0,2 mM NAD⁺, 5 U ml⁻¹ GDH, 1,5 U ml⁻¹ 3 α -HSDH und 7 β -HSDH in 500 mM KPi pH 8,0. Die Umsetzung lief bei 25 °C für 22 Stunden. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben genommen und mittels HPLC untersucht.

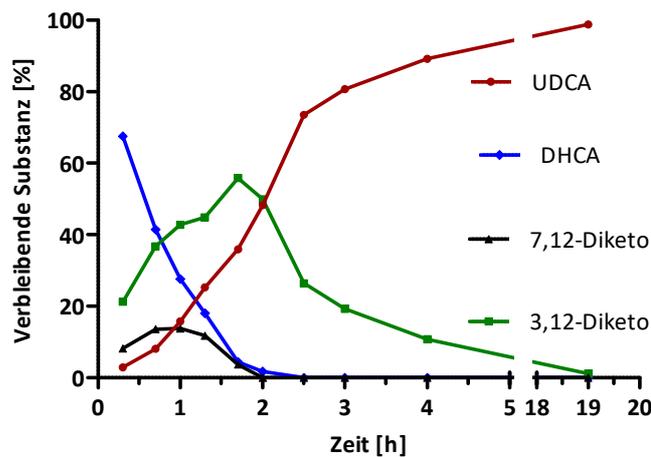


Abb. 61: Umsetzung von 100 mM DHCA mit 3 α - und 7 β -HSDH. Für die Cofaktorregenerierung wurde die GDH eingesetzt.

Aus der Abbildung 61 kann man erkennen, dass die Biotransformation von DHCA zu 12-Keto-UDCA zu einem Umsatz von 99,8 % führte. Dieser wurde, wie die Grafik andeutet, vermutlich bereits nach ca. 10 Stunden erreicht, welches für die geringe Enzymmenge eine sehr gute Umsetzung darstellt. Auffällig ist, dass im Verlauf der Umsetzung mehr von dem Intermediat 3,12-Diketo-UDCA akkumuliert als von der Zwischenverbindung 7,12-Diketo-UDCA. 3,12-Diketo akkumuliert, bis kein DHCA mehr vorhanden ist und wird langsam, aber stetig umgesetzt. Da die K_M -Werte von 3 α -HSDH (134,3 μ M) und 7 β -HSDH (79,8 μ M) für das Substrat DHCA in etwa in der gleichen Größenordnung liegen, also DHCA von beiden Enzymen gleich gut umgesetzt wird, hängt die unterschiedliche Akkumulation von Zwischenprodukten von den kinetischen Daten der beiden Enzyme für diese Zwischenprodukte ab. Diese unterscheiden sich tatsächlich deutlich, 7 β -HSDH zeigt für das Produkt 7,12-Diketo-UDCA einen K_M -Wert von 0,07 mM, während der für die 3 α -HSDH für 3,12-Diketo-UDCA bei 2,2 mM liegt. Diese deutlich schlechtere Affinität führt offensichtlich intermediär zur Anhäufung von 3,12-Diketo-UDCA.

7.2.2. Synthese mit einer NAD⁺-abhängigen 7 β -HSDH

Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der NAD⁺-abhängigen 7 β -HSDH [G39E] wurde diese exprimiert und aufgeschlossen. Nach dem Standard Aktivitätsassay wurde in der Umsetzung die gleiche Volumen Aktivität der beiden HSDHs eingesetzt. Der präparative Ansatz (0,5 L) enthielt 20,13 g (100 mM) DHCA, 24,8 g (250 mM) Glucose, 0,2 mM NAD⁺, 4 U ml⁻¹ GDH, 1 U ml⁻¹ 3 α -HSDH und 7 β -HSDH [G39E] in 50 mM KPi pH 7,1. Die Umsetzung lief bei 25 °C für 22 Stunden. Der pH-Wert wurde mittels pH-Stat durch Zudosierung von 25 %iger NaOH über die gesamte Reaktionszeit konstant bei 7,1 gehalten. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben genommen und mittels HPLC untersucht. Nach 21 Stunden wurde der Reaktionsansatz mit 25 %iger HCl auf einen pH-Wert von 1 angesäuert und gestoppt.

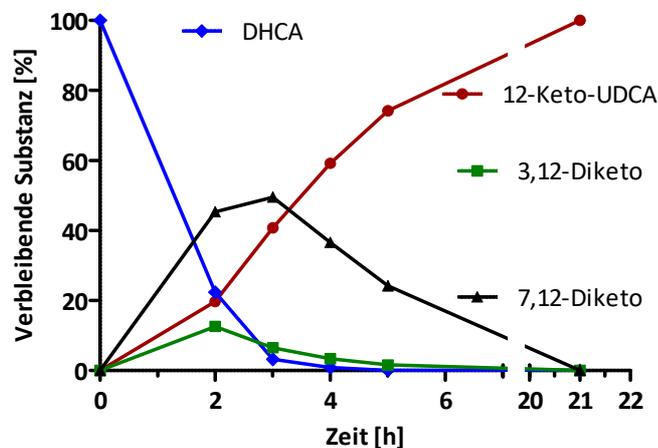


Abb. 62: Biotransformation von DHCA zu 12-Keto-UDCA mit einer NAD⁺-abhängigen 7 β -HSDH in KPi-Puffer pH 7,1. Blaue Linie = Edukt DHCA; rot = Produkt 12-Keto-UDCA; schwarz = Intermediat 7,12-Diketo-UDCA; grün = Intermediat 3,12-Diketo-UDCA

Es konnte eine nahezu komplette Umsetzung (99,8%) mit der NAD⁺-abhängigen 7 β -HSDH [G39E] Mutante erreicht werden (siehe Abbildung 62). Das Zwischenprodukt 7,12-Diketo-UDCA reichert sich zwar bis auf ca. 50 % an, wird aber in der Folge ohne weiteres von der NAD⁺-abhängigen 7 β -HSDH-Mutante abgebaut. Auffällig ist, dass nicht wie bei der Umsetzung mit dem NADP⁺-abhängigen Wildtypenzym das Intermediat 3,12-Diketo akkumuliert, sondern das 7,12-Diketo. Der K_M -Wert der 7 β -HSDH-Mutante für das Substrat 7,12-Diketo wird vermutlich noch grösser sein als der der 3 α -HSDH für das Substrat 3,12-Diketo. Auf Grund der verwendeten Analysenmethode liegt die Reinheit des Produkts 12-Keto-UDCA bei ≥ 99 %.

Ergebnisse

7.2.3. Synthese mit den Mutanten der 3 α - und der 7 β -HSDH in Kombination

Für die Synthese von 12-Keto-UDCA wurden sowohl die 7 β -HSDH [G39S/R64E] als auch folgende Mutanten bzw. Fusionsproteine der 3 α -HSDH eingesetzt: 3 α -HSDH(9his), 3 α -HSDH(9his) [L68A], 3 α -HSDH [L68A] und 3 α -HSDH [R34N/L68A]. Alle bis auf die T188A-Mutante besaßen einen C-terminalen Tag. Der Ansatz (50 ml) enthielt 1,4 g (70 mM) DHCA, 2,0 g (200 mM) Glucose, 0,2 mM NADP⁺, 0,2 mM NAD⁺, 4 U ml⁻¹ GDH, 1,5 U ml⁻¹ 3 α -HSDH und 7 β -HSDH in 50 mM KPi pH 7,0. Die Umsetzungen liefen bei 25 °C bis zu 13 Stunden. Der pH-Wert wurde mittels pH-Stat durch Zudosierung von 20 %iger NaOH über die gesamte Reaktionszeit konstant bei 7,0 gehalten. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben genommen und mittels HPLC untersucht.

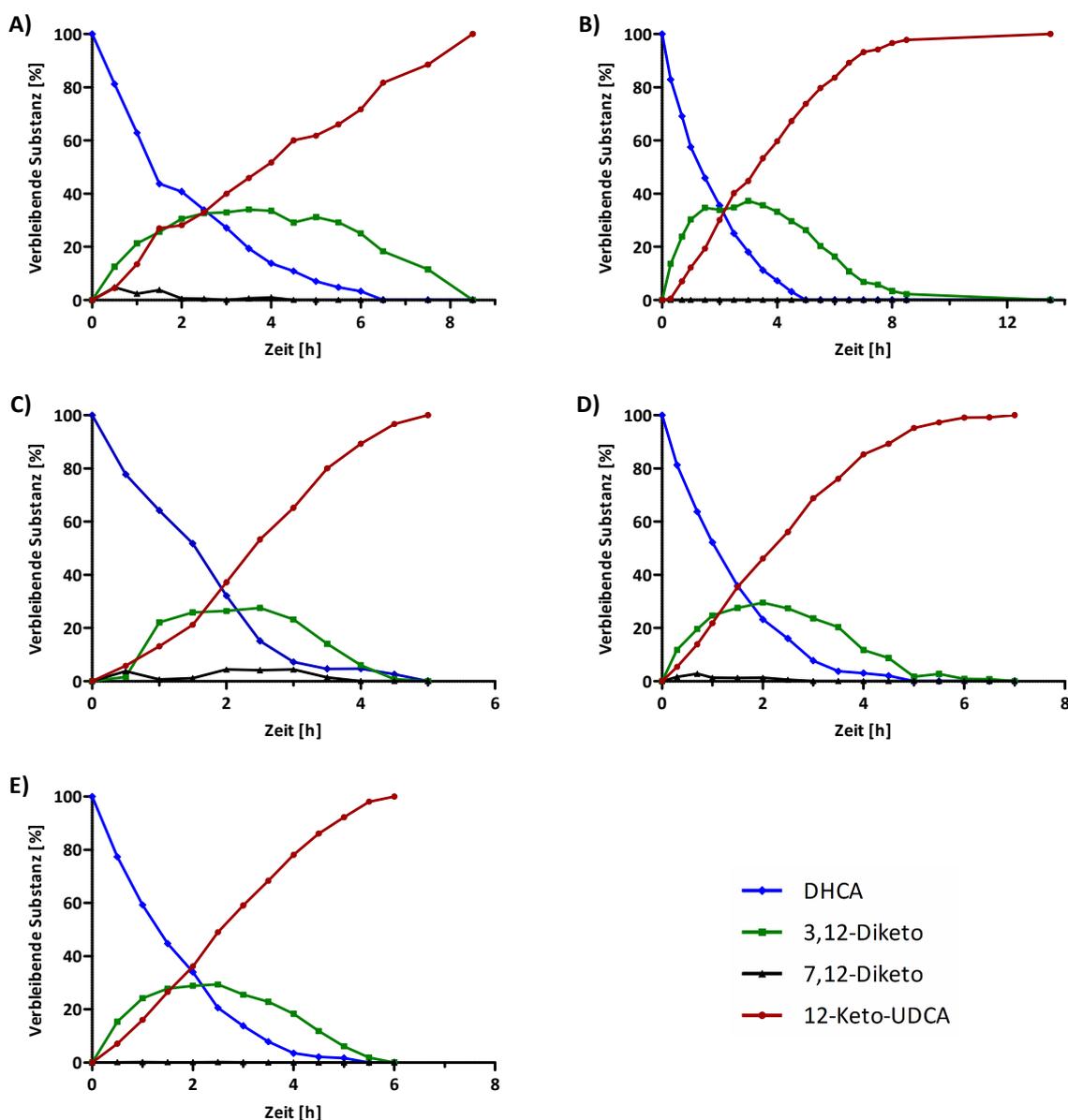


Abb. 63: Ganzzellumsetzungen von 70 mM DHCA mit den Mutanten der 3 α -HSDH **A)** L68A; **B)** 9-His; **C)** L68A mit 9-His; **D)** R34N/L68A und **E)** T188A. Die 7 β -HSDH [G39S/R64E] wurde bei allen Umsetzungen eingesetzt. Als Cofaktorkonzentration wurde jeweils 0,2 mM NAD⁺ als auch NADP⁺ gewählt. Blaue Linie = Edukt DHCA; rot = Produkt 12-Keto-UDCA; schwarz = Intermediat 7,12-Diketo-UDCA; grün = Intermediat 3,12-Diketo-UDCA

Ergebnisse

In Abbildung 63 ist der Verlauf der jeweiligen Biotransformation mit den besten Mutanten der 3α -HSDH als auch der 7β -HSDH aufgeführt. Bei der 7β -HSDH kam nur die Doppelmutante G39S/R64E in Frage, da diese nicht nur eine höhere Aktivität um das ca. 6 bis 7-fache aufweist, sondern zusätzlich keine Substratinhibierung mehr besitzt. Aus der Abbildung geht hervor, dass sich das Zwischenprodukt 7-KLCA in Kombination mit einer Variante der 3α -HSDH nicht akkumuliert. Bei der 3α -HSDH wurden dagegen mehrere Mutanten erzeugt, die eine höhere Aktivität aufweisen. Hier wurden die Mutanten als auch die Variante mit einem 9xHis-Tag am C-Terminus getestet (siehe Bild 63, **B & C**).

Die Aktivitäten der Proteine wurden auf $1,5 \text{ U ml}^{-1}$ eingestellt, was bedeutet, dass die eingesetzte Proteinmenge variiert. Die Menge an 7β -HSDH [G39S/R64E] betrug, resultierend aus der Proteinkonzentration und eingesetztem Volumen, ca. 3 mg, für die Varianten der 3α -HSDH waren folgende Proteinmengen eingesetzt wurden: L68A ca. 8 mg (**A**), 9xHis-Tag ca. 14 mg (**B**), L68A + 9xHis-Tag ca. 28 mg (**C**), R34N/L68A ca. 18 mg (**D**) und T188A ca. 2 mg (**E**). Bei Betrachtung der Proteinmenge fällt auf, dass die Mutante T188A der 3α -HSDH bedeutend weniger Protein benötigt als die anderen Varianten. Somit ist die benötigte Menge an Protein sogar um 1 mg geringer und dennoch wurde in Kombination mit der 7β -HSDH-Mutante eine vollständige Umsetzung innerhalb von 6 Stunden erzielt. Im Vergleich mit den Wildtyp-Enzymen konnte daher die Menge an Protein um das ca. 5-fache (7β -HSDH [G39S/R64E]) bzw. 17-fache (3α -HSDH [T188A]) reduziert werden.

Die Biotransformation von DHCA sowohl mit den Wildtyp-Enzymen als auch mit den Mutanten führte immer zu einer Umsetzung von $\geq 99,8 \%$. Die Synthese mit der NAD^+ -abhängigen 7β -HSDH benötigte allerdings aufgrund der relativ niedrigen Aktivität mehr Zellysate. In den Synthesen mit den Mutanten, die eine höhere Aktivität aufweisen, konnte die Menge an Protein bei der 7β -HSDH [G39S/R64E] ca. um das 5-fache und bei der 3α -HSDH [T188A] um ca. das 17-fache reduziert werden.

7.3. Synthese von 12-Keto-UDCA mit Ganzzellbiokatalysatoren

Ganzzellumsetzungen bieten den Vorteil, dass auf einen Zellaufschluss und gegebenenfalls auf eine Reinigung der Enzyme verzichtet werden kann. In einigen Fällen kann aufgrund der intrazellulären NAD(P)H Menge (Heuser et al., 2007) auch auf den Zusatz von Coenzym verzichtet werden. Zusätzlich zu den Aktivitäten der beteiligten Enzyme und den intrazellulären Coenzym-Konzentration können Ganzzellumsetzungen auch durch Substrat- bzw. Produkttransportprozesse über die Membran beeinflusst werden. Weiterhin muss grundsätzlich auch eine Verstoffwechslung der Substrate oder

Ergebnisse

Produkte durch die *E. coli*-Zellen in Betracht gezogen werden. Letzteres wird bei der Umsetzung von Gallensäuren kaum eine Rolle spielen, da diese Verbindungen grundsätzlich schwer abbaubar sind. Lediglich die Nebenreaktion durch eine *E. coli*-eigene 7α -HSDH würde die Umsetzung deutlich stören, für die gewünschte Umsetzung muss daher immer die Deletionsmutante ohne 7α -HSDH (*E. coli* BL21(DE3) *hdhA*⁻ Kan⁺) verwendet werden. Da die 7α -HSDH im *E. coli*-Wildtypstamm eine hohe Aktivität zeigt, würden deutliche Mengen an 12-Keto-CDCA (12-Keto-Chenodesoxycholsäure) an Stelle von 12-Keto-UDCA (12-Keto-Ursodesoxycholsäure) entstehen, die im weiteren chemischen Verfahren mittels Wolff-Kishner-Reduktion zu CDCA umgesetzt wird. CDCA wird heutzutage nicht mehr als therapeutisches Mittel eingesetzt, da es mehr Nebenwirkungen hervorruft als UDCA (Di Ciaula et al., 2010; Kakiyama et al., 2013; Nguyen et al., 2010), so dass die Nebenreaktion zu einer unerwünschten Verunreinigung des Produkts führen würde.

7.3.1. Vektorkonstrukte

Für die Reduktion der Dehydrocholsäure mit ganzen Zellen wurden mittels Standard Klonierungstechniken diverse Plasmide erzeugt, die die Gene für die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (3α - und 7β -HSDH) sowie der modifizierten Glucose-Dehydrogenase auf ein oder zwei Plasmiden besitzen, um mit diesen einen geeigneten Ganzzellbiokatalysator erstellen zu können. Vorzugsweise wurden entweder die GDH oder die 7β -HSDH in die *multi-cloning-site* 1 (MCS) kloniert, weil die Aktivität dieser beiden Enzyme deutlich höher ist als die der 3α -HSDH. Die Plasmide sahen wie folgt aus:

- **pDB01:** In das Plasmid pETDuet1 wurde die Gensequenz der 3α -HSDH über die Schnittstellen *Bam*H1/*Hind*III in die MCS1 sowie die Gensequenz der 7β -HSDH über die Schnittstellen *Nde*I/*Xho*I in die MCS2 inkloniert. Das Startcodon für den N-terminalen His-Tag wurde mittels QuikChange™-PCR deletiert.
- **pDB02:** In das Plasmid pETDuet1 wurde die Gensequenz der 7β -HSDH über die Schnittstellen *Nco*I/*Not*I in die MCS1 sowie die Gensequenz der 3α -HSDH über die Schnittstellen *Nde*I/*Xho*I inkloniert.
- **pDB04:** In das Plasmid pETDuet1 wurde die Gensequenz der GDH über die Schnittstellen *Eco*RI/*Not*I in die MCS1 sowie die Gensequenz der 3α -HSDH über die Schnittstellen *Nde*I/*Xho*I in die MCS2 inkloniert.

Ergebnisse

- pDB04b: Das Plasmid ist wie pDB4, nur hier wurde das mittels QuikChange™-PCR erzeugte Gen der 3 α -HSDH-Mutante T188A eingebracht.
- pDB05: In das Plasmid pETDuet1 wurde die Gensequenz der GDH über die Schnittstellen *EcoRI/NotI* in die MCS1 sowie die Gensequenz der 7 β -HSDH über die Schnittstellen *NdeI/XhoI* in die MCS2 einkloniert. Das Plasmid verfügt über einen N-terminalen His-Tag, der an der GDH2 hängt.
- pDB05b: Das Plasmid ist wie pDB5, nur wurden hier die mittels QuikChange™-PCR erzeugten Mutationen G39S sowie R64E der 7 β -HSDH eingebracht.
- pDB06: In das Plasmid pACYCDuet1 wurde die Gensequenz der GDH über die Schnittstellen *EcoRI/NotI* in die MCS1 sowie die Gensequenz der 3 α -HSDH über die Schnittstellen *NdeI/XhoI* in die MCS2 einkloniert.
- pA_GDH: In das Plasmid pACYCDuet1 wurde die Gensequenz der GDH über die Schnittstellen *NcoI* und *XhoI* übergreifend in die MCS1 und MCS2 einkloniert. Das Plasmid verfügt über keinen His-Tag.
- pA_7 β -HSDH: In das Plasmid pACYCDuet1 wurde die Gensequenz der 7 β -HSDH über die Schnittstellen *NcoI* und *XhoI* übergreifend in die MCS1 und MCS2 einkloniert.
- pA_7 β -HSDH [SE]: Wie pA_7 β -HSDH, nur wurden hier die mittels QuikChange™-PCR erzeugten Mutationen G39S sowie R64E der 7 β -HSDH eingebracht.
- pA_3 α -HSDH: In das Plasmid pACYCDuet1 wurde die Gensequenz der 3 α -HSDH über die Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* in die MCS2 einkloniert.

Mit den oben dargestellten Plasmiden wurden die Voraussetzungen geschaffen, um Ganzzellbiokatalysatoren mit verschiedensten Kombinationen der HSDHs mit der GDH zu konstruieren. Die Klonierung aller drei Gene auf einen einzigen Vektor wurde verworfen, da sich vermutlich ein Gen schlechter exprimieren lässt. Daher wurde das Zwei-Plasmid-System gewählt, welches sich auch flexibler an den Prozess der Synthese von 12-Keto-UDCA anpassen lässt.

7.3.2. Ganzzellbiokatalysatoren mit Wildtypenzymen

Dieses Kapitel beschreibt den Einsatz von rekombinanten *E. coli*-Zellen als Ganzzellbiokatalysatoren, in denen drei rekombinante Proteine, zwei HSDHs sowie das Cofaktorregenerationsenzym GDH, überexprimiert werden. Durch den Einsatz der GDH erfolgt die Cofaktorregenerierung wie bei der Biotransformation mit isoliertem Protein (in Form von Rohextrakt) Enzym-gekoppelt. Ein wichtiger Unterschied zwischen Ganzzell- und isolierten Enzym-Biotransformationen ist die Tatsache, dass bei

Ergebnisse

dem Ganzzell-Prozess auf die Zudosierung von externen Cofaktoren verzichtet werden kann, da diese natürlicherweise intrazellulär vorliegen. In diesem Fall ist allerdings eins der drei Enzyme NADPH-abhängig, wobei NADPH in der Zelle in einer bedeutend geringeren Konzentration als NADH vorliegt. Daher war ein weiteres Ziel, die Zugabe der Cofaktoren zu optimieren.

Die in Abschnitt 7.3.1. hergestellten Plasmide wurden unterschiedlich kombiniert, exprimiert, aufgeschlossen und anschließend die photometrisch ermittelten Aktivitäten der einzelnen Enzyme aus dem jeweiligen Ganzzellbiokatalysator bestimmt (Tabelle 41). Das SDS-Gel zur Kontrolle der Expressionsleistung ist in der Abbildung 64 dargestellt.

Tabelle 41: gemessene Enzymaktivitäten im Rohextrakt der jeweiligen Ganzzellbiokatalysatoren (DB01 – DB05).

Stamm	Plasmide	3 α -HSDH U ml ⁻¹ (U mg ⁻¹)	7 β -HSDH U ml ⁻¹ (U mg ⁻¹)	GDH U ml ⁻¹ (U mg ⁻¹)
<i>E. coli</i> DB01	pDB5	2,6	68,4	296
	pA_3 α -HSDH	(0,2)	(4,2)	(18,2)
<i>E. coli</i> DB02	pDB4	30,5	12,1	170
	pA_7 β -HSDH	(2,1)	(0,8)	(11,5)
<i>E. coli</i> DB03	pDB2	22,4	74	256
	pA_GDH	(1,1)	(3,7)	(12,9)
<i>E. coli</i> DB04	pDB5	6,1	52	210
	pDB6	(0,4)	(3,1)	(12,5)
<i>E. coli</i> DB05	pDB6	16,7	58	22
	pDB2	(0,9)	(3,2)	(1,2)

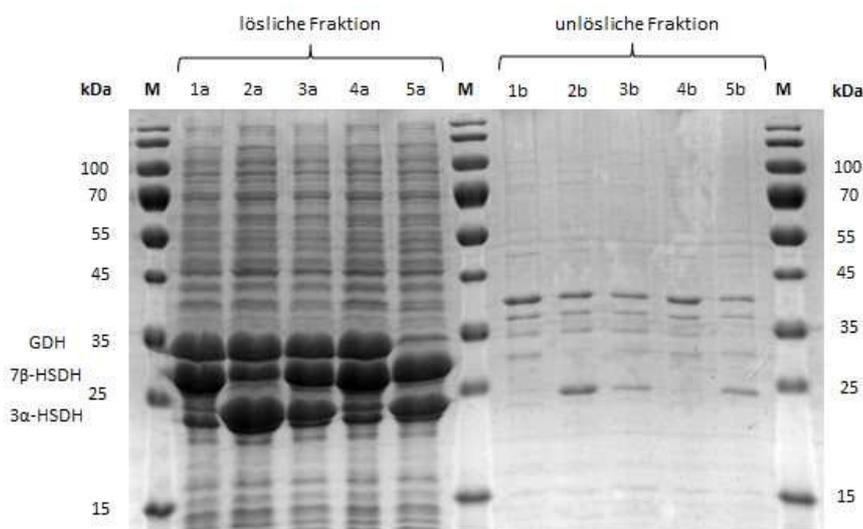


Abb. 64: SDS-Gel der Dehydrogenasen aus den Ganzzellkonstrukten nach Expression in Schüttelkolben-Fermentation in LB-Medium, differenziert in den löslichen (a) und unlöslichen (b) Anteil. Als lösliche Fraktion ist der zellfreie Rohextrakt aufgetragen. Es wurden jeweils 10 μ g Protein aufgetragen. Die Größe der 3 α -HSDH beträgt ca. 26 kDa, die der 7 β -HSDH ca. 29 kDa und der GDH ca. 28 kDa. Die Expressionsbande der GDH läuft allerdings immer etwas höher, bei ca. 33 kDa. 1 = *E. coli* DB01, 2 = *E. coli* DB02; 3 = *E. coli* DB03; 4 = *E. coli* DB04; 5 = *E. coli* DB05; M = Marker (Thermo scientific prestained Ladder).

Ergebnisse

Die erfolgreiche Expression der Dehydrogenasen im Schüttelkolben ist deutlich an den Überexpressionsbanden in dem SDS-Gel sowie den relativ guten Aktivitätswerte (siehe Tabelle 41) zu erkennen. Aufgrund der geringen Aktivität der 3 α -HSDH und der nicht vorhandenen Überexpressionsbande in dem Konstrukt *E. coli* DB01 wird dieses nicht für Umsetzungen eingesetzt. Weiterhin ist die Aktivität als auch die Überexpressionsbande der GDH in dem Konstrukt *E. coli* DB05 relativ gering, kann aber dennoch für Umsetzungen eingesetzt werden.

7.3.3. Charakterisierung der Ganzzellbiokatalysatoren

Für die Umsetzungen der DHCA wurden die biochemisch charakterisierten Ganzzellbiokatalysatoren aus 6.3.2. verwendet. Die Herstellung der 12-Keto-UDCA wurde in einem kleinen Maßstab (10 ml) durchgeführt. Die Umsetzungen wurden bei 25 °C für maximal 20 Stunden durchgeführt.

Die Ansätze (10 ml) enthielten: 50 mM DHCA, 150 mM Glucose, 5 mg_(BFM) ml⁻¹ *E. coli* Zellen in 400 mM KPi (pH 8). Den Ganzzellumsetzungen wurden entweder kein Coenzym oder 0,5 mM NAD⁺ bzw. 0,5 mM NADP⁺ zugesetzt. Die Zellen wurden vor dem Einsatz mindestens einmal eingefroren, um die Zellen zu permeabilisieren. Der Ganzzellbiokatalysator *E. coli* DB01 wurde aufgrund der geringen Aktivität der 3 α -HSDH nicht für Umsetzungen verwendet. Die Umsetzungen ohne zusätzliches Coenzym wurden exemplarisch mit den Ganzzellbiokatalysatoren *E. coli* DB02 und DB03 durchgeführt. Nach 20 Stunden wurde die Umsetzung abgebrochen, da keine besonders gute Produktbildungsrate beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 65). Daraufhin wurde die Zellmenge in einem Wiederholungsversuch um das 5-fache auf 25 mg_(BFM) ml⁻¹ erhöht und mit dem Ganzzellbiokatalysator DB03 eine weitere Umsetzung durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 66 dargestellt.

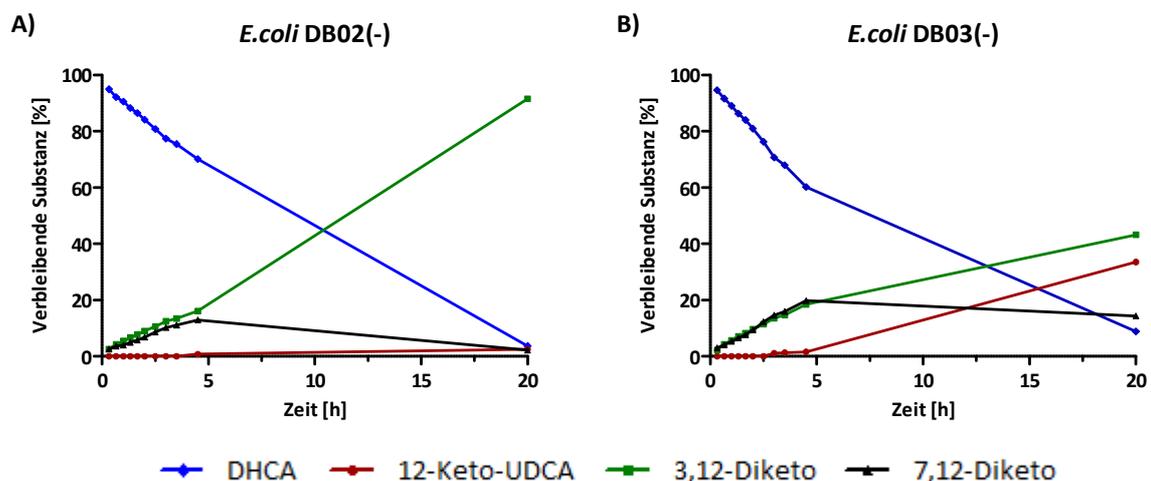


Abb. 65: Ganzzellumsetzungen (50 mM DHCA) mit den Konstrukten *E. coli* DB02 und DB03 ohne zusätzlichen Cofaktor in KPi-Puffer pH 8,0. Es wurden 5 mg Zellen_(BFM) ml⁻¹ eingesetzt. Blaue Linie = Edukt DHCA; rot = Produkt 12-Keto-UDCA; schwarz = Intermediat 7,12-Diketo-UDCA; grün = Intermediat 3,12-Diketo-UDCA.

Ergebnisse

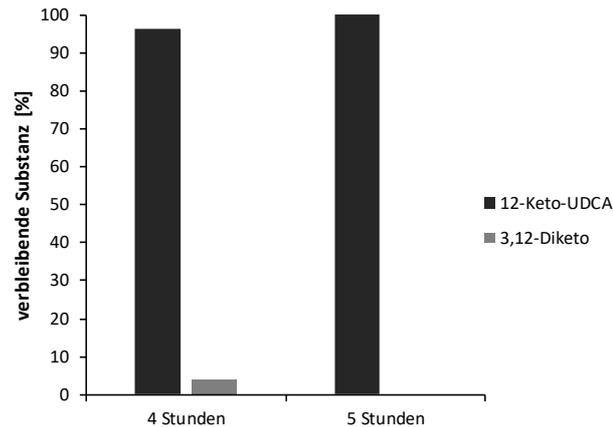


Abb. 66: Ganzzellumsetzungen (70 mM DHCA) mit dem *designer bug* *E. coli* DB03 ohne zusätzlichen Cofaktor in KPi-Puffer pH 8,0. Es wurden 25 mg Zellen_(BFM) ml⁻¹ eingesetzt.

Die Ansätze ohne zusätzlichen Cofaktor zeigten (siehe Abbildung 65 **A** und **B**) nach 20 Stunden keine vollständige Umsetzung. Zwar wird in beiden Fällen das Substrat DHCA nahezu vollständig abgebaut, es häufen sich aber Intermediate an und man findet nur eine niedrige (DB03) bis sehr schwache (DB02) Bildung des Produktes 12-Keto-UDCA, im Ansatz mit dem Ganzzellbiokatalysator *E. coli* DB02 konnte nur ca. 3 % an Produkt nachgewiesen werden. Der hohe K_M -Wert der 3α -HSDH für 3,12-Diketo-UDCA macht sich in diesem Ganzzellsystem deutlich bemerkbar, da sich das Intermediat 3,12-Diketo-UDCA bis zu ca. 92 % akkumuliert. Bei *E. coli* DB03 konnte nach der Reaktionszeit von 20 Stunden ca. 33 % 12-Keto-UDCA nachgewiesen werden. Aufgrund der langsamen Umsatzrate ist durch die geringe Zellmenge nicht genügend interner Cofaktor vorhanden, so dass daraufhin die Zellmenge des Biokatalysators DB03 auf 25 mg_(BFM) ml⁻¹ erhöht wurde. Es konnte nach 5 Stunden ein kompletter Umsatz nachgewiesen werden (siehe Abbildung 65). Nach 4 Stunden war nur noch ein geringer Anteil von ca. 4 % der intermediären Verbindung 3,12-Diketo-UDCA nachweisbar.

Weiterhin wurden Umsetzungen mit Zugabe an Cofaktor durchgeführt. In den Abbildungen 67 (**A-D**) sind die Reaktionsverläufe der Umsetzungen mit Zugabe von 0,5 mM an externen Cofaktor dargestellt.

Ergebnisse

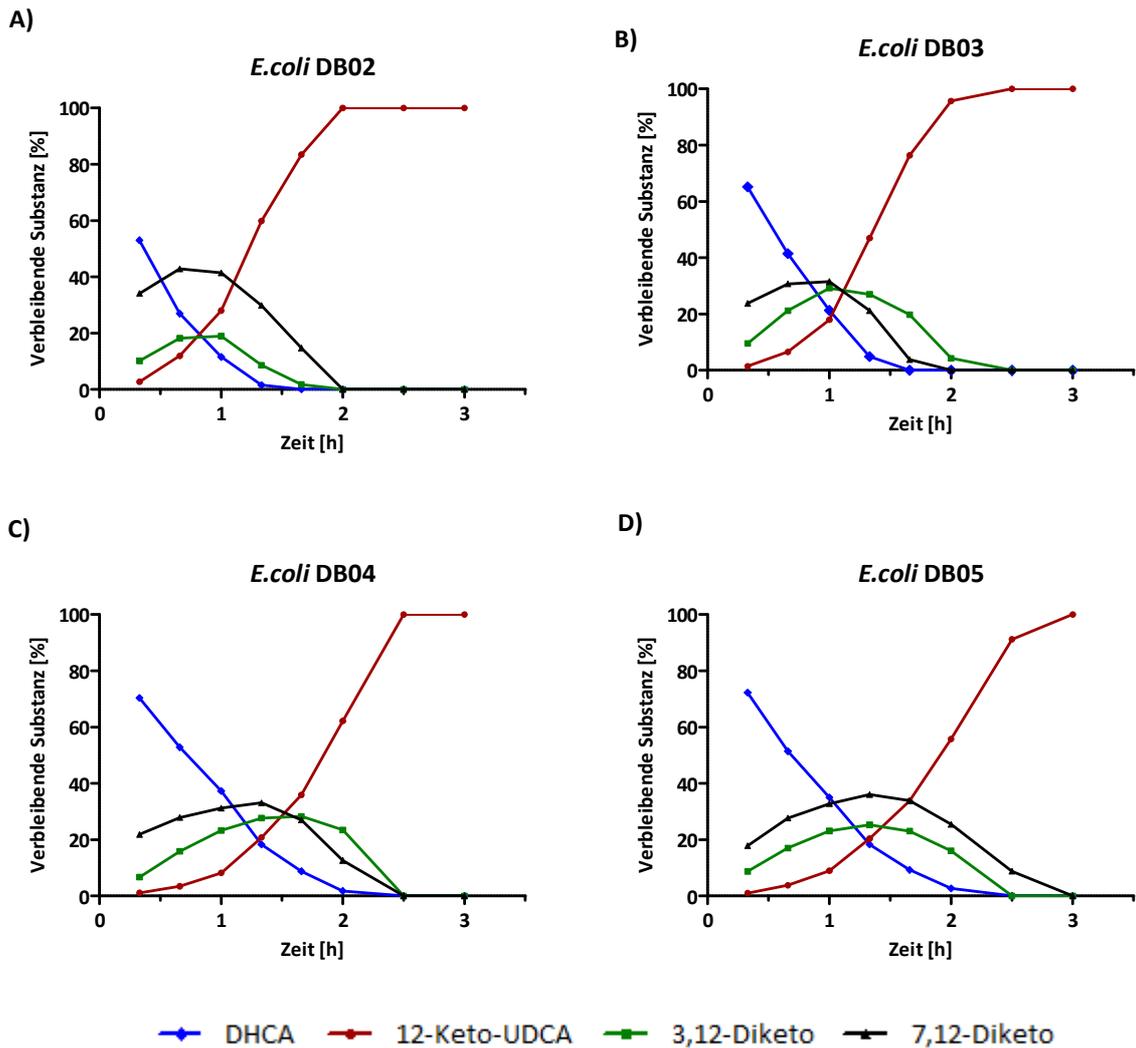


Abb. 67: Ganzzellumsetzungen (50 mM DHCA) mit den Konstrukten *E. coli* DB02-05 unter Zusatz von 0,5 mM NAD⁺ als auch NADP⁺ in KPi-Puffer pH 8,0. Es wurden 5 mg Zellen_(BFM) ml⁻¹ eingesetzt. blaue Linie = Edukt DHCA; rot = Produkt 12-Keto-UDCA; schwarz = Intermediat 7,12-Diketo-UDCA; grün = Intermediat 3,12-Diketo-UDCA.

Die Umsetzungen (siehe Abbildung 67) mit den verschiedenen Ganzzellkonstrukten unterscheiden sich nur marginal. Allerdings spiegeln sich beispielsweise im Vergleich von DB02 und DB03 deutlich die verschiedenen intrazellulären Enzymaktivitäten der HSDHs wieder: Bei DB02 akkumuliert stärker das Intermediat 7,12-Diketo, dem entspricht das Enzymverhältnis von 30,5 (3 α -HSDH) zu 12,1 (7 β -HSDH), während das Enzymverhältnis bei DB03 bei 22,4 (3 α -HSDH) zu 74 (7 β -HSDH) liegt, also 7 β -HSDH im Überschuß vorliegt mit der Folge, dass hier das Intermediat 3,12-Diketo akkumuliert.

Zudem zeigt sich in der Umsetzung mit dem Konstrukt DB05 mit der niedrigen Expression der Glucose-Dehydrogenase, dass die Zwischenprodukte deutlich langsamer abgebaut werden als bei den drei anderen Umsetzungen. Dieser langsamere Abbau ist mit der geringeren Regenerationsfähigkeit der beiden Coenzyme erklärbar, allerdings ist dieser Effekt nicht so ausgeprägt, wie auf Grund der Enzymaktivitätsmessungen zu erwarten ist. In dem Konstrukt DB04 wurde die GDH doppelt

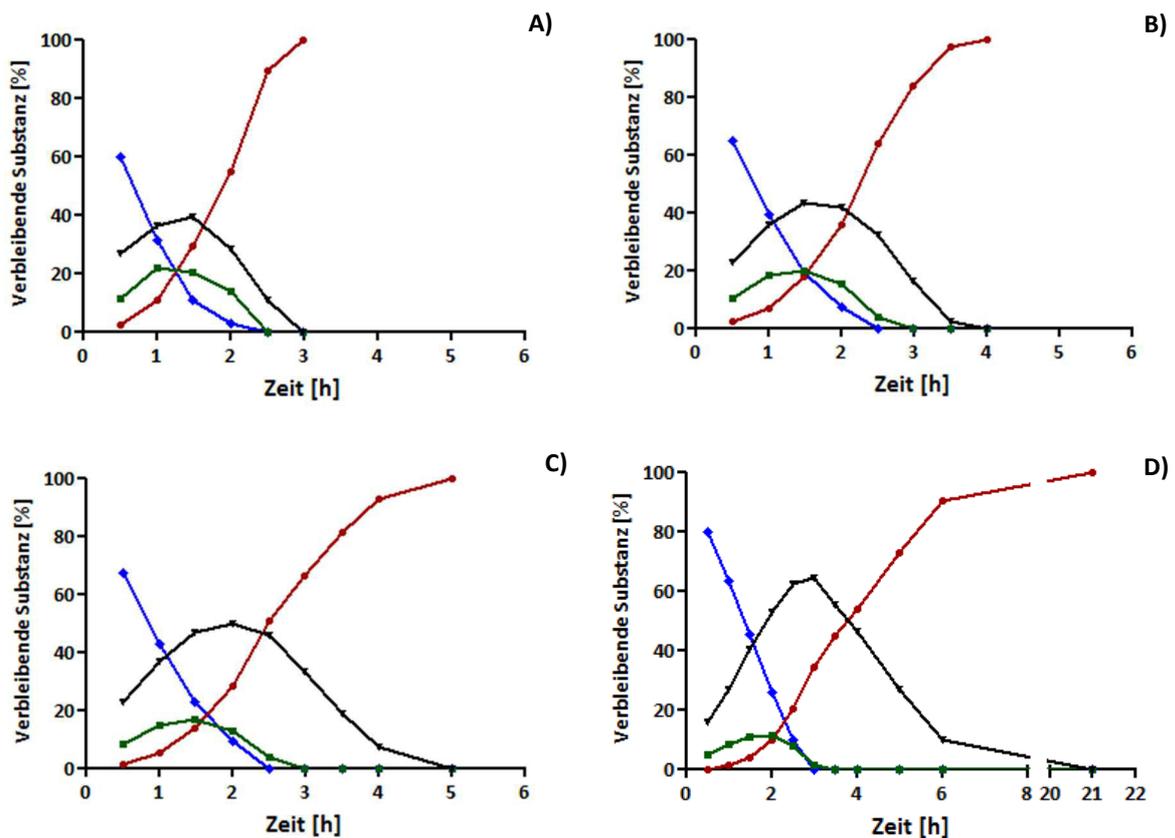
Ergebnisse

eingbracht. Hier sollte sich deutlich weniger Intermediat akkumulieren, aber der Vergleich zeigt, dass der Verlauf ähnlich wie der mit dem Ganzzellkonstrukt DB03 ist. Die Konstrukte DB02 und DB03 sind daher geeignete Kandidaten für Ganzzellumsetzungen.

7.3.4. Optimierung der Cofaktorkonzentration

Um die Konzentration an Cofaktor bei Umsetzungen im industriellen Maßstab in einem ökonomisch vertretbaren Rahmen zu halten, wurden zur Optimierung Ganzzell-Umsetzungen mit verschiedenen Coenzymkonzentrationen durchgeführt (0,3 mM bis 25 μM NAD^+ bzw. NADP^+). Als DHCA-Konzentration wurde 50 mM gewählt und als Stamm wurde *E. coli* DB02 verwendet. Hier wurde die Zellkonzentration von 5 auf 1 $\text{mg}_{(\text{BFM})} \text{ml}^{-1}$ Zellen für die Umsetzung reduziert.

Die Kontrollumsetzung ohne zugesetzten Cofaktor verlief nach 23 Stunden nur zu 5 % Produktbildung (Daten nicht gezeigt). Alle anderen mit externem Cofaktor waren nach spätestens 10 Stunden beendet.



Ergebnisse

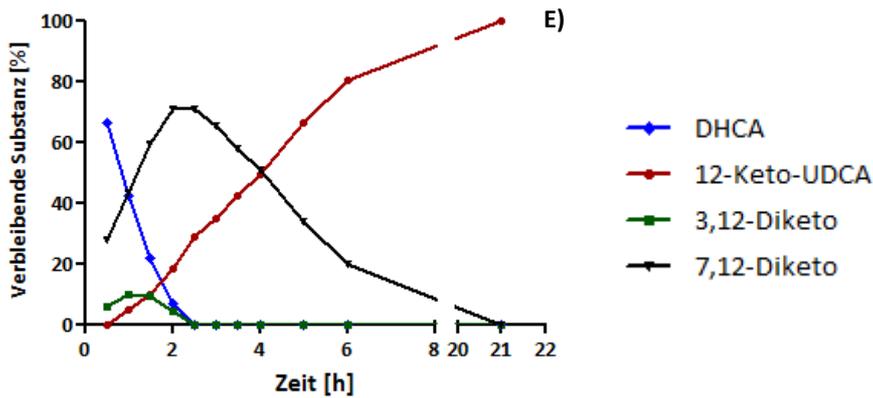
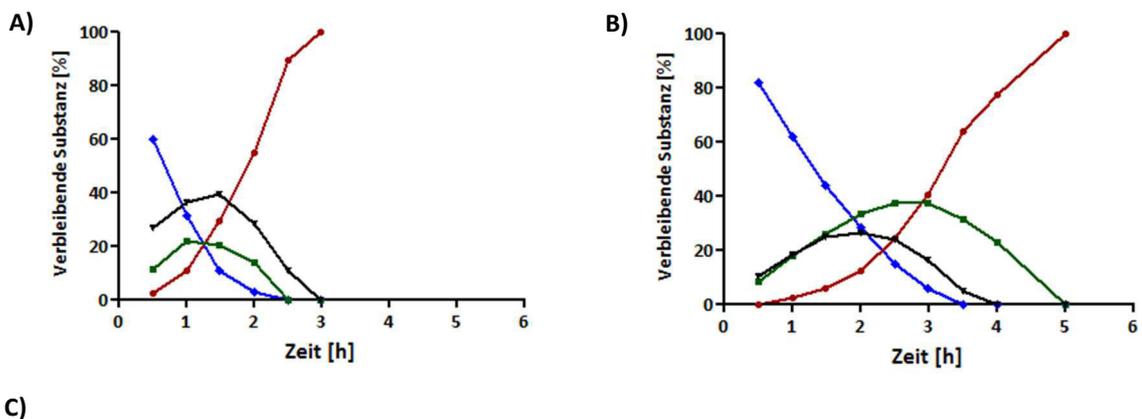


Abb. 68: Ganzzellumsetzung bei konstant 50 mM DHCA und 0,3 mM NAD⁺ bei verschiedenen Konzentrationen an NADP⁺ (A = 300 μ M, B = 200 μ M, C = 100 μ M, D = 50 μ M, E = 25 μ M).

Aus Abbildung 68 geht hervor, dass die Biotransformation mit hohen Mengen an NADP⁺ (0,3 mM NAD⁺ und 0,3 mM NADP⁺) nach ca. 3 Stunden beendet war. Die Umsetzung mit 0,2 mM NADP⁺ war nach ca. 4 Stunden beendet, bei weiterer Reduzierung auf 0,1 mM NADP⁺ war die Umsetzung nach ca. 5 Stunden beendet. Anhand der Reduzierung eines Cofaktors kann man auch die zunehmende Akkumulation von 7,12-Diketo sehen, also dem Zwischenprodukt, das von der NADP⁺-abhängigen 7 β -HSDH umgesetzt wird. Bei weiterer Halbierung des Cofaktors (also mit 50 μ M bzw. 25 μ M), beträgt die Reaktionsdauer ca. 7 bzw. 9 Stunden (siehe **D** bzw. **E**). Das Intermediat 7,12-Diketo-UDCA akkumuliert zwar bis zu 75 %, aber die Biotransformation lief letztlich vollständig ab.

Das Fazit dieser Konzentrationsuntersuchung ist, dass NADP⁺ auf 25 μ M gesenkt werden kann. Berücksichtigen muss man allerdings, dass NADP⁺ instabiler als NAD⁺ ist. Bei einer so geringen Menge kann es im Verlauf einer längeren Reaktionszeit sein, dass das Coenzym letztlich nicht mehr in der eingesetzten Konzentration dem Enzym zur Verfügung steht. Daher sollten für Umsetzungen besser 50 μ M NADP⁺ eingesetzt werden.

Im Folgenden wurden analoge Versuche mit verschiedenen NAD⁺-Konzentrationen (bei konstant NADP⁺) durchgeführt (Abb. 68 **A-C**).



C)

Ergebnisse

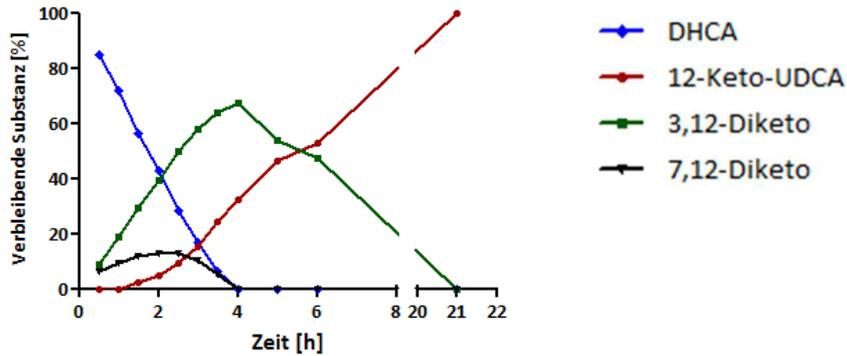


Abb. 69: Ganzzellumsetzung bei konstant 50 mM DHCA und 0,3 mM NADP⁺ bei verschiedenen Konzentrationen an NAD⁺ (A = 300 μ M, B = 100 μ M, C = 25 μ M).

Ähnlich wie in der Untersuchungsreihe mit Variation der NADP⁺-Konzentration bedeutet eine Reduzierung des Coenzym NAD⁺ zwar eine Verlangsamung der Reaktion, aber die Biotransformation von DHCA zu 12-Keto-UDCA verläuft dennoch vollständig ab (siehe Abbildung 69). In Abbildung A bis C ist die sukzessive Verlangsamung der Reaktion durch den Einsatz an geringeren Konzentrationen an Cofaktor zu beobachten. Aus vorherigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Zwischenverbindung 3,12-Diketo-UDCA mit einer geringeren Geschwindigkeit umgesetzt wird als DHCA. Das erklärt auch den langsameren Anstieg des Produktes 12-Keto-UDCA ab Stunde 5. Da aber letztendlich ein vollständiger Umsatz erreicht wurde und lediglich die gesamte Reaktionszeit verlängert worden ist, kann eine NAD⁺-Konzentration von 25 μ M als ausreichend angesehen werden.

7.3.5. Large-scale Ganzzellbiotransformation von 12-Keto-UDCA



Abb. 70: Ganzzellumsetzung an einem Titriino der den pH-Wert bei konstant 7,1 hielt.

Für eine Biotransformation unter pH-Kontrolle in einem präparativen Maßstab wurde das Ganzzellkonstrukt *E. coli* DB03 gewählt. Der Ansatz (1000 ml) enthielt: 28,18 g (70 mM) DHCA, 35,7 g (180 mM) Glucose, *E. coli* DB03 ($1 \text{ g}_{(\text{BFM})} \text{ L}^{-1}$), $25 \mu\text{M NAD}^+$ und $50 \mu\text{M NADP}^+$ in 50 mM KPi. Die Umsetzung lief bei 25°C für 18 Stunden. Der pH-Wert wurde mittels pH-Stat durch Dosierung von ca. 27 ml 25 %ige NaOH über die Reaktionszeit konstant bei 7,1 gehalten. In Abbildung 70 ist das System zur Durchführung der Ganzzellkatalyse an einem Titriino abgebildet. Nach 18 Stunden wurde der Reaktionsansatz mit 25 %iger HCl auf einen pH-Wert von 1 angesäuert und das Sediment mittels Faltenfilter abgetrennt. Die 12-Keto-UDCA wurde anschließend über Nacht bei 60°C getrocknet. Es konnten ca. 29,4 g Rohprodukt (12-Keto-UDCA) gewonnen werden. Die Reinheit der enzymatisch hergestellten 12-Keto-UDCA wurde mittels HPLC analysiert. In

Tabelle 36 sind die Retentionszeiten und Flächenwerte der im HPLC-Chromatogramm (Abbildung 71) aufgetrennten Komponenten aufgeführt. Die Reinheit der enzymatisch hergestellten 12-Keto-UDCA beträgt ca. 99,8 %, der Anteil an 7,12-Diketo beträgt ca. 0,2 %. Restmengen an 3,12-Diketo-UDCA und DHCA konnten nicht mehr nachgewiesen werden. Die zwei entstandenen Peaks mit der Retentionszeit 13,1 min und 19,0 min konnten keiner bekannten Steroidverbindung zugeordnet werden. Daher ist davon auszugehen, dass diese Verbindungen keine unerwünschten Nebenprodukte der enzymatischen Synthese sind und die Reinheit der gebildeten Gallensäure nicht beeinträchtigen.

Ergebnisse

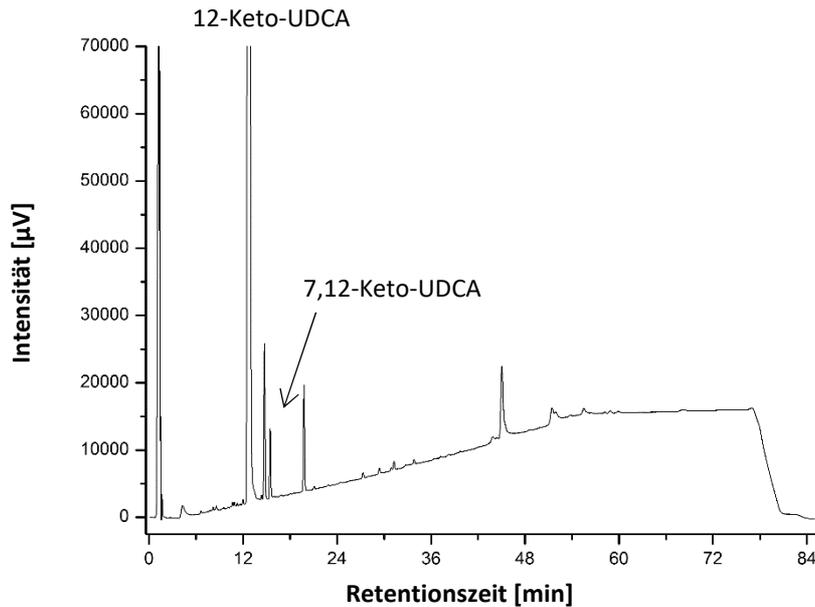


Abb. 71: HPLC-Chromatogramm der mittels des Ganzzellbiokatalysators *E. coli* DB03 und unter pH-Kontrolle hergestellten 12-Keto-UDCA (70 mM DHCA und 25 μ M NAD⁺ bzw. 50 μ M NADP⁺ in KPi-Puffer bei 25 °C).

Tabelle 42: Peaktabelle des HPLC-Chromatogramm für Abbildung 71. (RRt = relative Retentionszeit)

Peak	Retentionszeit [min]	RRt	Area	Area [%]
12-Keto-UDCA	12,8	1,0	50980240	99,8
3,12-Diketo-UDCA	13,5	1,1	0	0
7,12-Diketo-UDCA	15,4	1,2	98543	0,2
DHCA	17,0	1,33	0	0
			51078783	100

Es konnten verschiedene Plasmide für einen Ganzzellbiokatalysator kloniert und biochemisch charakterisiert werden. Testumsetzungen haben gezeigt, dass die Ganzzellbiokatalysatoren *E. coli* DB02 und DB03 die am besten geeigneten darstellen. Mit *E. coli* DB03 konnte eine größere Umsetzung in einem 28 g (70 mM) Maßstab durchgeführt werden, dabei konnte 99,8% Produkt (12-Keto-UDCA) nachgewiesen werden. Die Cofaktorkonzentration konnte ohne Einbußen in der Reaktionszeit oder der Produktqualität auf 50 μ M NADP⁺ und 25 μ M NAD⁺ gesenkt werden. Die Umsetzungen unter Cofaktor-Zusatz zeigen zudem, dass die intrazellulären Cofaktor-Konzentrationen für eine Absättigung der Enzyme nicht ausreichen, ein externer Zusatz ist erforderlich.

Ergebnisse

7.3.6. Ganzzellbiokatalysatoren mit Mutanten

Wie in Kapitel 7.3.2. wird hier der Einsatz von rekombinanten *E. coli*-Zellen als Ganzzellbiokatalysatoren beschrieben, allerdings wurden hier die beiden Mutanten der HSDHs eingesetzt, um so die Reaktionszeit deutlich herabzusetzen. Als Ganzzellbiokatalysator wurde *E. coli* DB08 verwendet. Dieser *designer bug* beinhaltet die beiden Plasmide pDB04b sowie pA_7 β -HSDH [G39S/R64E].

Für eine Biotransformation wurde mittels Titrimetrie der pH-Wert durch Zudosierung von 20 %iger NaOH bei konstant 7,0 gehalten. Der Ansatz (50 ml) enthielt: 1,4 g (70 mM) DHCA, 2,0 g (200 mM) Glucose, 1 mg_(BFM) ml⁻¹ *E. coli* DB08, 0,2 mM NAD⁺ und 1,5 mM NADP⁺ in 50 mM KPi (pH 7,0). Die Umsetzung lief bei 25°C für 12 Stunden.

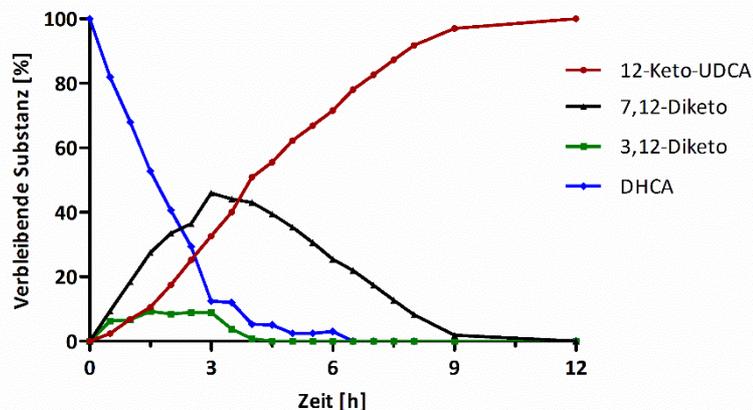


Abb. 72: Ganzzellumsetzungen mit 70 mM DHCA und dem Ganzzellbiokatalysator DB08 mit zusätzlichen Cofaktor (0,2 mM NAD⁺ sowie 0,15 mM NADP⁺) in KPi-Puffer pH 8,0. Es wurde 1 mg Zellen_(BFM) ml⁻¹ eingesetzt. Blaue Linie = Edukt DHCA; rot = Produkt 12-Keto-UDCA; schwarz = Intermediat 7,12-Diketo-UDCA; grün = Intermediat 3,12-Diketo-UDCA.

In Abbildung 72 ist ersichtlich, dass das Intermediat 7,12-Diketo-UDCA mehr akkumuliert als die Zwischenverbindung 3,12-Diketo-UDCA. Das liegt zum einen an der niedrigeren Konzentration an NADP⁺, welches um 50 μ M geringer gewählt wurde. Die 7 β -HSDH [G39S/R64E] zeigt in der Einzeldexpression eine deutlich höhere Aktivität als die T188A-Mutante der 3 α -HSDH. Weiterhin lag das Gen der 7 β -HSDH [G39S/R64E] auf einem *low-copy* Plasmid, was dazu führt, dass die Translation geringer ausfällt und somit auch die Expression. Beide Faktoren sind daher ausschlaggebend dafür, dass das Intermediat 7,12-Diketo-UDCA bis zu 45 % akkumuliert. Nichts desto trotz wurde mit der selben Menge an Zellmasse eine vollständige Umsetzung in weniger als 10 Stunden erzielt.

Es konnte ein Ganzzellbiokatalysator aus *E. coli* DB02 erstellt werden, der die besten Mutanten der 3 α - als auch 7 β -HSDH beinhaltet. Dieser „designer bug“ wurde *E. coli* DB08. Eine Biotransformation von DHCA zu 12-Keto-UDCA zeigte einen Umsatz von 99,9% Produkt (12-Keto-UDCA) in weniger als 10 Stunden.

8. Biotransformation von CA zu 12-Keto-UDCA

Eine weitere Möglichkeit, um an die Gallensäure UDCA zu gelangen, stellt die enzymatische Synthese ausgehend von Cholsäure dar, wobei der letzte Schritt die chemische Wolff-Kishner Reaktion ist. In Kapitel 7 ist beschrieben, wie Cholsäure chemisch oxidiert und das erhaltene DHCA enzymatisch regio- und stereoselektiv reduziert wird. Nach den enzymatischen Schritten folgt abschließend ein chemischer Schritt, um 12-Keto-UDCA zu UDCA umzusetzen. Es werden also zwei chemische und zwei enzymatische Schritte benötigt, wobei letztere simultan ablaufen können. Diese Abfolge bedeutet im Vergleich zur rein chemischen Synthese in ökologischer als auch ökonomischer Hinsicht einen beträchtlichen Fortschritt. Dennoch ist es möglich, mit nur einem enzymatischen Schritt, der in Form der gekoppelten, simultanen Anwendung zweier HSDHs abläuft und einem anschließenden chemischen Schritt (Wolff-Kishner-Reduktion) zum gewünschten Produkt UDCA zu gelangen. Dadurch erspart man sich einen chemischen Schritt. Für die neue Syntheseroute kann der Ganzzellbiokatalysator in Kapitel 9.1. verwendet werden, der aus CDCA durch Epimerisierung der Hydroxylgruppe am C₇-Atom UDCA herstellt. Ausgehend von Cholsäure wird dann abschließend lediglich eine HSDH benötigt, die an Position C₁₂ des Sterangerüst die α -ständige Hydroxylgruppe in eine Carbonylgruppe oxidiert. Zur Cofaktorregenerierung der oxidierten Form von NAD(P)⁺ kann ebenfalls eine NAD(P)H-Oxidase eingesetzt werden. In Abbildung 73 ist das Reaktionsschema dargestellt.

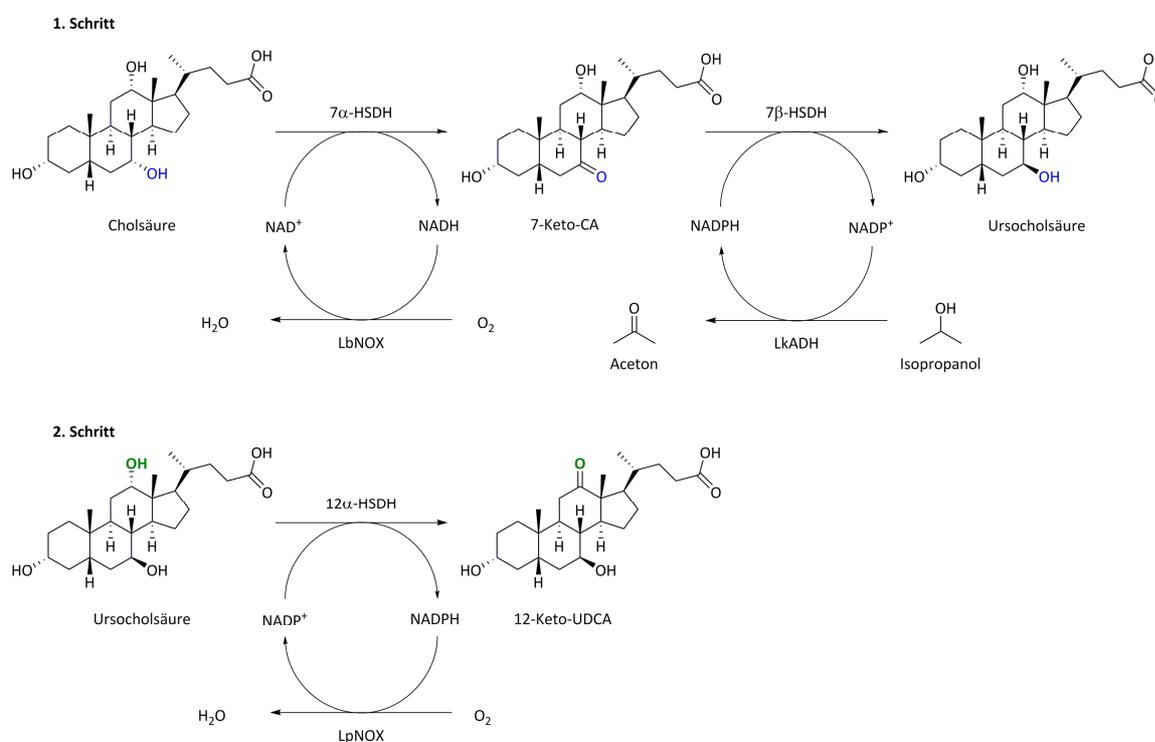


Abb. 73: Reaktionsprinzip der enzymatischen Synthese von 12-Keto-UDCA ausgehend von Cholsäure. Die Synthese wird aufgrund der NADP⁺-Abhängigkeit der 12 α -HSDH in 2 Schritten durchgeführt. Im 1. Schritt wird ein Ganzzellbiokatalysator DB09, der in der enzymatischen Synthese von CDCA zu UDCA genutzt wird, eingesetzt. Anschließend kann der GZK *E. coli* DB11 verwendet werden, der eine 12 α -HSDH und eine NAD(P)H-Oxidase besitzt.

Ergebnisse

Die enzymatische Synthese von Ursocholsäure aus Cholsäure wurde mit *E. coli* DB09 in 80 mM Zitronensäurepuffer (pH 6) durchgeführt. Der Reaktionsansatz von 10 ml enthielt zudem noch: 0,3 mM NAD⁺ als auch NADP⁺, 10 mM CA, 10 % (v/v) Isopropanol und 20 mg_(BFM) ml⁻¹ GZK. Die Reaktion wurde bei ca. 25 °C und 300 rpm für ca. 14 Stunden gerührt. Danach wurde eine Probe mittels HPLC analysiert und der Ansatz für 30 min bei 90°C erhitzt, um die enthaltenen Enzyme zu inaktivieren, damit diese in der folgenden Reaktion nicht stören. So könnte die vorhandene LkADH mit der NADP⁺-abhängigen NOX den Cofaktor, der in der oxidierten Form benötigt wird, direkt reduzieren, ohne dass die 12 α -HSDH die Hydroxylgruppe oxidieren könnte. Der Reaktionsansatz wurde mit Milliporewasser wieder auf 10 ml aufgefüllt, dann wurde erneut 0,25 mM NADP⁺ zugegeben, da es möglich ist, dass der Cofaktor durch die Hitzebehandlung inaktiviert wurde. Weiterhin hat die Hitzebehandlung den Vorteil, dass sowohl das gebildete Aceton als auch Reste an Isopropanol aus der Lösung entfernen werden. Außerdem wurde 20 mg_(BFM) ml⁻¹ *E. coli* DB11 hinzugegeben, der sowohl die 12 α -HSDH aus *Clostridium* sp. group P als auch die NADP⁺-abhängige G178R/L179R-Mutante der NOX aus *Lactobacillus plantarum* enthielt. Der Ansatz wurde ebenfalls bei 25°C und 300 rpm für ca. 24 Stunden weiter gerührt und mittels HPLC analysiert. In Tabelle 43 sind die wichtigsten Daten und Ergebnisse aus der enzymatischen Synthese zusammengefasst.

Tabelle 43: Ergebnisse der enzymatischen Synthese von 12-Keto-UDCA ausgehend von Cholsäure.

Schritt	Verwendete Zellen	Inkubationszeit [h]	Umsatz (%)
1.	<i>E. coli</i> DB09	14	≥ 99%
2.	<i>E. coli</i> DB11	24	≥ 95 %

Aus Tabelle 43 kann man erkennen, dass der 1. enzymatische Schritt eine komplette Umsetzung zur 7 β -Hydroxycholsäure erhält. Dieser Ansatz konnte ohne Aufarbeitung, lediglich mit einer Hitzebehandlung weiter genutzt werden. Der zweite enzymatische Schritt konnte zu einem nahezu vollständigen Umsatz zur Vorstufe 12-Keto-UDCA von ca. 95 % durchgeführt werden. Das enzymatisch hergestellte 12-Keto-UDCA kann nun mittels Wolff-Kishner-Reduktion zu Ursodesoxycholsäure umgewandelt werden.

Die enzymatische Synthese von 12-Keto-UDCA ausgehend von CA stellt eine weitere alternative Route zum Endprodukt UDCA dar. Im ersten Schritt der enzymatischen Redoxreaktion konnte ein Umsatz von ≥ 99 % für die Verbindung 7 β -Epicholsäure ermittelt werden. Ohne Aufarbeitung kann dieses in die weitere enzymatische Umsetzung, der Oxidation der Hydroxylgruppe am C₁₂-Atom des Sterangerüst eingesetzt werden, wobei hier eine Umsetzung von ≥ 95 % erzielt werden konnte.

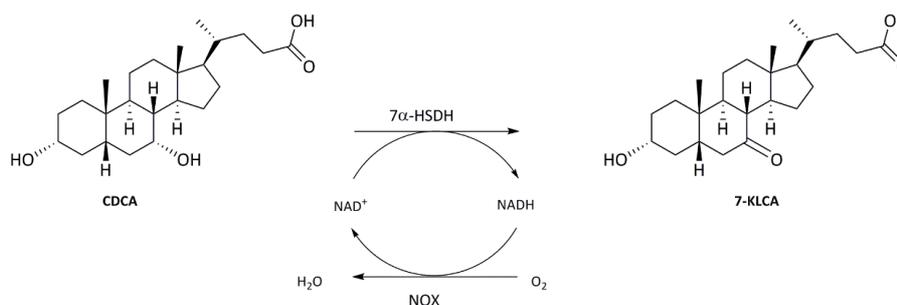
9. Biotransformation von CDCA zu UDCA

Ziel dieser Biotransformation ist es, UDCA aus CDCA direkt herzustellen. Der Vorteil dabei ist, dass zum einen die OH-Gruppe am C₃ bereits in der α-Position vorliegt und dass keine Wolff-Kishner-Reduktion der 12-Keto-UDCA erforderlich ist, da CDCA in 12-Position bereits richtig substituiert vorliegt, d.h. keine Hydroxy- bzw. Ketogruppe aufweist. Das bedeutet, das gewünschte Produkt kann direkt über eine Oxidation der 7α-Hydroxyl- zur Ketogruppe und anschließender Reduktion zur 7β-Hydroxygruppe gewonnen werden. Diese Reaktionsfolge kann zum einen mittels eines 4-Enzymsystems (zweistufig) oder eines 2-Enzymsystems (einstufig) durchgeführt werden. Letzteres benötigt somit keine zusätzlichen Cofaktor Regenerierungsenzyme, sofern beide HSDHs für die Epimerisierung der C₇ Gruppe die gleiche Cofaktorabhängigkeit besitzen. Ein Schema für den zweistufigen Prozess ist in Abbildung 74 und für den einstufigen Prozess in Abbildung 82 dargestellt.

9.1. Synthese von UDCA aus CDCA in einem zweistufigen Reaktionsprinzip

Als „zweistufiger“ Prozess wird diejenige Umsetzung bezeichnet, bei der jeder Teilschritt mit einer eigenen Coenzym-Regenerierung gekoppelt ist, also die Oxidation des ersten Schritts von CDCA zu 7-KLCA mit einer enzymatischen Regenerierungsreaktion für NAD⁺ und die zweite Reaktion der Reduktion mit einem enzymatischen Schritt der NADPH-Regenerierung.

Oxidativer Teilschritt



Reduktiver Teilschritt

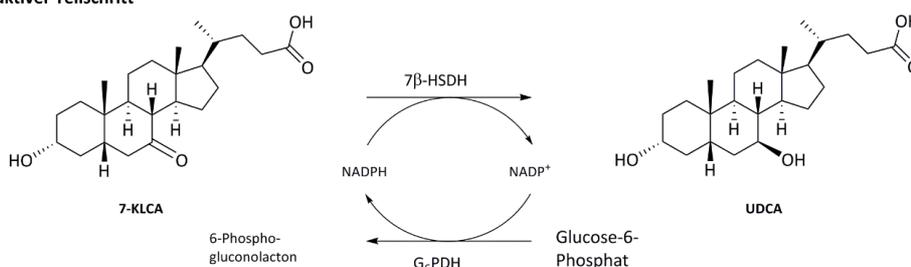


Abb. 74: Reaktionsschema der Biotransformation von CDCA zu UDCA mit Cofaktorregenerierung im sogenannten „zweistufigen Prozess“. NOX steht für eine NAD(H)-Oxidase und G6PDH für Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Das Schema ist in den oxidativen und den reduktiven Teilschritt unterteilt.

Ergebnisse

9.1.1. Zweistufige Synthese von UDCA aus CDCA mittels isolierten Enzymen

Die Synthese der Gallensäure UDCA aus CDCA erfolgte mit isolierten Enzymen standardmäßig in 100 mM KPi-Puffer (pH 7,0) bei 25 °C. Die Reaktionsansätze wurden mittels Rührfische auf einem Multirührer bei ca. 700 rpm durchmischt. Die Enzyme wurden in einem Verhältnis 1 : 2 eingesetzt, d.h. 0,5 U ml⁻¹ 7 α -HSDH (*E. coli*) bzw. 1,0 U ml⁻¹ 7 β -HSDH pro Ansatz. Die Menge an LbNOX bzw. G6PDH betrug jeweils 10 U ml⁻¹, welches ein 20-facher bzw. 10-facher Überschuss an Regenerierungsenzym bedeutet. Die eingesetzte Cofaktormenge betrug 0,25 mM NADP⁺ und NAD⁺. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben genommen und mittels HPLC untersucht.

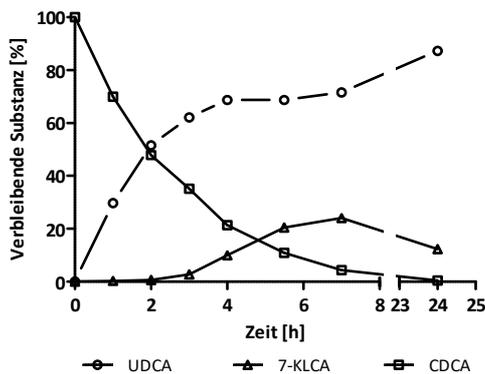


Abb. 75: Umsetzung von 25 mM CDCA in 100 mM KPi-Puffer pH 7,0 bei 25 °C mit einer NAD⁺-abhängigen 7 α -HSDH aus *E. coli* und einer NADP⁺-abhängigen 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* im zweistufigen Prozess mit Cofaktorregenerierungsenzymen. Nach 24 h Reaktionszeit konnte ein Umsatz von ca. 87 % detektiert werden.

Nach 24 Stunden konnten ca. 87 % UDCA nachgewiesen werden. Der zeitliche Verlauf (Abbildung 75) zeigt, dass CDCA mit verhältnismäßig gleichbleibender Geschwindigkeit abgebaut, also zu 7-Ketolithocholsäure oxidiert wird, bei den eingesetzten Enzymmengen ist diese Oxidation nach ca. 8-10 Std abgeschlossen. Die Reduktion von 7-Ketolithocholsäure dagegen verläuft nur bis ca. zur fünften Stunde mit einer Produktbildung von ca. 70 % symmetrisch zur Oxidation. Danach ist eine deutliche Verringerung der Produktbildungsrate zu beobachten, gleichzeitig akkumuliert das Zwischenprodukt 7-Ketolithocholsäure. Dieser Verlauf des Umsatzes deutet darauf hin, dass die Coenzym-Regenerierung, hier also die Regenerierung von NADPH durch Glucose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, nicht mehr im ursprünglichen Ausmaß funktioniert. Vermutlich ist das Cosubstrat Glucose-6-phosphat nicht ausreichend stabil und ist teilweise oder vollständig hydrolysiert. Der in der Folge (ab ca. 4. Std) zu beobachtende langsame Umsatz von 7-KLCA könnte auf *E. coli*-interne Reaktionen zurückzuführen sein, insbesondere der Pentosephosphat-Weg, den auch *E. coli* besitzt, liefert NADPH nach.

Ein weiterer Ansatz wurde mit 40 statt 25 mM CDCA durchgeführt. Das Enzymverhältnis sowie die eingesetzte Menge an Cofaktor wurden gleich gehalten.

Ergebnisse

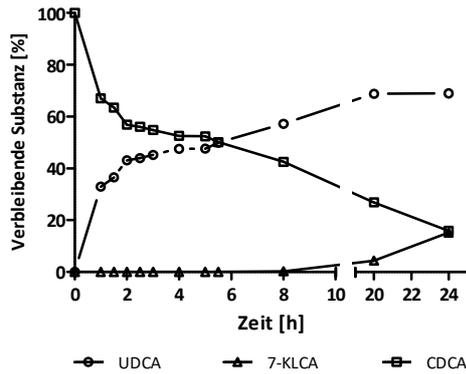


Abb. 76: Umsetzung von 40 mM CDCA in 100 mM KPi-Puffer pH 7,0 bei 25 °C mit einer NAD⁺-abhängigen 7 α -HSDH aus *E. coli* und einer NADP⁺-abhängigen 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* im zweistufigen Prozess mit Cofaktorregenerierungsenzyme. Nach 24 h Reaktionszeit konnte ein Umsatz von ca. 69 % detektiert werden.

Die Umsetzung mit 40 mM CDCA (siehe Abbildung 76) ergab nach 24 h zu ca. 69 % Produktbildung in Form von UDCA, der Rest setzt sich je zur Hälfte aus dem Intermediat 7-KLCA und dem Edukt CDCA zusammen. Überraschend ist die schnelle Umsetzung von CDCA zu Beginn der Reaktion, innerhalb der ersten Stunde sind bereits 40 % an CDCA zu UDCA umgesetzt worden, das Intermediat ist nicht nachweisbar. Dieser Verlauf weist darauf hin, dass der erste Teilschritt anscheinend der empfindlichere Schritt ist, in der Folge wird CDCA langsam weiter abgebaut, dabei häuft sich 7-KLCA aber nicht an, sondern intermediär gebildetes KLCA wird offensichtlich sofort zu UDCA reduziert.

Da zurückliegende Versuche prinzipiell ebenfalls diesen Verlauf gezeigt hatten, wurden nach 24 Stunden beide Cofaktorregenerierungsenzyme erneut zugesetzt, dabei konnte allerdings keine Änderung mehr festgestellt werden. Eine mögliche Ursache könnte die Produktinhibierung oder andere Faktoren sein, die auf die Umsetzung einwirken. Die Produktinhibierung, die von UDCA auf die 7 β -HSDH wirkt, wurde untersucht, dabei konnte allerdings kein wesentlicher Aktivitätsverlust festgestellt werden, so dass hier ein anderer Faktor als Ursache zugrunde liegt.

Die Umsetzungen mit freien Enzymen im zweistufigen Prozess (mit zusätzlichen Cofaktorregenerierungsenzyme) haben ergeben, dass ein Umsatz der CDCA (25 mM) zu UDCA von 87 % ergibt. Mit höherer Konzentration an Startsubstrat konnte dagegen nur ein Umsatz von 69 % detektiert werden.

9.1.2. Zweistufige Synthese von UDCA aus CDCA mittels Ganzzellbiokatalysator

Der zweistufige Prozess mit der Verwendung einer Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, die Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconolacton und dabei NADP^+ zu NADPH umsetzt, war für den ersten Test als *Proof of concept* geeignet und hat auch gezeigt, dass ein nahezu vollständiger Umsatz möglich ist. Für eine industrielle Anwendung ist die Verwendung von Glucose-6-Phosphat ungeeignet, da diese Verbindung relativ teuer und in Wasser deutlich instabil ist (ca. 78 € g^{-1}). Das im Folgenden beschriebene Verfahren beinhaltet zwei zusätzliche Cofaktor-Regenerierungsschritte: Im ersten Schritt wird NAD^+ kontinuierlich durch eine NADH-Oxidase regeneriert, im zweiten Schritt wird NADPH durch eine Alkohol-Dehydrogenase regeneriert. Der erste Schritt ist durch das Enzym NADH-Oxidase irreversibel, im zweiten Schritt wird das Gleichgewicht durch einen Überschuss an Isopropanol nahezu vollständig zum Produkt verschoben, so dass ein vollständiger Umsatz möglich ist. Beide Schritte können direkt miteinander kombiniert werden, da durch die Cofaktor-Spezifität der jeweiligen Regenerierungsenzyme und HSDHs keine Kreuzreaktionen stattfinden.

9.1.2.1. Vektorkonstrukte

Für die Reaktion der CDCA zu UDCA mit ganzen Zellen wurden mittels Standard Klonierungstechniken diverse Plasmide erzeugt, die die Gene für die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (7α - und 7β -HSDH) als auch die Cofaktor regenerierenden Enzyme (NADH-Oxidase aus *L. brevis* und die ADH aus *L. kefir*) auf zwei Plasmiden besitzen, um mit diesen einen geeigneten Ganzzellbiokatalysator erstellen zu können. Vorzugsweise wurde die LkADH und LbNOX in die MCS1 kloniert, weil die Aktivität der beiden Enzyme deutlich höher ist als die der 7β -HSDH, die daher in die MCS2 des pETDuet kloniert wurde. Die beiden Plasmide sahen wie folgt aus:

- pDB09: In das Plasmid pETDuet1 wurde die Gensequenz der LbNOX über die Schnittstellen *NcoI/NotI* in die MCS1 sowie die Gensequenz der 7β -HSDH über die Schnittstellen *NdeI/XhoI* in die MCS2 inkloniert.
- pDB10: In das Plasmid pACYCDuet wurde die Gensequenz der 7α -HSDH aus *E. coli* über die Schnittstellen *NcoI/NotI* in die MCS1 sowie die Gensequenz der LkDH über die Schnittstellen *NdeI/XhoI* inkloniert.

9.1.2.2. Biotransformation mit Ganzzellbiokatalysatoren

Die Gene der 7 α -HSDH als auch der LkADH wurden auf das *low-copy* Plasmid pACYCDuet kloniert, welches einen anderen „Origin of replication“ als das Plasmid pETDuet1 besitzt, in das die Gene der 7 β -HSDH und LbNOX kloniert sind, daher sind beide Plasmide in einer *E. coli*-Zelle verwendbar. Weiterhin zeigten die 7 α -HSDH sowie die LkADH in der Single-Expression die höchsten Aktivitäten, die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme liegt bei ≥ 100 U mg⁻¹ und kann durch Verwendung eines *low-copy* Plasmid so reguliert werden, dass diese nicht im deutlichen Überschuss von der *E. coli*-Zelle produziert werden.

In Abbildung 77 ist das Reaktionsschema dargestellt. Realisiert wird diese Reaktion durch einen Ganzzellbiokatalysator, der alle vier Enzyme rekombinant enthält und als „Ein-Schritt-Katalysator“ für die Umwandlung CDCA in UDCA eingesetzt werden kann.

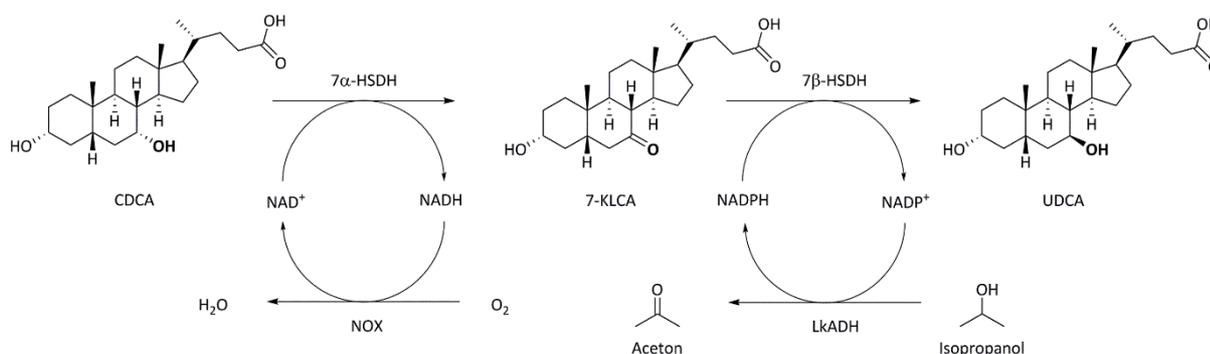


Abb. 77: Reaktionsschema der zweistufigen Synthese von UDCA ausgehend von CDCA mittels Ganzzellbiokatalysators. Für die Regenerierung von NAD⁺ wurde eine spezifische NADH-Oxidase aus *L. brevis* und für die Regenerierung von NADPH eine ADH aus *L. kefir* benutzt. Beide Regenerierungsenzyme wie auch die HSDHs sind sehr spezifisch in Ihrer Akzeptanz des Cofaktors, so dass eine strikte Trennung der Oxidation von der Reduktion gewährleistet ist.

Als Expressionsstamm konnte sowohl der Stamm BL21(DE3) (*E. coli* DB09) als auch der knock-out Stamm BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH (*E. coli* DB10) verwendet werden. Ersterer besitzt noch im Chromosom das Gen der 7 α -HSDH, was im Prinzip die Umsetzung nicht stören dürfte, sondern möglicherweise die Aktivität der 7 α -HSDH im Ganzzellbiokatalysator DB09 im Vergleich zu DB10 sogar noch erhöhen sollte.

Nach der Expression der 4 Gene in den GZKs wurde die Expressionsleistung über eine SDS-Page überprüft, da es bisher nur eine Veröffentlichung über einen Ganzzellbiokatalysator mit 4 Proteinen beschrieben ist (Both et al., 2016). In Abbildung 78 ist zum Vergleich die jeweilige Einzel-Expression des Proteins aufgeführt.

Ergebnisse

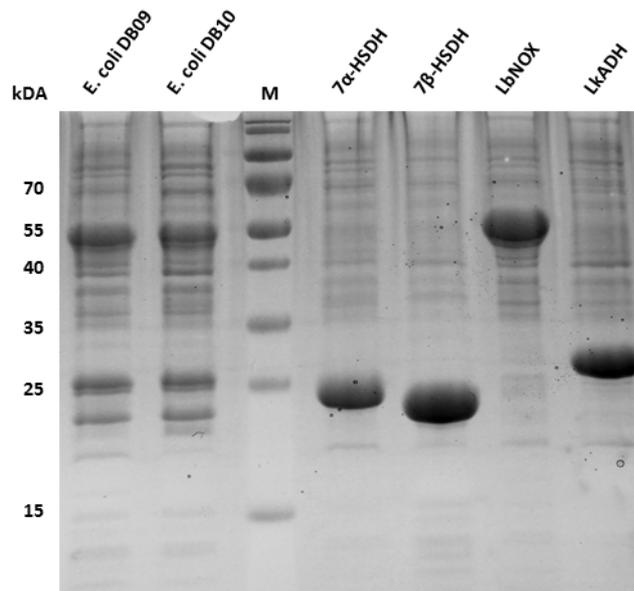


Abb. 78: SDS-Page der beiden Ganzzellbiokatalysatoren *E. coli* DB09 und *E. coli* DB10. Zum Vergleich der Expression wurden rechts neben dem Marker die einzelnen Dehydrogenasen mit aufgeführt. Es wurde jeweils 10 µg Protein auf das 15%ige SDS-Gel aufgetragen. M = Marker (prestained Proteinladder von ThermoScientific).

Aus Abbildung 78 geht hervor, dass die Expression aller 4 Proteine in einem Ganzzellbiokatalysator (GZK) möglich ist. Aufgrund der ähnlichen Größen der 7α-HSDH, 7β-HSDH als auch LkADH (LkADH = 26,8 kDa; 7β-HSDH = 28,8 kDa; 7α-HSDH = 26,8 kDa) ist eine Unterscheidung der Expressionsbanden im Ganzzellsystem schwierig. Die LbNOX mit ca. 48,9 kDa ist gut erkennbar, hier ist eine gute Expression im GZK sichtbar. Die beiden eingesetzten Expressionsstämme BL21(DE3) und BL21(DE3)Δ7α-HSDH zeigen keinen Unterschied, es können somit beide in Biotransformationen eingesetzt werden.

Vor den analytischen Umsetzungen wurde getestet, welcher pH-Wert am geeignetsten für die enzymatische Synthese ist, da für diese Reaktion 4 Proteine zusammenarbeiten müssen. Hierfür wurden folgende Puffer getestet: Zitronensäurephosphat pH 5; Zitronensäurephosphat pH 6; Zitronensäure pH 6; KPi pH 6, 7 und 8 sowie Tris-HCl pH 9.

Der Ansatz sah wie folgt aus:

10 mg_(BFM) ml⁻¹ *E. coli* DB09; 10 mM CDCA; 10 % Isopropanol; 0,2 mM NAD⁺; 0,2 mM NADP⁺ in 80 mM Puffer. Die Reaktionen wurden bei 25°C durchgeführt und nach 3 bzw. 24 Stunden wurden Proben genommen und mittels HPLC analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 79 zu sehen.

Ergebnisse

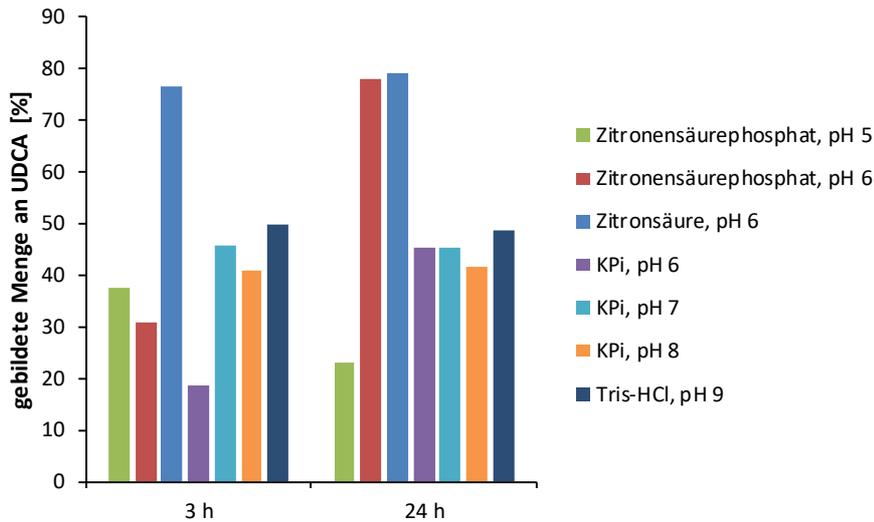


Abb. 79: Umsetzung von 10 mM CDCA zu UDCA in verschiedenen Puffern sowie bei verschiedenen pH-Werten. Dargestellt ist die gebildete Menge an UDCA. Die Konzentration des jeweiligen Puffers betrug 80 mM.

Aus Abbildung 79 geht hervor, dass bei Verwendung des Zitronensäurepuffers mit und ohne Phosphat höhere Umsatzraten als im KPi- und im Tris-HCl-Puffer erreicht werden konnten. Bei Verwendung des Zitronensäurepuffers (pH 6) konnte nach 3 Stunden ein 76 %iger und nach 24 Stunden ein 79 %iger Umsatz nachgewiesen werden. Der Zitronensäurepuffer ohne Phosphat ist, wie man aus der Abbildung erkennen kann, auch der einzige, bei dem die Epimerisierung nach 3 Stunden am weitesten fortgeschritten ist. In den anderen Puffern konnte deutlich weniger nachgewiesen werden, bei Verwendung des KPi-Puffers (pH 6) ca. 18 % und bei Tris-HCl (pH 9) ca. 50 %. Verwunderlich ist, dass bei Verwendung von phosphathaltigen Puffern die Reaktion langsamer oder sogar schlechter gegenüber dem Zitronensäurepuffer abläuft. Ausnahme hier ist der Tris-HCl Puffer, aber hier ist wahrscheinlich der höhere pH-Wert der Grund. Vermutlich ist die NADH-Oxidase inaktiviert worden, da diese literaturbekannt saueres Milieu bevorzugt (Hummel and Riebel, 2003).

Weitere Umsetzungen wurden daher im Zitronensäurepuffer pH 6,0 angesetzt. Um eine vollständige Umsetzung zu erzielen, wurde die Menge an Cofaktor erhöht und mit verschiedenen Verhältnissen der beiden Coenzyme gearbeitet. Zusätzlich wurde noch die Menge an Isopropanol variiert, um den Einfluss dieses Regenerierungsmittels auf den GZK zu überprüfen. In Abbildung 80 ist das Ergebnis dieser Variationen dargestellt.

Ergebnisse

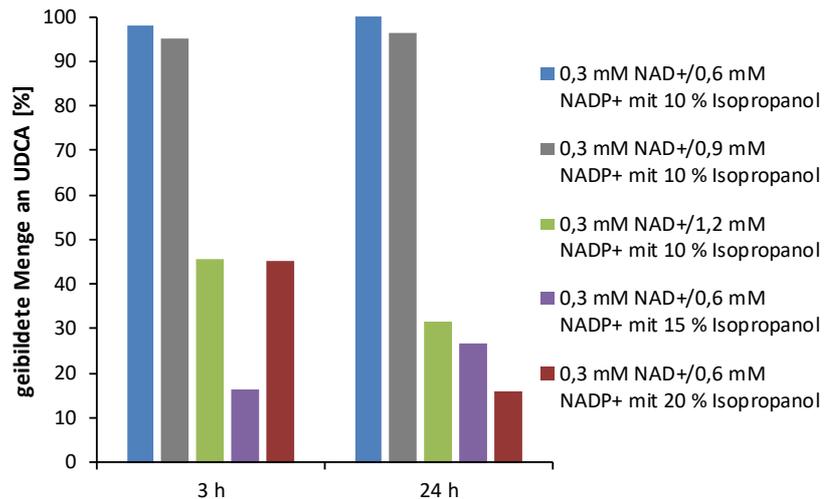


Abb. 80: Umsetzung von 10 mM CDCA zu UDCA in 80 mM Zitronensäurepuffer (pH 6,0) bei verschiedenen Verhältnissen an Cofaktor als auch mit verschiedenen Mengen an Isopropanol.

Aus Abbildung 80 ist ersichtlich, dass nach 24 Stunden ein kompletter Umsatz im Zitronensäurepuffer (pH 6,0) mit 0,3 mM NAD⁺ und 0,6 mM NADP⁺ erzielt werden konnte. Bei Einsatz des dreifachen Überschusses an NADP⁺ gegenüber NAD⁺ (0,3 mM NAD⁺ und 0,9 mM NADP⁺) konnte ein Umsatz von ca. 96 % erreicht werden. Erhöht man allerdings weiterhin die Menge an NADP⁺, so sinkt der Umsatz deutlich, nach drei Stunden sind 46 % UDCA und nach 24 Stunden nur noch 32 % UDCA nachweisbar. Offensichtlich inhibiert Isopropanol die Aktivität des Gesamtsystems, das wird auch bestätigt durch den Versuch mit 20 % Isopropanol, hier ist gar kein UDCA mehr nachweisbar.

Aus den bisherigen Ansätzen wurde ein Ansatz mit den besten ermittelten Konditionen durchgeführt und innerhalb von 5 Stunden mehrere Proben genommen. Der Ansatz enthielt im Einzelnen: 20 mg_(BFM) ml⁻¹ *E. coli* DB09, 10 mM CDCA, 10 % Isopropanol, 0,3 mM NAD⁺, 0,6 mM NADP⁺ in 80 mM Zitronensäurepuffer (pH 6,0).

Ergebnisse

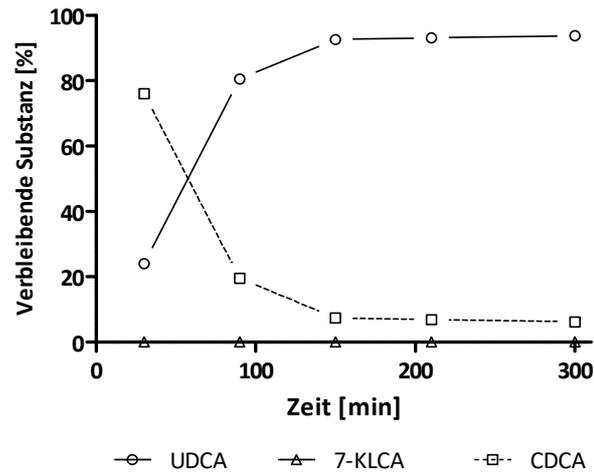


Abb. 81: Reaktionsverlauf von 10 mM CDCA zu UDCA mit dem Ganzzellbiokatalysator *E. coli* DB09 ($20 \text{ mg}_{(\text{BFM})} \text{ ml}^{-1}$) in einem 80 mM Zitronensäurepuffer (pH 6,0) und 0,3 mM NAD^+ /0,6 mM NADP^+ sowie 10 % Isopropanol. Nach 5 Stunden konnte 94 % UDCA nachgewiesen werden.

Aus Abbildung 81 ist ersichtlich, dass das Intermediat zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden konnte. Das liegt wahrscheinlich daran, dass in der Reaktion für die Reduktion der Gallensäure 7-KLCA die doppelte Konzentration an dem Cofaktor NADPH vorliegt und daher diese Reaktion bevorzugt wird. Nach 5 Stunden wurde eine Produktbildung von 94 % gemessen.

Die zweistufige Synthese von UDCA ausgehend von CDCA mittels Ganzzellbiokatalysator *E. coli* DB09 konnte nach Optimierung der Reaktionsparameter zu einem Umsatz von ≥ 99 % gebracht werden.

9.2. Synthese von UDCA aus CDCA in einem einstufigen Reaktionsprinzip

Alternativ zur vorab dargestellten Umsetzung von CDCA zu UDCA über zwei zwar simultan ablaufende, aber getrennte Reaktionswege, bei dem jeder einzelne eine eigene Coenzym-Regenerierung beinhaltet, wird in der Folge eine weitere Möglichkeit untersucht, bei der das CDCA ohne zusätzliche Cofaktorregenerierungsenzyme in UDCA überführt werden kann. Hierfür müssen beide beteiligten HSDHs denselben Coenzym-Typ nutzen. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 82 dargestellt. Der Vorteil dieser Route ist, dass deutlich weniger Kosten für die Herstellung der beteiligten Enzyme entstehen, da nur 2 statt 4 Enzyme beteiligt sind und weiterhin keine Co-Substrate für die Cofaktorregenerierungsenzyme benötigt werden.

Ergebnisse

Es wurden zwei Systeme etabliert, um die Vor- und Nachteile dieser zwei Varianten zu untersuchen. Ein wesentlicher Vorteil des Systems mit NADH als Cofaktor ist, dass die NAD⁺-abhängige 7 α -HSDH aus *E. coli* leicht zugänglich ist. Da es sich bei einer Expression des rekombinanten Enzyms um eine homologe Expression handelt, ist grundsätzlich eine hohe Überexpression zu erwarten. Die biochemische Charakterisierung zeigt zudem, dass das Enzym eine sehr gute Aktivität aufweist. Weiterhin stellt das NADH oder besser noch das NAD⁺ einen geringeren Kostenfaktor als NADPH dar und diese Coenzym-Variante ist zudem deutlich stabiler. Ein Nachteil dieser Route ist allerdings, dass die eingesetzte NAD⁺-abhängige Mutante der 7 β -HSDH eine relativ niedrige Aktivität aufweist.

Die andere Variante (Abbildung 82 Bild **B**) basiert auf NADPH-abhängigen Enzymen. Ein Vorteil dieser Variante ist, dass man den Wildtyp bzw. die vorab beschriebenen verbesserten Varianten der 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* einsetzen kann. Ein Nachteil ist, dass es noch keine verfügbare rekombinante 7 α -HSDH gibt, die NADPH als Coenzym benötigt. Eine Methode zur Gewinnung einer NADP⁺-abhängigen 7 α -HSDH wird in Kapitel 5.4. beschrieben. Hier wurde ein *in silico*-Screening durchgeführt, um eine neuartige NADP⁺-abhängige 7 α -HSDH zu gewinnen. Die zweite Methode zur Gewinnung einer NADP⁺-abhängigen 7 α -HSDH besteht darin, die Cofaktorabhängigkeit der 7 α -HSDH aus *E. coli* von NADH mittels *Protein engineering* auf NADPH zu ändern. Diese Methode wurde in Kapitel 5.3.2. beschrieben.

Ergebnisse

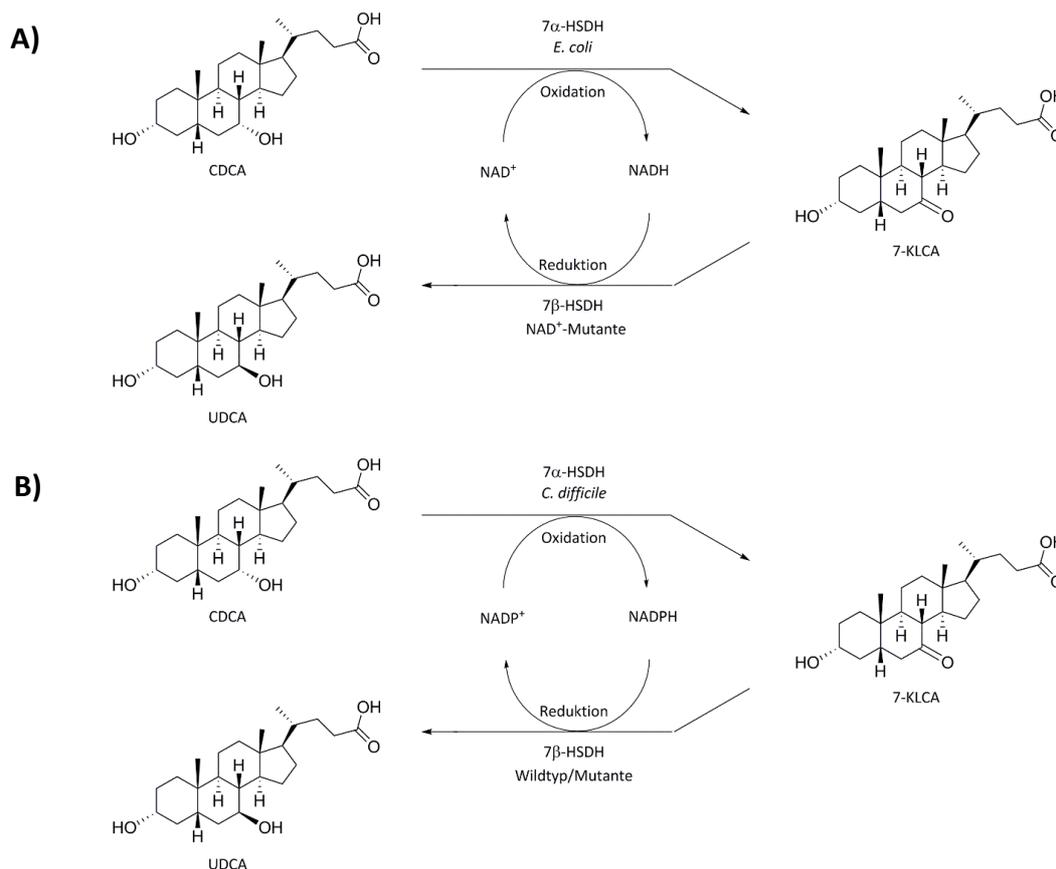


Abb. 82: Reaktionsschema der Biotransformation von CDCA zu UDCA in einem einstufigen Prozess. Hierfür müssen beide Enzyme denselben Cofaktor akzeptieren. In Bild A ist die Variante mit NAD(H) als Coenzym und Bild B die Variante mit NADP(H) als Coenzym dargestellt.

9.2.1. Einstufige Synthese von UDCA aus CDCA mittels isolierten Enzymen

Die Synthese der Gallensäure UDCA mit isolierten Enzymen erfolgte standardmäßig in 100 mM KPi-Puffer (pH 7,0) bei 25 °C. Die Reaktionsansätze wurden mittels Rührfische auf einem Multirührer bei 500 bis 700 rpm durchmischt. Die Cofaktorkonzentration betrug 0,25 mM NAD⁺. Die Ansätze enthielten für die Biotransformationen mit NAD⁺ als Cofaktor jeweils 1 U ml⁻¹ Enzym und für die Biotransformationen mit NADP⁺ als Cofaktor je 0,5 U ml⁻¹ 7α-HSDH bzw. 1,0 U ml⁻¹ 7β-HSDH. Die Enzymaktivitäten wurden jeweils mit dem hier verwendeten Substrat bestimmt, also die Aktivität der 7β-HSDH mit NADP⁺ und 7-KLCA. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben genommen und mittels HPLC untersucht.

Ergebnisse

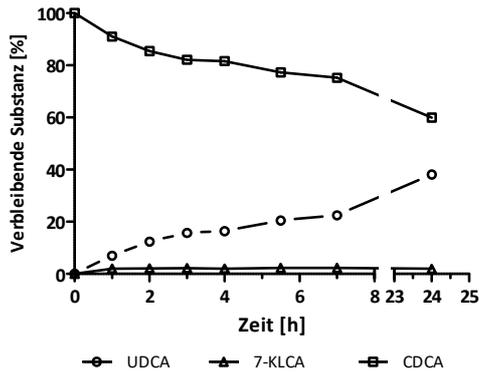


Abb. 83: Umsetzung von 25 mM CDCA in 100 mM KPi-Puffer pH 7,0 bei 25 °C mit der NAD⁺-abhängigen 7β-HSDH [G39E] und der 7α-HSDH aus *E. coli* im einstufigen Prozess. Die Cofaktorkonzentration betrug 0,25 mM NAD⁺. Nach 24 h Reaktionszeit konnte ein Umsatz von ca. 38 % detektiert werden.

Die einstufige Umsetzung der CDCA in Form der direkten Kopplung von Oxidation und Reduktion mit einer NAD⁺-abhängigen 7β-HSDH funktioniert, es wurde allerdings noch kein vollständiger Umsatz erreicht, sondern man erreichte nach 24 Stunden einen Umsatz von ca. 38 % (siehe Abbildung 83). Die NAD⁺-Mutante wurde nicht näher charakterisiert, aber es ist zu vermuten, dass, bedingt möglicherweise durch einen ungünstigen K_M -Wert für die Reduktionsreaktion, die Gleichgewichtslage für die Gesamtreaktion ungünstig ist, d.h. zu einem Gleichgewicht von Oxidation und Reduktion mit unvollständigem Gesamtumsatz führt.

Aufgrund der unbefriedigenden Umsetzung mit NAD(H) als Cofaktor wurden Biotransformation mit dem Cofaktor NADP(H) in dem einstufigen Prozess durchgeführt. Für die Oxidation wurde die NAD⁺-abhängige 7β-HSDH Mutante aus *C. aerofaciens* eingesetzt und für die Reduktion von 7-KLCA die 7α-HSDH aus *E. coli*.

Nachfolgend ist die Umsetzung mit NADP⁺-abhängigen Enzymen gezeigt.

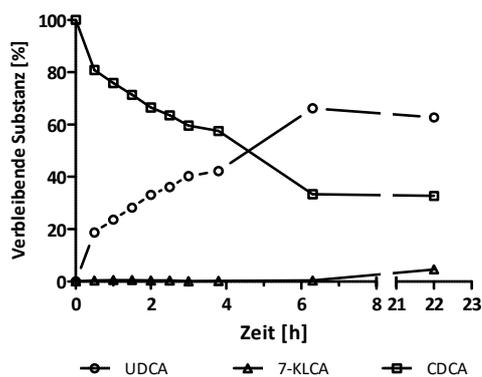


Abb. 84: Umsetzung von 10 mM CDCA in 100 mM KPi-Puffer pH 6,0 bei 25 °C mit der 7β-HSDH [G39S/R64E] und der Cd7α-HSDH aus *C. difficile* im einstufigen Prozess. Die Cofaktorkonzentration betrug 0,5 mM NADP⁺. Nach 22 h Reaktionszeit konnte ein Umsatz von ca. 63 % detektiert werden.

Wie die Abbildung 84 zeigt, erreicht man in diesem NADP⁺-abhängigen Prozess zwar einen deutlich höheren Umsatz als im NAD⁺-abhängigen, allerdings konnten nur ca. 63 % an UDCA gebildet werden. Das Intermediat 7-KLCA akkumuliert bis zur 6. Stunde mit ca. 0,5 % kaum nachweisbar, danach steigt die Konzentration bis zur 22. Stunde um das 10-fache an (ca. 4,7 %), nachdem die Hauptreaktion, also

Ergebnisse

die Umsetzung von CDCA zu 7-KLCA direkt zu UDCA, sichtlich beendet ist. Bis zur 6. Stunde verläuft die Reaktion mit einem stetigen Zuwachs an UDCA bei gleichbleibendem „Abbau“ an CDCA. Nach der 6. Stunde kann man anhand der Abbildung erkennen, dass sich ein Gleichgewicht der Reaktion eingestellt hat. Anhand der Literatur (Pedrini et al., 2006) ist bekannt, dass die Epimerisierung der C₇ Position max. zu 76 % an UDCA verläuft. Das Ergebnis ist konform mit den hier vorgestellten Ergebnissen. Die maximale Bildung an UDCA, die detektiert werden konnte, betrug ca. 63 %. Pedrini et al. konnten die Ausbeute an UDCA durch Zugabe von 2-Hexanol auf 82 % erhöhen. Die Zugabe bewirkt die Oxidation des Alkohols mit gleichzeitiger Reduktion des Cofaktors, so dass hier das Gleichgewicht verschoben und die Reaktion von 7-KLCA zu UDCA weiter ablaufen kann.

Es konnte ein einstufiges System zur Biotransformation ausgehend von CDCA zu UDCA etabliert werden. Hier zeigte sich, dass die Umsetzung bei Verwendung von NAD⁺-abhängigen Enzymen sehr langsam war und vermutlich auch bei längerer Reaktionszeit zu keinem vollständigen Umsatz führen wird. Die Umsetzung mit NADP⁺ als Cofaktor führt bei niedriger Konzentration an CDCA zu einer 63 %igen Umsetzung.

9.2.2. Einstufige Synthese von UDCA aus CDCA mittels Ganzzellbiokatalysator

Für die Epimerisierung der Chenodesoxycholsäure mit ganzen Zellen wurden mittels Standard-Klonierungstechniken diverse Plasmide erzeugt, die die Gene für die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (7 α - und 7 β -HSDH) auf zwei verschiedenen Plasmiden besitzen, um einen geeigneten Ganzzellbiokatalysator erstellen zu können. Weiterhin wurden die Gene mittels QuikChange™-PCR so verändert, dass sowohl die 7 β -HSDH eine gesteigerte Aktivität besitzt (siehe Kapitel 5.1.2.4.) als auch mit der 7 α -HSDH aus *E. coli* eine NADP⁺-abhängige Variante (siehe Kapitel 5.3.2.) benutzt werden kann. Die Plasmide sahen wie folgt aus:

- pA_7 β -HSDH [G39S/R64E]: In das Plasmid pACYCDuet wurde das Gen der 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* über die Schnittstellen *Nde*I/*Xho*I kloniert. Das Protein verfügt über keinen His-Tag. Mittels QuikChange™-PCR wurden die Mutationen G39S und R64E in das Gen der 7 β -HSDH eingefügt.

Ergebnisse

- pET28a_Cd7 α -HSDH(N): In das Plasmid pET28a wurde das Gen der 7 α -HSDH aus *C. difficile* über die Schnittstellen *Nde*I/*Xho*I kloniert. Das Protein verfügt über einen N-terminalen His-Tag.
- pET28a_7 α -HSDH(N) [D42G/I43R]: In das Plasmid pET28a wurde das Gen der 7 α -HSDH aus *E. coli* über die Schnittstellen *Nde*I/*Xho*I kloniert. Das Protein verfügt über einen N-terminalen His-Tag. Mittels QuikChange™-PCR wurden die Mutationen D42G/I43R in das Gen der 7 β -HSDH eingefügt.

Das Gen der 7 β -HSDH wurde auf das *low-copy* Plasmid pACYCDuet kloniert, welches einen anderen „Origin of replication“ als das Plasmid pET28a besitzt, in das die Gene der 7 α -HSDH aus *E. coli* und *C. difficile* kloniert sind, daher sind beide Plasmide in einer *E. coli*-Zelle verwendbar.

Die Synthese der Gallensäure UDCA mit 5 mg_(BFM) ml⁻¹ Zellen erfolgte standardmäßig in 100 mM KPi-Puffer (pH 6,0) bei 25 °C. Die Reaktionsansätze wurden mittels Rührfische auf einem Multirührer bei 700 rpm durchmischt. Die Ansätze enthielten jeweils 0,5 mM NADP⁺ als Cofaktor. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben genommen und mittels HPLC untersucht. Als *designer cells* wurden die Ganzzellbiokatalysatoren *E. coli* DB06 (pET28a_Cd7 α -HSDH(N) + pA_7 β -HSDH [G39S/R64E]) und *E. coli* DB07 (pET28a_7 α -HSDH(N) [D42G/I43R] + pA_7 β -HSDH [G39S/R64E]) verwendet (siehe Abschnitt 3.1.1.). Die Zellen wurden vor dem Einsatz mindestens einmal eingefroren, um die Zellen zu permeabilisieren.

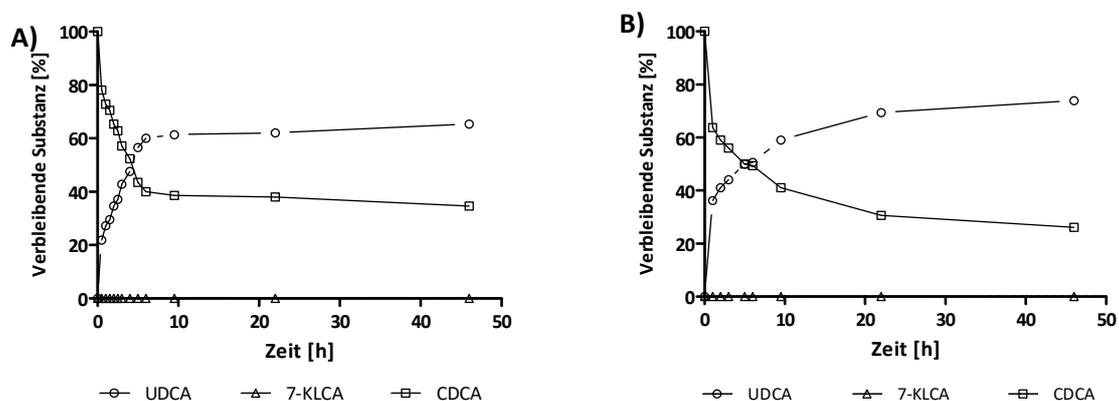


Abb. 85: Umsetzung von 25 mM CDCA in 100 mM KPi-Puffer pH 6,0 bei 25 °C mit dem Ganzzellbiokatalysator *E. coli* DB06 (Bild A) und *E. coli* DB07 (Bild B) im einstufigen Prozess. Die Cofaktorkonzentration betrug 0,5 mM NADP⁺ und die Reaktionszeit 48 Stunden.

Aus der Abbildung 85 (Bild A) geht hervor, dass nach 1 Stunde etwas über 25 % UDCA nachgewiesen werden konnten. Die Reaktion verläuft ab Start der Reaktion bis zur 6. Stunde stetig, stoppt dann sichtlich abrupt ab bei ca. 63 %. Die Reaktion wurde noch weitere 42 Stunden weitergeführt, aber es konnte nur noch ein marginaler Zuwachs an UDCA gemessen werden.

Ergebnisse

In Abbildung 85, Bild **B** kann man erkennen, dass mit dem Ganzzellbiokatalysator *E. coli* DB07 ebenfalls kein vollständiger Umsatz erzielt werden konnte. Der Anstieg der gebildeten UDCA ist wie bei dem Ganzzellbiokatalysator DB07 stetig, aber bedeutend langsamer. Allerdings konnte nach 48 Stunden eine UDCA-Konzentration von 74 % nachgewiesen werden. Dieser 10 % höhere Umsatz und die langsamere Umsetzungsrate gegenüber dem anderen Ganzzellbiokatalysator könnte seine Ursache in der verwendeten NADP⁺-abhängigen 7 α -HSDH Mutante aus *E. coli* beruhen. Die eingesetzte 7 α -HSDH Mutante aus *E. coli* wurde entweder schlechter coexprimiert oder zeigt eine schwächere Aktivität durch die inhibitorischen Effekte, die von den Gallensäuren ausgeht. Ein weiterer Grund könnte auch die geringere Aktivität der eingesetzten 7 β -HSDH sein, die durch die Coexpression verursacht ist.

Weiterhin fällt bei beiden Reaktionen auf, dass das Intermediat 7-KLCA nicht gebildet wird. Es wird zwar in der Analyse mittels HPLC detektiert, aber die Konzentrationen bewegen sich im Promillebereich.

Die einstufige Synthese von UDCA ausgehend von CDCA mittels Ganzzellbiokatalysator führte mit *E. coli* DB06 zu einem Umsatz von 74 %. Der Umsatz gegenüber der einstufigen Biotransformation mit isolierten Enzymen konnte um 10 % gesteigert werden.

Die enzymatische Synthese von UDCA ausgehend von CDCA zeigte, dass bei Verwendung eines Ganzzellbiokatalysators und dem zweistufigen Reaktionsprinzip ein vollständiger Umsatz erreicht werden kann.

9.3. Chemoenzymatische Synthese von UDCA ausgehend von CDCA

Bisher wurde die Möglichkeit untersucht, UDCA direkt aus CDCA durch Epimerisierung der Hydroxylgruppe an C₇ zu gewinnen. Die Synthesen wurden als Eintopf-Synthesen durchgeführt, in denen entweder mit zusätzlichen (zweistufige Synthese) oder auch ohne zusätzliche Cofaktorregenerierungsenzyme (einstufige Synthese) gearbeitet wurde. Beim zweistufigen Verfahren konnte eine vollständige Umsetzung des CDCA zu UDCA erreicht werden, beim einstufigen dagegen blieb die Reaktion bei 63-74% Umsatz an UDCA stehen.

Eine weitere Möglichkeit UDCA aus CDCA zu erhalten, ist eine chemoenzymatische Synthese, die sich an der Umwandlung von DHCA zu 12-Keto-UDCA orientiert. Im ersten Schritt wird CDCA chemisch zu 3,7-Diketo-UDCA oxidiert. Diese Zwischenverbindung besitzt genau wie DHCA nur noch Ketogruppen, die von den Hydroxysteroid-Dehydrogenasen 3 α - und 7 β -HSDH regio- und stereoselektiv reduziert werden. In Abbildung 86 ist ein Schema dargestellt, wie dieser chemoenzymatische Prozess aussieht.

Ergebnisse

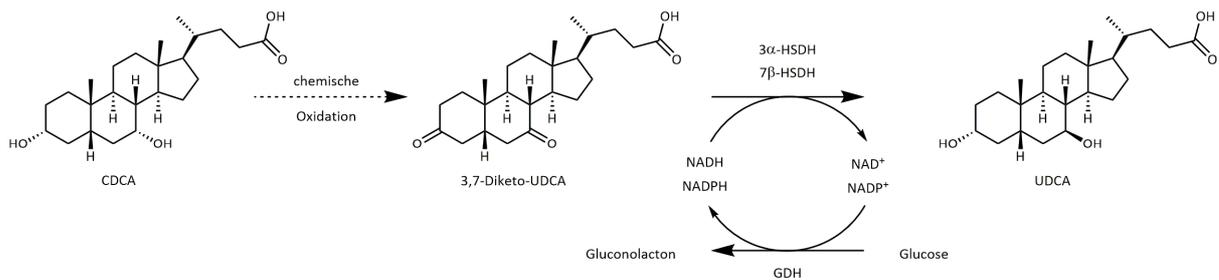


Abb. 86: Chemoenzymatische Synthese von CDCA zu UDCA. Im ersten Schritt wird CDCA chemisch (gestrichelte Linie) zu 3,7-Diketo-UDCA oxidiert, diese Verbindung wird dann regio- und stereoselektiv mit Hydroxysteroid-Dehydrogenasen zu UDCA reduziert (durchgezogene Linien). Zur Cofaktorregenerierung wird eine Glucose-Dehydrogenase eingesetzt, die Glucose zu Gluconolacton oxidiert und dabei die Nicotinamid-Cofaktoren reduziert.

Ein Vorteil der chemoenzymatischen Synthese ist es, dass am Ende direkt das aktive pharmazeutische Substrat (API) heraus kommt. Ein weiterer Vorteil ist es, dass die eingesetzten Enzyme bereits in der Synthese von 12-Keto-UDCA ausgehend von DHCA (siehe Kapitel 7) entwickelt wurden. Damit muss auch der gesamte Prozess mit der Prozessführung nicht mehr neu entwickelt werden. So kann mittels der drei Enzyme GDH, 3 α - und 7 β -HSDH unabhängig vom Substrat (DHCA oder eben 3,7-Diketo-UDCA) die Synthese von 12-Keto-UDCA bzw. UDCA durchgeführt werden.

9.3.1. SWERN-Oxidation von CDCA

In einem 1 L Dreihalskolben wurde Oxalylchlorid (70 mmol; 6,02 ml) in ca. 50 ml CH₂Cl₂ gelöst und mit einem Aceton/Trockeneis-Bad auf -78 °C gekühlt. Über einen Tropftrichter wurde binnen 5 min eine Lösung von Dimethylsulfoxid (130 mmol; 9,24 ml) in 15 ml CH₂Cl₂ zugetropft. Eine Lösung von Chenodesoxycholsäure (CDCA) (30 mmol; 11,78 g) in einem Gemisch aus CH₂Cl₂/DMSO (insg. 30 ml [ca. 15 ml DMSO, Rest CH₂Cl₂]) wurde über einen weiteren Tropftrichter binnen 5 min zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 15 min. gerührt, anschließend wird mit Triethylamin (150 mmol; 21 ml 42 ml) versetzt, weitere 5 min gerührt und das Kältebad entfernt. Zu der auf RT erwärmten Reaktionsmischung wurden 180 ml dest. H₂O gegeben und min 5 gerührt. Anschließend wurden wässrige und organische Phase getrennt und die wässrige Phase mit 200 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden sukzessive mit je 250 ml 0,5 M HCl und dest. H₂O gewaschen, über NaSO₄ getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von ca. 46 % und einer Reinheit von ca. 90 % gewonnen werden. Die Reinheit wurde mittels HPLC ermittelt.

Ergebnisse

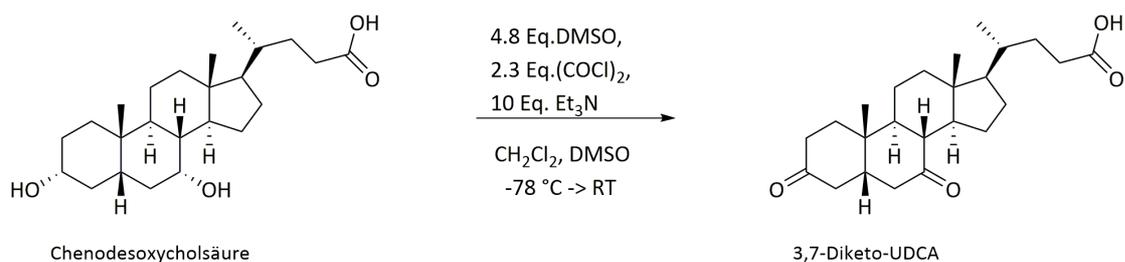


Abb. 87: Reaktionsschema der chemischen Oxidation von CDCA mittels SWERN-Vorschrift.

9.3.2. Chemische Oxidation mittels Natriumhypochlorit

Die Chenodesoxycholsäure (10 g, 24,5 mmol) wurde in einem 500 ml Dreihalskolben in Essigsäure (110 ml) bei 18°C gelöst. Zur daraus resultierenden braunen Lösung wurde innerhalb von 40 min Hypochlorit (35 ml, 2,66 Eq, 65,2 mmol) über einen Tropftrichter zugesetzt. Dabei wurde die Temperatur bei $7 - 15^\circ\text{C}$ gehalten. Die milchige Suspension wurde anschließend weitere drei Stunden unter Kühlung gerührt. Zur Neutralisation des überschüssigen Hypochlorits wurde Natriumbisulfit-Lösung (20,4 mmol, 35 ml) dazu getropft. Die Temperatur wurde dabei wieder konstant bei 15°C gehalten. Es wurde weitere 45 min gerührt, dabei wurde die zunächst klare Lösung wieder leicht milchig. Nach Zugabe von H_2O (160 ml) wurde eine milchige Suspension erhalten. Diese milchige Suspension wurde für 45 min. auf 70°C erhitzt, anschließend wurde innerhalb einer Stunde auf 20°C runtergekühlt. Das Produkt wurde mittels einer Saugflasche filtriert und mit 600 ml Wasser gewaschen, bis kein Essigsäure-Geruch mehr zu vernehmen war. Das Produkt wurde über mehrere Tage im Exsikkator und zuletzt an der Schlenkline getrocknet. Es konnte mit einer Ausbeute von ca. 79,7% Ausbeute und einer Reinheit von 98,6 % erhalten. Die Reinheit wurde mittels HPLC ermittelt.

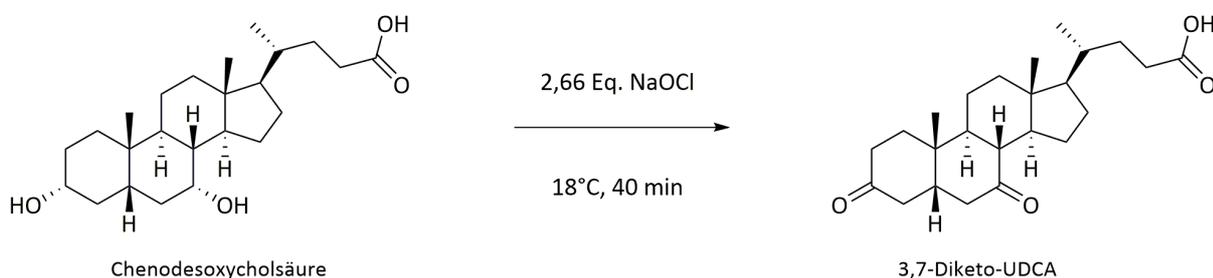


Abb. 88: Reaktionsschema der chemischen Oxidation von CDCA mit Na-hypochlorit.

Ergebnisse

9.3.3. Kinetische Charakterisierung der Hydroxysteroid-Dehydrogenasen

Um die enzymkinetischen Parameter der 3α - als auch 7β -HSDH mit den Gallensäuren 3,7-Diketo-UDCA, 3-Keto-UDCA und 7-KLCA zu bestimmen, wurden die Gene der beiden HSDHs unter Verwendung der Plasmide pET28a_3 α -HSDH(N) (Variante mit N-terminalem 6xHis-Tag His-Tag) und pET28a_7 β -HSDH(C) (Variante mit C-terminalem 6xHis-Tag) in *E. coli* BL21(DE3) Δ 7 α -HSDH exprimiert. Der Rohextrakt der aufgeschlossenen Zellen wurde mittels Ni-NTA aufgereinigt und in Messungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zwischen 10 μ M und 10 mM für 3,7-Diketo-UDCA bei konstant 0,2 mM NAD(P)H durchgeführt. Die Analysen der Zwischenverbindungen 7-KLCA für die 7β -HSDH bzw. 3-Keto-UDCA für die 3α -HSDH wurden ebenfalls zwischen 10 μ M und 10 mM bei konstant 0,2 mM NAD(P)H durchgeführt. Für die Bestimmung der Konstanten für den Cofaktor wurde die Konzentration an 3,7-Diketo-UDCA konstant bei 0,1 mM (3α -HSDH) bzw. 10 mM (7β -HSDH) gehalten und die NAD(P)H-Konzentration zwischen 10 μ M und 0,3 mM untersucht. In den Abbildung 89 und 90 sind die Verlaufsdiagramme und in Tabelle 44 die Werte für die beiden HSDHs dargestellt.

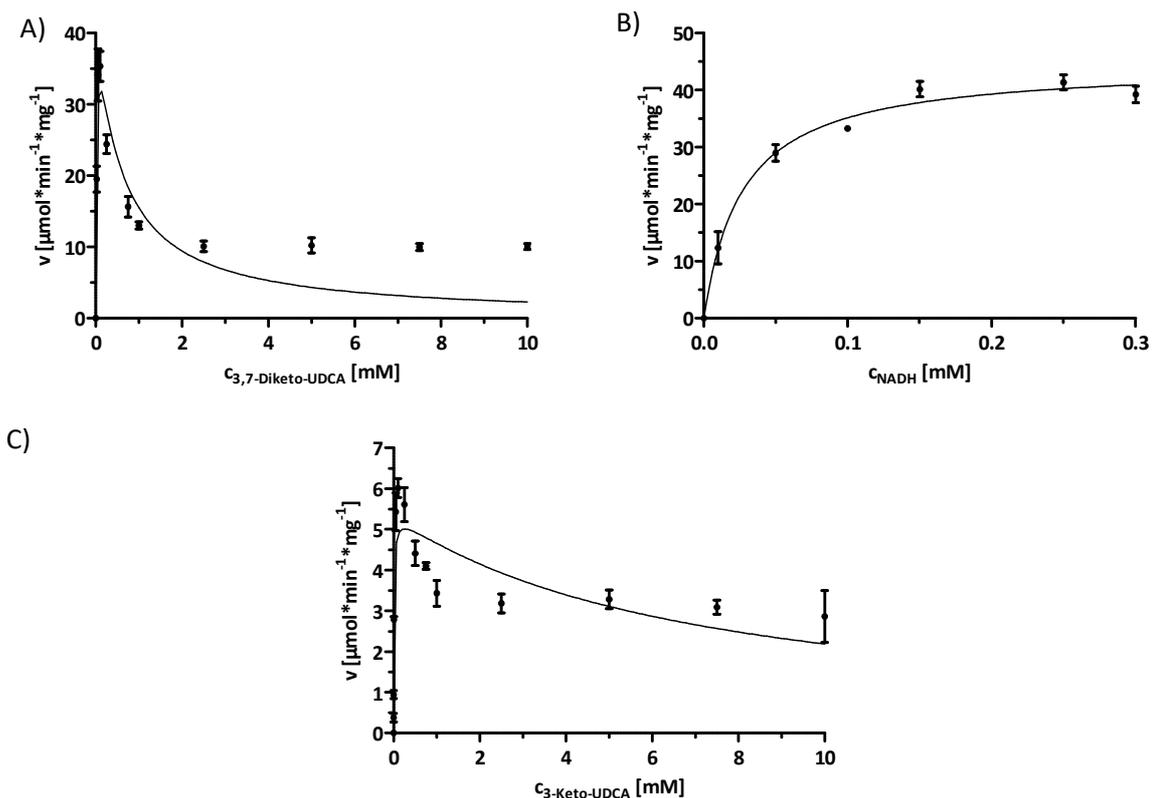


Abb. 89: Michaelis-Menten-Kinetik der 3α -HSDH für das Substrat 3,7-Diketo-UDCA (Bild A), für den Cofaktor NADH (Bild B) sowie für die Zwischenverbindung 3-Keto-UDCA (Bild C). Der Konzentrationsbereich für 3,7-Diketo-UDCA bzw. 3-Keto-UDCA ist zwischen 10 μ M und 10 mM dargestellt. Für das Coenzym NADH betrug der Konzentrationsbereich 10 bis 300 μ M. Das Enzym wurde über einen N-terminalen Hexahistidin-Rest aufgereinigt und eingesetzt.

Ergebnisse

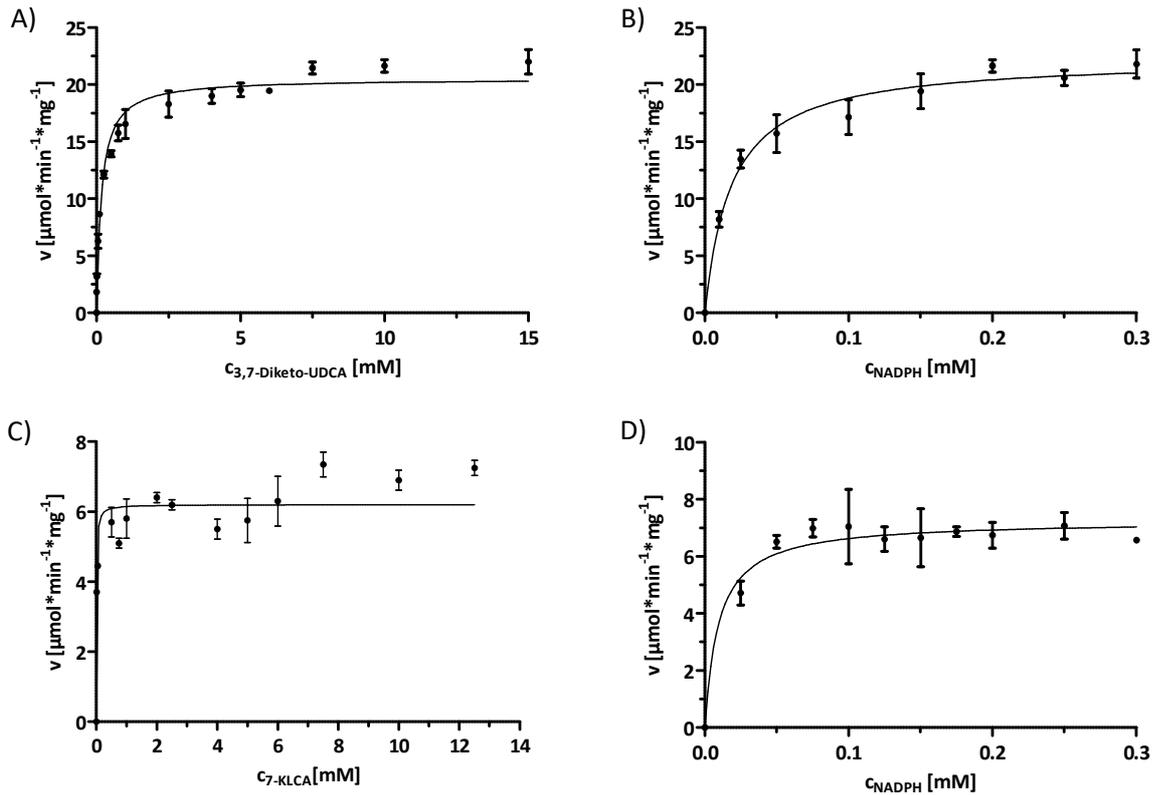


Abb. 90: Michaelis-Menten-Kinetik der 7β-HSDH für das Substrat 3,7-Diketo-UDCA (Bild A), für den Cofaktor NADPH (Bild B mit 3,7-Diketo-UDCA; Bild D mit 7-KLCA) sowie für die Zwischenverbindung 7-KLCA (Bild C). Der Konzentrationsbereich für 3,7-Diketo-UDCA ist zwischen 10 μM und 15 mM bzw. 7-KLCA ist zwischen 10 μM und 10 mM dargestellt. Für das Coenzym NADPH betrug der Konzentrationsbereich 10 bis 300 μM . Das Enzym wurde über einen C-terminalen Hexahistidin-Rest aufgereinigt und eingesetzt.

Ergebnisse

Tabelle 44: Kinetische Konstanten der 3 α - und 7 β -HSDH für das Substrat 3,7-Diketo-UDCA sowie 3-Keto-UDCA bzw. 7-KLCA als auch den zugehörigen Cofaktor. Variiert wurde jeweils die Verbindung, die in der Spalte „Substrat“ aufgeführt ist. In der Spalte Cosubstrat betrug die Konzentration an NAD(P)H 0,2 mM und an 3,7-Diketo-UDCA 0,1 mM (3 α -HSDH) bzw. 10 mM (7 β -HSDH). X = keine Inhibierung.

Enzym	Substrat	Cosubstrat	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	K_I [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]
3 α -HSDH	3,7-Diketo-UDCA	NADH	44,7 \pm 7,6	20,9 \pm 11,1	0,5 \pm 0,2	21,3 \pm 3,6	1019 \pm 238
	3-Keto-UDCA	NADH	5,4 \pm 0,3	9,5 \pm 2,5	6,8 \pm 1,6	2,6 \pm 0,1	269 \pm 46
	NADH	3,7-Diketo-UDCA	44,6 \pm 1,0	26,8 \pm 3,0	x	21,2 \pm 0,5	816 \pm 68
7 β -HSDH	3,7-Diketo-UDCA	NADPH	20,6 \pm 0,3	166,4 \pm 15,8	x	10,2 \pm 0,2	61,3 \pm 1
	7-KLCA	NADPH	6,2 \pm 0,2	9,4 \pm 2,8	x	3,1 \pm 0,1	32,9 \pm 0,2
	NADPH	7-KLCA	7,3 \pm 0,2	9,5 \pm 2,6		3,6 \pm 0,1	380 \pm 72
	NADPH	3,7-Diketo-UDCA	22,3 \pm 0,5	18,6 \pm 2,1	x	11,1 \pm 0,2	598 \pm 49

Aus Tabelle 44 kann man erkennen, dass nur die 3 α -HSDH mit dem Diketon 3,7-Diketo-UDCA als auch dem Monoketon 3-Keto-UDCA eine Substratinhibierung aufweist, wobei die Inhibierung für das Monoketon weniger ausgeprägt ist. Weiterhin ist auffällig, dass die 7 β -HSDH keine Inhibierung aufweist. Allerdings zeigt sich bei Betrachtung der spezifischen und der katalytischen Aktivität, dass die 3 α -HSDH eine 16-fach höhere katalytische und eine doppelt so hohe Aktivität für das Diketon aufweist. Diese Ergebnisse waren nicht zu erwarten, da die 3 α -HSDH für die Verbindungen 3,7-Diketo-UDCA und 3-Keto-UDCA eine Substratinhibierung besitzt.

9.3.4. Enzymatische Synthese von UDCA ausgehend von 3,7-Diketo-UDCA

Die enzymatische Synthese von UDCA erfolgte in Versuchen mit 10, 20 und 40 mM Substrat in TRIS-HCl Puffer (pH 8,5). Die Cofaktorkonzentration bei allen Versuchen betrug 0,2 mM NADP⁺ als auch NAD⁺. Die eingesetzten Enzyme wurden in Form von Rohextrakt oder als Ganzzellbiokatalysator der Reaktion hinzugefügt. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben genommen und mittels HPLC untersucht.

Ergebnisse

9.3.4.1. Mit isolierten Enzymen

Die eingesetzte Enzymkonzentration für die 3 α -HSDH sowie 7 β -HSDH betrug 0,1 mg Protein und für die GDH wurde eine Konzentration von ca. 1 mg eingesetzt. Die Glucosekonzentration wurde im Verhältnis zum Substrat immer 1:4 eingesetzt. Nach 18 oder 24 Stunden wurde die Reaktion auf einen pH-Wert von ca. 2 angesäuert und eine HPLC-Probe abgenommen.

Zuerst wurden Umsetzungen bei verschiedenen pH-Werten (von 7,5 bis 9,0) durchgeführt. Nach 16 Stunden wurde die Reaktion gestoppt und mittels HPLC der Umsatz bestimmt. In Abbildung 91 ist die Umsatzrate der verschiedenen Reaktionen dargestellt.

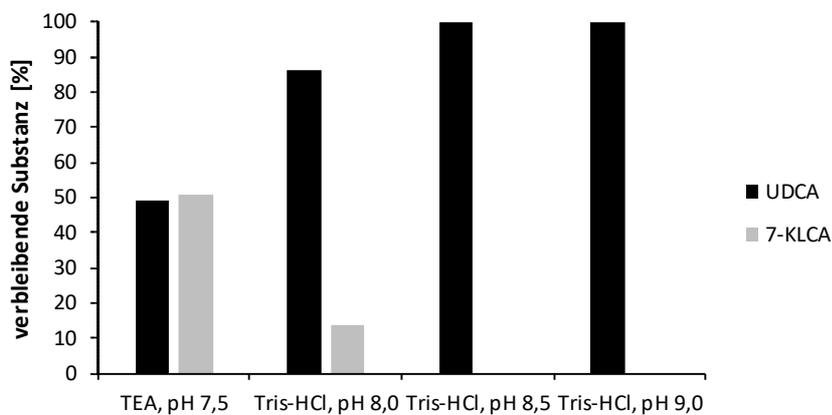


Abb. 91: Biotransformation von 10 mM 3,7-Diketo-UDCA zu UDCA nach 16 Stunden bei verschiedenen pH-Werten. Die Pufferkonzentration betrug jeweils 100 mM.

Aus Abbildung 91 geht hervor, dass die Reaktion stark pH-Wert abhängig ist und ein höherer alkalischer pH-Wert eine vollständige Umsetzung begünstigt. Bei einem pH-Wert von 7,5 konnte ein geringer Umsatz von ca. 51 %, bei einem pH-Wert von 8,5 oder 9,0 dagegen ein vollständiger Umsatz gemessen werden.

9.3.4.2. Mittels Ganzzellbiokatalysatoren

Für die Ganzzellsynthesen wurden die beiden GZK *E. coli* DB02 als auch *E. coli* DB03 benutzt, da diese beiden sich in der Synthese von 12-Keto-UDCA aus DHCA bewährt haben. Die eingesetzten Ganzzellbiokatalysatoren wurden vor der ersten Benutzung mindestens einmal eingefroren, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Für die enzymatische Synthese wurden zwei Puffer mit verschiedenen pH-Werten gewählt. Zum einen wurde ein Zitronensäurepuffer mit einem pH-Wert von 6 und ein KPi-Puffer mit einem pH-Wert von 7 gewählt. Die Glucosekonzentration wurde im Verhältnis zum Substrat ca. 1:4 eingesetzt. Die Reaktionen wurden an einem pH-Titrino durchgeführt, der den pH-Wert durch Zutropfen von 10 %iger NaOH-Lösung konstant hielt.

Ergebnisse

Der Ansatz sah wie folgt aus:

10 mg_(BFM) ml⁻¹ *E. coli* DB03; 40 mM 3,7-Diketo-UDCA; 0,25 mM NAD⁺ als auch NADP⁺; 200 mM Glucose in 25 mM Puffer (Zitronensäurepuffer, pH 6 in Bild A; KPi-Puffer, pH 7 in Bild B). Die Reaktion lief am pH-Titrino, wobei der pH-Wert durch Zugabe von 10%iger NaOH konstant bei 6,0 bzw. 7,0 gehalten wurde. Das Reaktionsvolumen betrug 10 ml. Es wurden über einen Zeitraum von bis zu 30 Stunden Proben genommen und mittels HPLC analysiert.

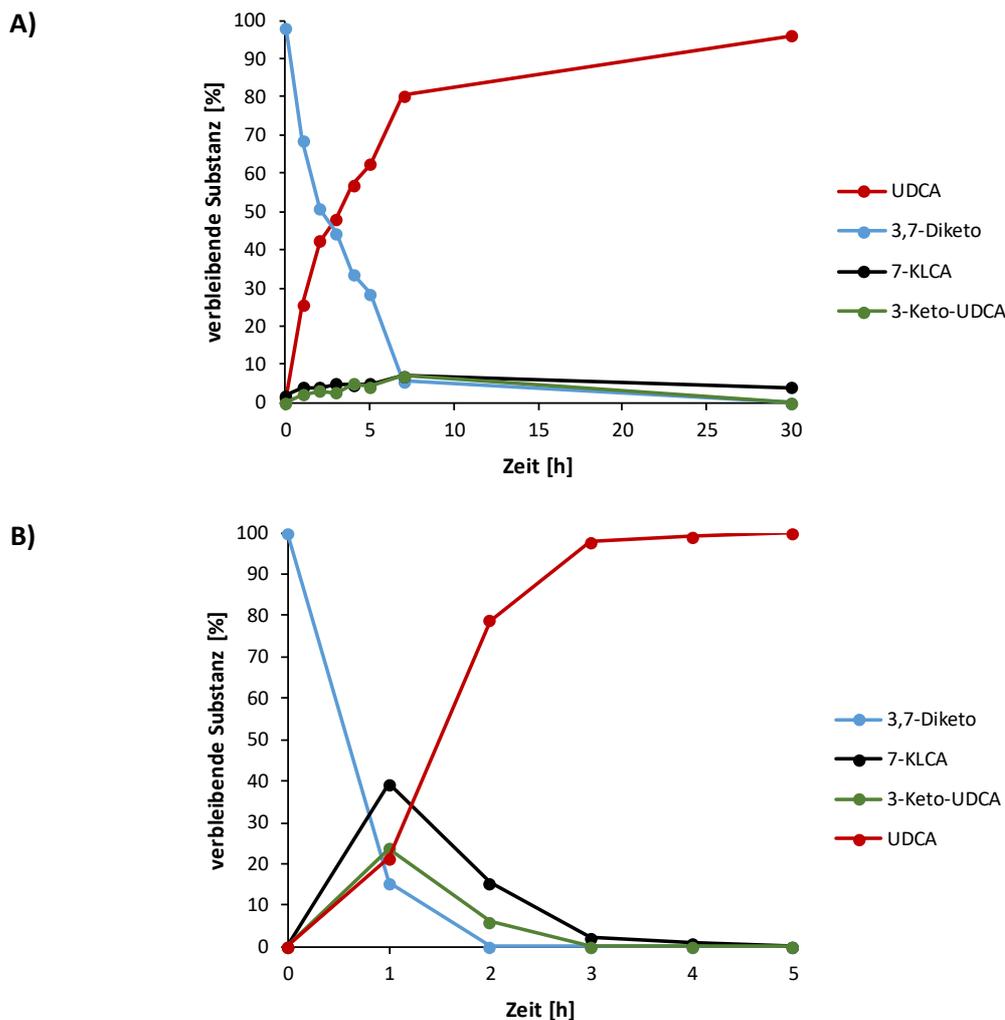


Abb. 92: Umsetzung von 40 mM 3,7-Diketo-UDCA in 25 mM Zitronensäurepuffer (pH 6,0; Bild A) bzw. 25 mM KPi-Puffer (pH 7,0; Bild B) bei 25 °C. Es wurden 10 mg_(BFM) ml⁻¹ *E. coli* DB03 als Ganzzellbiokatalysator eingesetzt.

Aus Bild 92 geht hervor, dass wie bei der enzymatischen zweistufigen Synthese von UDCA auch hier der pH-Wert einen hohen Einfluss hat. Das wird an der Reaktionszeit bei den verschiedenen pH-Werten ganz deutlich. Bei dem KPi-Puffer mit einem pH-Wert von 7 konnte nach 5 Stunden ein Umsatz von $\geq 99\%$ nachgewiesen werden, während im Zitronensäurepuffer mit einem pH-Wert von 6 nach 30 Stunden ein Umsatz von ca. 96 % detektiert werden konnte. Der Grund dafür, dass bei einem pH-Wert von 6 die Reaktion deutlich langsamer abläuft, ist vermutlich auf eine niedrigere Aktivität der

Ergebnisse

GDH zurück zu führen. Hierdurch wird die eigentliche (Haupt-)Reaktion, die Reduktion der Carbonylgruppen, durch eine unzureichende Regenerierungsreaktion verlangsamt.

Die chemoenzymatische Synthese von UDCA ausgehend von CDCA stellt eine attraktive alternative Route zur Herstellung von UDCA dar. Im ersten Schritt der chemischen Oxidation von CDCA konnte eine Ausbeute an 3,7-Diketo-UDCA von ca. 80 % erreicht werden, welches eine Reinheit von ca. 99 % besitzt. Ohne Aufarbeitung kann dieses direkt in die enzymatische Synthese eingesetzt werden, wobei hier eine Umsetzung von ≥ 99 % sowohl durch einen Ganzzellbiokatalysator als auch mit isolierten Enzymen in Form von Rohextrakt erzielt werden konnte.

IV. Diskussion

Den Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Entwicklung neuartiger Syntheserouten sowie die Optimierung bestehender Routen zur Biotransformation von Gallensäuren mit dem Ziel, das Produkt Ursodesoxycholsäure (UDCA) zu gewinnen. 12-Keto-UDCA, welches eine Vorstufe des Arzneistoffs UDCA darstellt, stellt eine Gallensäure dar, die eine vielfältige Anwendung als Pharmazeutikum findet (D'Agnolo et al., 2016; Roma et al., 2011; Ward et al., 1984). Der klassische Weg der chemischen Herstellung von UDCA verläuft über eine 7-stufige Synthese von Cholsäure, wobei jedoch die Ausbeuten mit 9 bis 14 % ziemlich gering sind (Kanazawa et al., 1954). Weiterhin benötigt dieser rein chemische Weg harsche Bedingungen sowie den Einsatz von problematischen Reagenzien wie Chrom in der Oxidationsstufe 6, das kanzerogen ist oder Hydrazin, welches explosionsgefährlich ist. Außerdem ist die Synthese mit ungewollten Nebenprodukten und mit umweltschädlichen Abfällen verbunden.

In Kombination einzelner chemischer Schritte mit enzymatischen Umsetzungen kann allerdings die Ausbeute beträchtlich erhöht werden, zudem kann die Bildung von Abfallprodukten weitgehend vermieden werden. Biokatalysatoren haben in den letzten Jahren in der Synthese von Arzneistoffen, Bulkchemikalien oder auch kommerziell interessanten Verbindungen beträchtlich an Bedeutung gewonnen und werden in einer Vielzahl von biotechnologischen Prozessen eingesetzt (Gröger and Asano, 2012).

In Abbildung 93 ist eine Übersicht aller Prozesse, die in dieser Dissertation bearbeitet wurden, dargestellt. Ausgangsverbindung ist entweder Cholsäure oder Chenodesoxycholsäure, insgesamt wurden 4 wesentliche Wege untersucht bzw. in dieser Arbeit entwickelt.

Diskussion

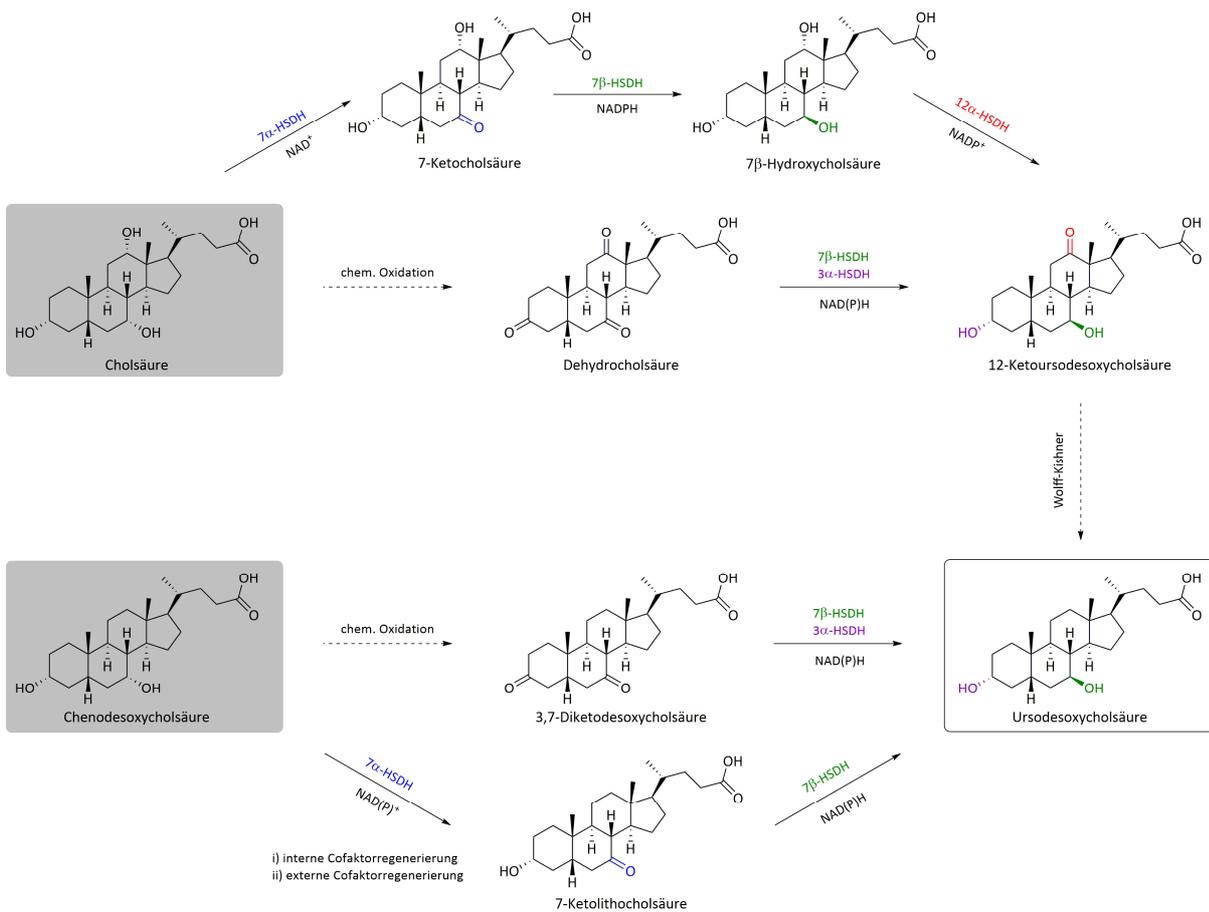


Abb. 93: Schema der entwickelten Syntheserouten zum Arzneistoff UDCA bzw. zur Vorstufe 12-Keto-UDCA. Die Ausgangsverbindungen sind grau unterlegt und das Produkt UDCA ist umrandet. Die enzymatischen Schritte sind mit einer durchgezogenen Linie und die chemischen Schritte mit einer unterbrochenen Linie markiert.

Im Folgenden werden die wichtigen Punkte wie die biochemischen Eigenschaften der Enzyme (Wildtyp als auch die erzeugten Mutanten) und das Anwendungspotential diskutiert. Weiterhin werden neue alternative Syntheserouten, die in dieser Arbeit etabliert wurden, auf ihr Anwendungspotential für die Synthese der Gallensäure UDCA bzw. die Vorstufe 12-Keto-UDCA untersucht.

10. Der „Enzym-Baukasten“ - Charakterisierung der Wildtypenzyme

In dieser Arbeit sind für die Entwicklung der verschiedenen Biotransformationswege mehrere Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDHs) eingesetzt worden. Die bekannten Enzyme aus *Comamonas testosteroni* (3α-HSDH), *Collinsella aerofaciens* (7β-HSDH), *E. coli* (7α-HSDH) sowie die neuartige 7α-HSDH aus *Clostridium difficile* konnten nach erfolgreicher Klonierung mit hoher Ausbeute rekombinant in *E. coli* BL21(DE3)Δ7α-HSDH als Expressionsstamm produziert und anschließend

Diskussion

biochemisch charakterisiert werden. Im Folgenden werden die biochemischen Eigenschaften der in dieser Arbeit beschriebenen HSDHs mit Literaturwerten verglichen und diskutiert.

10.1. NAD⁺-abhängige 3 α -HSDH aus *C. testosteroni*

Charakteristisch für das Wildtyp-Enzym ist, dass es zwar eine hohe Affinität zum Substrat DHCA aufweist und bereits bei ca. 1 mM maximale Aktivität erreicht, allerdings fällt die Aktivität bei weiterer Erhöhung von DHCA drastisch ab (siehe Kapitel 5.2.1., Abbildung 29, Bild A; Enzym ohne His-Tag). Schon bei ca. 2 mM werden offensichtlich nur ca. 50 % der Aktivität erreicht, ab ca. 3 mM dann nur noch ein Basis-Aktivitätslevel von 20 % Restaktivität, was anhand eines sehr kleinen K_I -Wert verdeutlicht wird. Eine ähnlich starke Substratinhibierung konnte auch mit dem Substrat 3,7-Diketo-UDCA festgestellt werden, der ermittelte K_I -Wert ist ähnlich niedrig. Für das Zwischenprodukt 3-Keto-UDCA, das im Verfahren der Umwandlung von 3,7-Diketo-UDCA zu UDCA gebildet wird, ist dagegen ein hoher K_I -Wert festgestellt worden, ähnlich dem Substrat 3,12-Diketo-UDCA. In Tabelle 45 sind die kinetischen Konstanten für die einzelnen Substrate dargestellt.

Tabelle 45: Kinetische Konstanten der 3 α -HSDH mit einem N-terminalen His-Tag. Als Cofaktorkonzentration wurde bei jeder Messung 0,2 mM NADH als Cosubstrat eingesetzt.

Substrat	Anzahl funktioneller Gruppen	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]
DHCA	3	98	^{b)} 50
^{a)} 3,12-Diketo-UDCA	3	^{b)} 130	^{b)} 60
3,7-Diketo-UDCA	2	44	21
3-Keto-UDCA	2	5,4	9,5

^{a)} gemessen mit aufgereinigter 3 α -HSDH ohne His-tag.

^{b)} Konstanten wurden aufgrund der starken Substratinhibierung aus dem Graphen ausgewertet.

Anhand der Tabelle 45 ist gut erkennbar, dass je höher die Anzahl an funktionellen Gruppen ist, desto höher ist auch die maximale Geschwindigkeit. Gegenläufig dagegen verhält sich die Affinität, sie erhöht sich mit steigender Zahl an funktionellen Gruppen. Neben der Anzahl an funktionellen Gruppen scheint es auch einen Einfluss der Stellung (axial oder equatorial) der Hydroxylgruppen sowohl auf die Aktivität als auch auf den K_M -Wert des Proteins zu geben. Am Beispiel der beiden Substrate 3,7-Diketo-UDCA und 3-Keto-UDCA scheint eine β -ständige Hydroxylgruppe an Position C₇ die Aktivität weiter abzusenken. Ob eine α -ständige Hydroxylgruppe einen ähnlichen Aktivitätsverlust verursachen würde, konnte nicht geklärt werden. Ebenfalls ungeklärt ist der Einfluß dieser Daten auf die biologische Funktion, warum also je nach Anzahl der funktionellen Gruppen eine derart andere Aktivität festgestellt werden kann.

Diskussion

Interessanterweise lässt sich in der Literatur wenig über eine Substratinhibierung bei HSDHs finden. Es wurden häufig Steroidhormone wie Androstendion, Testosteron oder Progesteron für die Reduktion sowie die entsprechenden Alkoholverbindungen der genannten Substrate biochemisch auf ihre kinetischen Konstanten hin untersucht, aber es wurde keine Inhibierung festgestellt (Oppermann and Maser, 1996). Lediglich Hwang et al. beschrieben eine kompetitive Hemmung der 3 α -HSDH gegenüber Androstendion (Hwang et al., 2013).

Hydroxysteroid-Dehydrogenasen akzeptieren in der Regel nur Steroidsubstrate und Derivate, die ähnlich aufgebaut sind, also Substanzen mit einem C₁₉- bis C₂₄-Grundgerüst (Maser et al., 2000; Skålhegg, 1974b). Die 3 α -HSDH dagegen ist eines der wenigen Enzyme aus dieser Gruppe, dass ein sehr breites Substratspektrum aufweist und Substrate mit einem deutlich kleineren Grundgerüst akzeptiert. So werden nicht-Steroide wie Aldehyde, Ketone und xenobiotische Verbindungen von der 3 α -HSDH in das entsprechende Produkt umgewandelt. In der Literatur konnten Substrate wie p-Nitrobenzaldehyd, p-Nitroacetophenon, Metyrapon (2-Methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanone) oder 2,3-Hexandion in die entsprechenden Alkohole überführt werden (Maser et al., 2000; Oppermann et al., 1993; Oppermann and Maser, 1996). Neben dieser 3 α -HSDH aus *C. testosteronei* ist nur noch ein weiteres Protein aus der Klasse der HSDHs bekannt, das nicht-steroidale Verbindungen als Substrate akzeptiert. Liu et al. konnten für die 7 α -HSDH aus *B. fragilis* zeigen, dass dieses Protein Benzaldehyd und Benzaldehyd-Derivate akzeptiert und teilweise gute Umsetzungen von bis zu 99 % erzielt wurden (Y. Liu et al., 2011).

Beim Vergleich der kinetischen Konstanten des nicht-getaggtten Proteins mit der C-terminal getaggtten Variante konnte ein deutlich anderes Verhalten festgestellt werden. Beim Fusionsprotein steigt die Aktivität mit zunehmender DHCA-Konzentration nicht ganz so stark an, d.h., die Affinität ist etwas niedriger. Dafür zeigt dieses Enzym aber auch nicht mehr die starke Substratüberschussinhibierung wie das Wildtyp-Enzym. Die C-terminal getaggtte Variante besitzt vermutlich andere biochemische Eigenschaften, da der His-Tag nahe der flexiblen Substratbindedomäne liegt und daher die Domäne beeinflusst. Der Einfluss des Tags auf biochemische Eigenschaften konnte in mehreren Experimenten gezeigt werden. Zum einen konnten durch Variation der Länge des His-Tags veränderte Konstanten ermittelt werden und zum anderen konnte gezeigt werden, dass darüber die Thermostabilität beeinflusst wird. Solche Einflüsse wurden nicht beobachtet, wenn sich ein His-Tag (6-fach) am N-Terminus befindet, dieses Enzym weist nahezu dieselben biochemischen Eigenschaften wie das Protein ohne His-Tag auf.

10.2. NAD⁺-abhängige 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens*

Wie die 3 α -HSDH zeigt auch die 7 β -HSDH eine Substratüberschussinhibierung mit dem Substrat DHCA. Allerdings ist diese bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei der 3 α -HSDH. Die Substratüberschußinhibierung ist anhand des K_I -Werts für DHCA belegbar, der mit ca. 80 mM sehr hoch ist. Für die anderen Substrate 7-KLCA oder auch 3,7-Diketo-UDCA konnten keine Substratinhibierungen anhand der kinetischen Untersuchung in definierten Konzentrationsbereichen festgestellt werden. Das könnte damit zusammenhängen, dass DHCA gegenüber den anderen getesteten Substraten eine Carbonylgruppe an Position C₁₂-Atom des Sterangerüst besitzt. Diese zusätzliche funktionelle Gruppe könnte die Passage zum aktiven Zentrum hin stören. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die maximale Geschwindigkeit der 7 β -HSDH bei Gallensäuren mit 3 funktionellen Gruppen höher ist gegenüber Verbindungen mit nur 2 solcher Gruppen. Der v_{\max} -Wert für DHCA beträgt 8,9 U mg⁻¹, der für 7-KLCA dagegen nur 1,1 U mg⁻¹. Ein weiterer Unterschied zur 3 α -HSDH zeigt sich bei den His-Tag-Varianten, die 7 β -HSDH kann ohne Verlust an spezifischer Aktivität sowie Veränderung der biochemischen Eigenschaften mit einem His-Tag am C-Terminus versehen werden.

10.3. NAD⁺-abhängige 7 α -HSDH aus *E. coli*

Die literaturbekannte 7 α -HSDH aus *E. coli* besitzt wie die 3 α -HSDH ebenfalls eine sehr ausgeprägte Substratinhibierung, wie in dieser Arbeit festgestellt werden konnte. Die spezifische Aktivität der 7 α -HSDH aus *E. coli* liegt bei ca. 2500 U mg⁻¹ und ist damit gegenüber den anderen in dieser Arbeit verwendeten HSDHs bedeutend aktiver. Das hängt vermutlich damit zusammen, dass *E. coli* ein Darmbakterium ist und eine essentielle Rolle bei der Biotransformationen der primären Gallensäuren wie Cholsäure oder Chenodesoxycholsäure spielt (Baron and Hylemon, 1997). Bei dieser hohen Aktivität spielt eine Inhibierung nur eine geringe Rolle, da die Restaktivität bei höheren Konzentrationen an Gallensäuren immer noch sehr hoch ist. Weiterhin zeigt auch die 7 α -HSDH einen Aktivitätsverlust durch das Anbringen eines His-Tags, sowohl am C- als auch am N-Terminus. Die Aktivität ist um den Faktor 10 geringer, während der K_M -Wert bei der Variante mit N-terminalem His-Tag unverändert und bei der Variante mit C-terminalem His-Tag um den Faktor 10 geringer ist. Vermutlich beeinflusst der C-terminale His-Tag die flexible Substratbindedomäne, die wie bei der 3 α -HSDH im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert ist.

10.4. NADP⁺-abhängige 7 α -HSDH aus *C. difficile*

Die in dieser Arbeit neu entdeckte NADP⁺-abhängige 7 α -HSDH aus *C. difficile* wurde für die Synthese der UDCA aus CDCA für eine interne NADP⁺-Regenerierung eingesetzt. Die bekannte NADP⁺-abhängige 7 α -HSDH aus *C. sordelli* wurde dabei als Template für ein *in silico* Screening eingesetzt. Der Sequenzvergleich ergab eine hohe Sequenzhomologie mit einer putativen 7 α -HSDH aus *Clostridium difficile*. Die Sequenzanalyse zeigte, dass typische Motive in der Aminosäuresequenz der SDR-Familie zugeordnet werden konnten. Die C-terminale His-Tag Variante zeigte zwar eine etwas höhere Aktivität gegenüber der N-terminalen Variante (5,8 U mg⁻¹ bzw. 3,2 U mg⁻¹; Messung mit Rohextrakt), diese ließ sich aber nicht mittels Ni-NTA-Chromatographie aufreinigen. Für die biochemische Charakterisierung und für Biotransformationen wurde daher die N-terminale getaggte Variante eingesetzt. Die Charakterisierung zeigte, dass das Protein NADP⁺ als Cofaktor präferiert, aber auch eine Restaktivität mit dem Cofaktor NAD⁺ besitzt. Mit NAD⁺ zeigt die Cd7 α -HSDH erstaunlicherweise eine ausgeprägte Substratinhibierung wie die 3 α -HSDH. Mit NADP⁺ dagegen konnte keine Substratinhibierung festgestellt werden, welches Biotransformation in hohen Substratkonzentrationen ermöglicht. Es konnte ausserdem anhand der biochemischen Charakterisierung festgestellt werden, dass die Cd7 α -HSDH ein sehr gut oxidierendes Enzym ist. Das Protein besitzt für die Reduktion von 7-KLCA einen v_{\max} -Wert von ca. 1,1 U mg⁻¹, für die Oxidation von CDCA dagegen einen v_{\max} -Wert von ca. 8,5 U mg⁻¹ und für CA dagegen sogar 91,9 U mg⁻¹. Ebenso ist aus den kinetischen Konstanten ersichtlich, dass wie bei der 3 α -HSDH die maximale Aktivität zu- und die Affinität abnimmt, je mehr funktionelle Gruppen das Substrat besitzt.

11. Inhibierung und ihre Funktion

Die Kinetik einer enzymatischen Reaktion wird typischerweise durch Variieren der Konzentration des Substrats und Auftragen der Produktbildungsrate als Funktion der Substratkonzentration untersucht. Üblicherweise ergibt dies eine typische hyperbolische Michaelis-Menten-Kurve, aus der die kinetischen Konstanten des Enzyms berechnet werden können. Eine Anzahl von Enzymen verhält sich allerdings deutlich anders, hier zeigt sich eine deutlich ausgeprägte Substratüberschußinhibierung. Es wird geschätzt, dass etwa 20% der untersuchten Enzyme eine solche Substratinhibierung aufweisen (Reed et al., 2010), wobei man annimmt, dass die Hemmung ein biologisch relevanter Regulierungsmechanismus ist. (Kaiser, 1980; Kühl, 1994; Reed et al., 2010).

Die Enzyme die in dieser Arbeit auf ihre kinetischen Parameter hin untersucht wurden, zeigen durchweg eine solche Substratüberschußinhibierung. Insbesondere die 3 α -HSDH besitzt eine sehr

Diskussion

3 α -HSDH aus *C. testosteroni*. Es wurden Positionen in der flexiblen Substratbindedomäne ausgetauscht, die an der Bindung des Pyridinnucleotids beteiligt sind. Dadurch war es möglich, den limitierenden Schritt zu identifizieren. Die Mutanten mit einer hydrophoberen Aminosäure wie z.B. Alanin an Stelle von Threonin zeigten höhere katalytische Aktivität, vermutlich deshalb, weil NAD⁺ in diesen Mutanten einen schnelleren Elektronentransfer gewährleistet (Hwang et al., 2013).

Die Funktion der Substratinhibierung konnte bisher noch nicht geklärt werden, vermutlich wird diese aber als regulatorisches Mittel in der Biosynthese der jeweiligen Gallensäurederivate eingesetzt. Zur Klärung der Frage, ob die Substratinhibierung biologische Bedeutung besitzt, müsste man beispielsweise auch die Konzentrationsbereiche der einzelnen Gallensäuren in der Leber kennen. Die Priorität liegt wahrscheinlich bei den primären Gallensäuren, danach kommen die sekundären, um ein gleichbleibendes Konzentrationslevel im Organismus beibehalten zu können. Dies könnte wiederum auch erklären, warum die HSDHs je nach Substrat deutlich verschiedene K_M -Werte besitzen.

12. Änderung der Cofaktorspezifität

Dehydrogenasen benötigen einen Cofaktor, der den Transfer des Wasserstoffs der Redoxreaktion gewährleistet. Dieser Cofaktor ist in den meisten Fällen Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) oder Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH). Ersteres ist zum einen etwas instabiler als NADH, zum anderen auch deutlich teurer und wird daher für industrielle Prozesse weniger favorisiert. Es gibt aber auch Ausnahmen, in denen NADPH für die Reaktion benötigt werden, z.B. für eine interne Cofaktorregenerierung, bei der alle eingesetzten Enzyme NADP⁺-abhängig sind oder wenn man parallel ablaufende Reaktionen über die Cofaktorspezifität voneinander trennen will. Mitunter hat man aber die Situation, ein im Prinzip geeignetes Enzym vorliegen zu haben, dessen Cofaktorspezifität aber nicht geeignet ist. Wichtige Vorarbeiten zur Cofaktoränderung, die in dieser Arbeit genutzt wurden, sind Sequenzalignments, Identifizierung der Cofaktor-Bindestelle mit Hilfe gelöster oder gemodelter Strukturen sowie Literaturdaten zu erfolgreich durchgeführten Cofaktoränderungen (Filling et al., 2002; Jörnvall et al., 1999; Jörnvall and Persson, 1995; Persson et al., 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Cofaktorspezifität der 7 β -HSDH, die strikt NADPH-abhängig ist und also keine Aktivität mit NADH aufweist, so geändert, dass nur noch NADH als Cofaktor akzeptiert wird. Das ist für zwei hier bearbeitete Prozesse wichtig, in denen Di- oder Triketo-Verbindungen simultan mit der NAD⁺-abhängigen 3 α - und der NADP⁺-abhängigen 7 β -HSDH umgesetzt werden. Durch Anpassung der Enzyme an einen einzigen Cofaktor, bevorzugt das stabilere und kostengünstigere NAD⁺, kann dann auf den Zusatz zweier Cofaktoren verzichtet werden. Für einen weiteren hier bearbeiteten Prozeß wurde eine NADP⁺-abhängige 7 α -HSDH benötigt, dafür wurde ein Cofaktorswitch

Diskussion

der NAD⁺-abhängigen 7 α -HSDH aus *E. coli* durch rationale Mutagenese durchgeführt. Die beste Mutante (D42R/I43G) zeigt nur noch Aktivität mit dem Cofaktor NAD⁺. Weiterhin wurde die neuartige NADP⁺-abhängige 7 α -HSDH aus *Clostridium difficile* derart geändert, dass die Aktivität mit NADH um den Faktor 3 erhöht und die Aktivität mit NADP⁺ um den Faktor 8 erniedrigt wurde.

Für die 7 β -HSDH zeigte die Variante G39E beim Standardaktivitätsassay die höchste spezifische Aktivität mit NADH. Mit NADPH konnte nur noch eine schwache Aktivität ($\leq 0,1$ U mg⁻¹) gemessen werden, so dass man von einem Cofaktorswitch reden kann. Die kinetischen Konstanten der NADH-abhängigen Mutante im Vergleich zum Wildtyp zeigten einen erhöhten K_M -Wert von 225 μ M gegenüber 20 μ M. Die somit herabgesetzte Affinität in Kombination mit dem niedrigeren v_{max} -Wert ergab dann eine deutlich schlechtere katalytische Effizienz. Für eine präparative Anwendung, bei der man unter Substratsättigung arbeitet, ist der K_M -Wert bzw. auch die katalytische Effizienz weniger wichtig, allerdings zeigt die NAD⁺-Mutante auch einen niedrigeren v_{max} -Wert. Daher wird man abschätzen müssen, ob man mit dem ungünstigeren Cofaktor, aber mit einem höher aktiven Enzym arbeitet oder mit NAD⁺, aber der niedrigeren Enzymaktivität. Letzteres kann man durch Verwendung höherer Enzymmengen, in diesem Fall die ca. 4-fache Menge, allerdings recht einfach kompensieren. Weiterhin konnten Mutanten erzeugt werden, die an den Positionen 39 als auch 40 ([G39D/R40I], [G39D/R40L] und [G39D/R40W]) verändert wurden. Diese Varianten zeigten zum einen keine Aktivität mehr mit NADPH, waren aber mit NADH schwächer als die oben genannte G39E-Variante. Aufgrund der geringen spezifischen Aktivität und des vermutlich hohen K_M -Werts kann davon ausgegangen werden, dass die Cofaktorspezifität nicht von den beiden Positionen G39 und R40 allein beeinflusst wird.

Aufgrund eines Strukturmodells der 7 β -HSDH wurden ausserdem Mutanten erzeugt, die an der Position 17 verändert wurden, da das Threonin ebenfalls sehr nah am 2'-Phosphat des Coenzyms liegt und wohl am Elektronentransport beteiligt ist. Die Variante mit einem Phenylalanin, welches das ursprüngliche Threonin ersetzt, zeigte Aktivität mit dem Cofaktor NADH. Phenylalanin ist bedeutend größer als das ursprüngliche Threonin, so dass der Elektronentransport des neu akzeptierten Cofaktors begünstigt wird. Erstaunlicherweise zeigte diese Variante wieder Aktivität mit dem Cofaktor NADPH, diese konnte sogar um den Faktor 5 gesteigert werden. Dies unterstreicht die Wichtigkeit dieser Aminosäureposition und lässt vermuten, dass diese Position im Glycinreichen-Motiv ebenfalls eine große Rolle in der Cofaktorspezifität zukommt. Katzberg et al. (2010) haben an einer γ -Diketone-Reduktase aus *S. cerevisiae* ebenfalls eine Aminosäure im Glycinmotiv verändert, so dass das Enzym NAD(H) deutlich besser akzeptiert als der Wildtyp, der beide Cofaktoren akzeptiert.

Die Aminosäuresubstitution an der analogen Position (18 bis 20 Aminosäuren downstream des Glycinreichen Motivs) der 7 α -HSDH aus *E. coli* führte ebenfalls zu einer Änderung der

Diskussion

Cofaktorakzeptanz, da sie wie die anderen HSDHs auch zu den SDRs gehört. Es wurde lediglich die Cofaktorakzeptanz von NAD⁺ auf NADP⁺ umgestellt. Hier zeigte die Mutante D42G/I43R das beste Ergebnis. Der ursprüngliche Cofaktor NAD⁺ wird von der erzeugten Variante nicht mehr angenommen. Tanaka et al. haben anhand der Struktur der 7 α -HSDH aus *E. coli* gezeigt, dass die beiden Sauerstoffatome am Adenosinribose-Teil von NADH mit dem Aspartat Wasserstoffbrückenbindungen eingeht (Tanaka et al., 1996). Durch den Austausch des Aspartats können sich wahrscheinlich keine Wasserstoffbrückenbindungen mehr bilden und durch den zweiten Austausch (Isoleucin zu Arginin) kann das 2'-Phosphat des Cofaktors Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen. Daher lässt sich sagen, dass die beiden Position 42 und 43 dominierend für die Cofaktorpräferenz sind. Die NADP⁺-abhängige Mutante (Variante mit N-terminalen 6xHist-Tag) wurde aufgereinigt und ihre kinetischen Parameter bestimmt. Hier zeigte sich, dass die spezifische Aktivität (v_{max}) der NADP⁺-abhängigen Mutante gegenüber dem Wildtyp ca. 13 % geringer ausfällt und die Affinität zum Substrat um das 6-fache schlechter ist. Weiterhin ist die Substratinhibierung, welche durch den K_i wiedergegeben wird, auch ausgeprägter. Dennoch ist die Aktivität auch bei hohen Substratkonzentrationen hoch genug, um diese Variante in den Synthesen zur Gewinnung von UDCA einsetzen zu können. Die Cofaktoränderung von NAD⁺ zu NADP⁺ ist biochemisch und ökologisch gesehen, prinzipiell wenig vorteilhaft, für bestimmte Prozessvarianten kann es allerdings erforderlich sein, mit einer NADP⁺-abhängigen Variante zu arbeiten. So wurde die Cofaktorakzeptanz einer Lactat-Dehydrogenase von NAD⁺ zu NADP⁺ geändert, um die Oxidation von (*R*)-1-Phenylethanol in Kombination mit einer NADP⁺-abhängigen ADH aus *L. brevis* zu gewährleisten (Richter et al., 2011).

Die 7 α -HSDH aus *C. difficile* stellt eine Besonderheit unter den HSDHs dar. Sie akzeptiert sowohl NADP⁺ als auch NAD⁺, wobei die phosphorylierte Form bevorzugt wird. Das zeigt sich zum einen in der nicht vorhandenen Substratüberschussinhibierung mit NADP⁺ als auch an einem Sequenzalignment, da hier die typischen Aminosäuren für eine NADP⁺-Abhängigkeit vorhanden sind.

Weiterhin wurde die Struktur modelliert, sie zeigt, dass vermutlich sowohl die 18 bis 20 Aminosäuren downstream des Glycinreichen Motivs für die Cofaktorpräferenz verantwortlich sind, als auch, in Analogie zum Threonin bei der 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens*, die Aminosäure Lysin an Position 16 im Glycin-Motiv selbst. Die Einzelmutanten an Position 16 zeigten zwar eine erhöhte Aktivität mit NAD⁺, allerdings ist die A37D-Mutante die beste Variante. Die kleine Aminosäure Alanin wurde gegen Aspartat ausgetauscht und die spezifische Aktivität mit NAD⁺ als Cofaktor konnte um den Faktor 3 gesteigert werden. Die Aktivität mit NADP⁺ erniedrigte sich allerdings um den Faktor 8. Die Kombination der Positionen 16 und 37 zeigte, dass hier keine Steigerung der Aktivität mit NAD(H) als Coenzym erzielt werden konnte.

13. Optimierung der Enzyme

Die Optimierung der Enzyme geschah durch Mutagenese im *Rossmann-fold*, der im Protein N-terminal lokalisiert ist. Es konnten pro Enzym bis zu drei für die Aktivität wichtige Positionen identifiziert werden, die im Folgenden genauer beschrieben werden. Die Steigerung der Aktivität oder auch die Verminderung bis hin zur Eliminierung der Substratüberschußinhibierung (7 β -HSDH) konnte in dieser Arbeit erfolgreich gezeigt werden. *Protein engineering* ermöglicht daher, bestehende Prozesse weiter zu verbessern und höhere Produktivität zu gewährleisten. Die Steigerung der Aktivität der einzelnen HSDHs hat für biotechnologische Verfahren auch den Vorteil, dass weniger Protein bereitgestellt werden muss.

13.1. 7 β -HSDH

Die in dieser Arbeit identifizierten Positionen (T17, die sich im Glycin-Motiv befindet; G39, die für die Cofaktorpräferenz verantwortlich ist und Arg64, Ende des *Rossmann fold*) befinden sich alle im N-terminalen Teil des Proteins. Die beiden Positionen T17 und G39 spielen eine essentielle Rolle in der Bindung des Cofaktors, G39 spielt weiterhin auch in der Spezifität eine wichtige Rolle. Oppermann et al. (1997) haben am Beispiel einer 3 β /17 β -HSDH gezeigt, dass die Position im Glycin-Motiv und ca. 20 AS downstream eine elektrostatische Interaktion mit der Ribose des 2'-Phosphat des Coenzym eingehen (Oppermann et al., 1997; Tanaka et al., 1996). Weiterhin konnte Gangloff et al. zeigen, dass diese Position auch an einer 17 β -HSDH eine essentielle Rolle spielt. Durch den Austausch des Leucins an Position 36 zur Asparaginsäure konnte die ausgeprägte Substratinhibierung eliminiert werden (Gangloff et al., 2001).

Die Mutagenese an Position 17 zeigte in den Standard-Aktivitätsassays am Beispiel des Austauschs T17F eine 6-fach erhöhte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Der Austausch an Position 17 zu Phenylalanin, das bedeutend größer und sperriger als das ursprüngliche Threonin ist, hat vermutlich dazu geführt, dass eine Wechselwirkung mit der 2'-Phosphatgruppe bzw. mit dem Adenosinring eingegangen werden kann. Die höhere Aktivität beruht daher auf der besseren Dissoziation der Elektronen zwischen dem Cofaktor und dem Substrat. Weiterhin kann die Variante auch die unphosphorylierte Form des Cofaktors annehmen, was diese These weiter belegt. Wie in Abbildung 18 (Kapitel 5.1.2.1.) zu sehen ist, wurden auch die kleinere Aminosäure Alanin gegen das Threonin ausgetauscht. Auch diese Variante zeigte, dass die Aktivität der 7 β -HSDH um den Faktor 2 gesteigert werden konnte.

Diskussion

Wie in der Dissertation von M. Braun beschrieben, konnte durch Mutagenese des Glycins an Position 39 zu einem Serin die Aktivität verbessert werden. Der Effekt, dass eine geringere Substratinhibierung ermittelt wurde, konnte dagegen nicht festgestellt werden. Weiterhin ist dort beschrieben, dass die Affinität zum Substrat DHCA um den Faktor 4 verbessert werden konnte. Allerdings kann diese Veränderung auch darauf zurück zu führen sein, dass in der Doktorarbeit von M. Braun die Kinetiken mit einem Mikroplatten Reader aufgenommen wurden, diese führen erfahrungsgemäß häufig zu deutlich anderen Ergebnissen im Vergleich zu Werten, die mit dem Küvettenphotometer gewonnen worden. Weiterhin besaß die biochemisch charakterisierte Variante aus der Doktorarbeit von M. Braun einen N-terminalen His-Tag, wobei der Einfluß des Tags auf das Enzym nicht untersucht wurde. Die genannten Unterschiede könnten eine Begründung für die abweichenden Konstanten sein, die in Tabelle 46 aufgeführt wurden.

Tabelle 46: Kinetische Konstanten für den Wildtyp und die Mutante [G39S] der 7 β -HSDH aus der Doktorarbeit von M. Braun. Als Substrat wurde ebenfalls DHCA (7 μ M bis 10 mM) und als Cosubstrat NADPH (0,1 mM) eingesetzt.

Bezug Variante	Doktorarbeit M. Braun		diese Arbeit	
	Wildtyp	G39S	Wildtyp	G39S
v_{\max} [U mg ⁻¹]	15,8 \pm 1,1	22,4 \pm 1,1	8,9 \pm 0,2	52,0 \pm 1,9
K_M [μ M]	31,5 \pm 5,0	75,0 \pm 9,0	20,3 \pm 2,9	352,4 \pm 42,7
K_I [mM]	8,6 \pm 1,5	80,0 \pm 50,0	79,8 \pm 16,4	51,8 \pm 10,1

Eine bisher in der Literatur unbekannt Position stellt die Position Arg64 dar. Dieses Arginin bildet das Ende eines β_3 -Faltblatts des *Rossmann fold*. Dieses β_3 -Faltblattes (in Verbindung mit der α_3 -Helix) geht eine Bindung mit dem Adeninring des Cofaktors ein (Persson et al., 2003). Bekannt ist, dass im Verlauf der katalytischen Reaktion von ADHs (also auch HSDHs) zuerst der Cofaktor eine Bindung mit dem Enzym (Enzym- Cofaktor-Komplex) eingeht (Eklund et al., 1976). Charlier and Plapp (2000) haben anhand der Pferdeleber-ADH gefunden, dass dieser Prozess der insgesamt limitierende Faktor ist. Sie postulierten, dass der Cofaktor vom Cofaktor-Enzym-Komplex langsamer freigegeben wird als vom Enzym-Substrat-Cofaktor-Komplex. Aufgrund dieser Annahme wurden zielgerichtete Mutagenese-Schritte vorgenommen, die diesen limitierenden Schritt in der Dissoziation des Cofaktors beeinflussen, um eine schnellere Cofaktor-Dissoziation zu erzielen, das sollte somit auch eine höhere spezifische Enzymaktivität zur Folge haben. Die Sättigungsmutagenese dieser Aminosäureposition führte in der Regel zu einer deutlich höheren spezifischen Enzymaktivität der 7 β -HSDH, insbesondere die beiden negativ geladenen Aminosäuren zeigten die höchsten Aktivitäten. Bezüglich der Steigerung der Aktivität erhält man kein klares, einheitliches Bild: Unpolare Aminosäuren ergeben Steigerungen von ca. 2- bis 4-fach, aber auch die polaren Seitenketten wie sie aus Glutamin, Cystein oder Threonin kommen, zeigen ähnliche Steigerungen. Bei den beiden sauren Aminosäuren zeigte die längere

Diskussion

Glutaminsäure eine Steigerung von ca. 700 % gegenüber der kürzerkettigen Asparaginsäure, die eine Steigerung von ca. 370 % erzielte.

Die einzelnen Mutanten zeigten einheitlich eine höhere Aktivität und eine verminderte Substratinhibierung. Daher wurde im folgenden die jeweilige Position in einer zweiten Runde kombiniert und biochemisch charakterisiert.

Zweite Runde der Mutagenesestudie

In einer zweiten Runde der zielgerichteten Mutagenese wurden die Positionen Thr17, Gly39 und Arg64 ausgewählt, da diese Stellen einzeln eine Verbesserung der biochemischen Eigenschaften aufweisen. Die Einzelmutanten wurden mittels QuikChange™-PCR jeweils kombiniert und anschließend biochemisch charakterisiert. Dabei konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass für die erzeugten Doppelmutanten, die die veränderte Aminosäure in Position 17 beinhalten, keine Aktivität und in einem SDS-Gel keine Überexpressionsbande ermittelt werden konnte. Ein Grund könnte sein, dass durch die Zusammenführung der Mutationen die mRNA instabiler ist und dadurch eine kürzere Halbwertszeit besitzt, bevor die Translation am Ribosom beginnen kann. Eine plausible Begründung könnte allerdings auch sein, dass die Zusammenführung der Mutationen zu einer Doppelmutante die Stabilität des Proteins beeinflusst. Das Protein könnte nach der Bildung durch die veränderte Aminosäuresequenz instabiler sein und zerfallen.

Mit der Kombination der G39S- und der R64E-Mutante zu einer Doppelmutante konnte eine Enzymvariante erzeugt werden, die eine erhöhte Aktivität um das ca. 6-fache aufweist, besonders vorteilhaft ist, dass durch die biochemische Charakterisierung gezeigt werden konnte, dass diese Mutante keine Substratinhibierung mehr zeigt (siehe Tabelle 47).

Tabelle 47: Kinetische Konstanten für die 7 β -HSDH (Wildtyp und Mutanten) für das Substrat DHCA. n.v. = nicht vorhanden.

Bezeichnung	v_{\max} [U ⁻¹ mg]	K_M [μM]	K_I [mM]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]	k_{cat}/K_I [s ⁻¹ mM ⁻¹]
Wildtyp	8,9	20,3	79,8	218	0,1
G39S	52,0	352,4	51,8	74	0,5
R64E	40,2	74,2	125,9	269	0,2
G39S/R64E	54,3	349,3	n.v.	77	n.v.

Die jeweiligen Einzelmutanten G39S sowie R64E zeigten zwar beide noch eine Substratinhibierung, dafür war der v_{\max} bei beiden bedeutend erhöht. In Kombination zeigte die Doppelmutante keine Substratinhibierung mehr, diese Mutante zeigt sogar im Vergleich die beste Aktivität. Der Austausch

Diskussion

G39S führt dazu, dass zum einen eine Wasserstoffbrücke zum 2'-Phosphat des Cofaktors und zum anderen eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zum benachbarten Threonin an Position 17 gebildet wird. Durch diese neu entstandenden Bindungen wird der Cofaktor stabilisiert.

Der Austausch von Arginin zur Glutaminsäure an Position 64, die sich am Ende des *Rossmann fold* befindet, hat keinen direkten Bezug zum Cofaktor selber. Der Austausch bewirkt vermutlich eine Konformationsänderung des *Rossmann folds*, der Cofaktor nimmt somit eine andere Position in der Cofaktorbindestelle ein. Ein Strukturalignment des Wildtyps und der Mutante G39S/R64E zeigt deutlich, dass sich eines der beiden Phosphate zwischen den beiden Nukleotiden anders positioniert (siehe Abbildung 95).

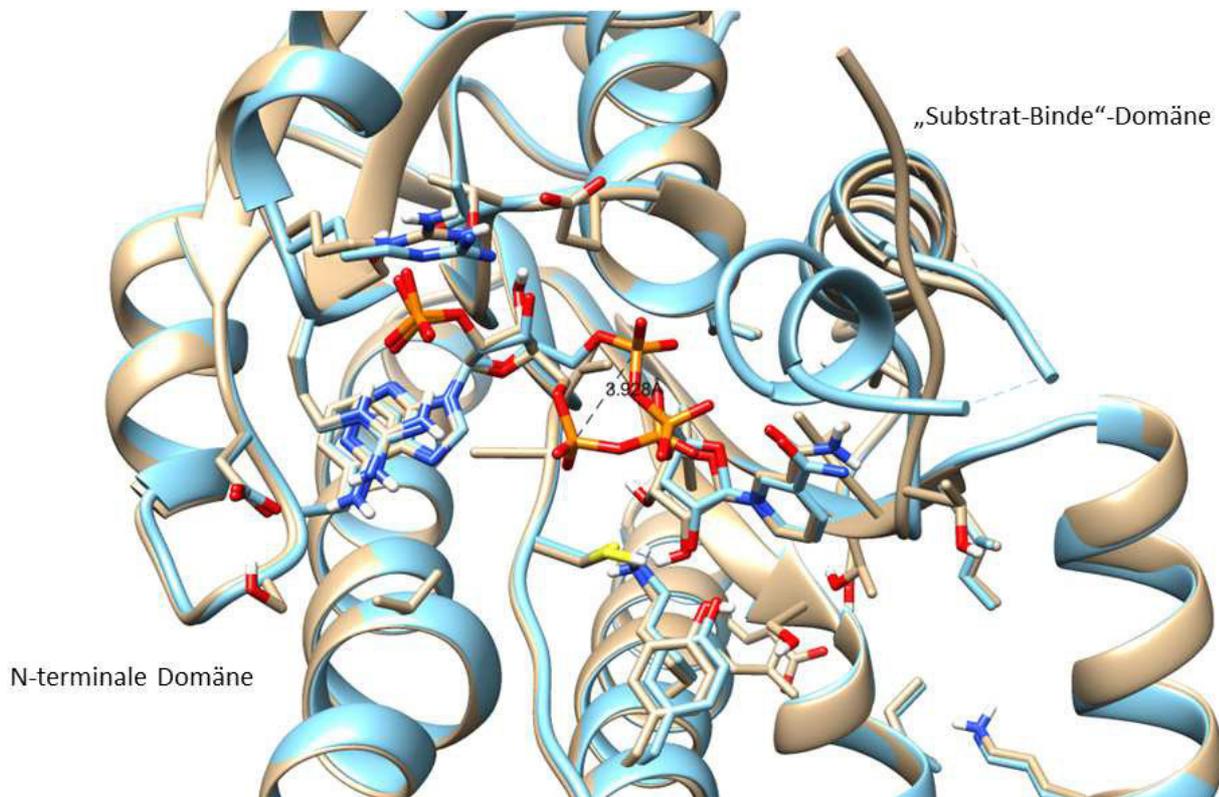


Abb. 95: Struktur-Alignment der 7β-HSDH Wildtyp (türkis) und Mutante G39S/R64E (beige) mit dem Cofaktor NADP⁺. Veranschaulicht wird die Konformationsänderung des Cofaktors, im besonderen eines der beiden Phosphate. Das Alignment wurde mit der Software UCSF Chimera unter Verwendung des Algorithmus „Needleman-Wunsch, Matrix: Blosom-62“ erstellt (Meng et al., 2006; Pettersen et al., 2004).

Während beim Wildtyp das Phosphat des Cofaktors mehr in Richtung der flexiblen „Substrat-Binde“-Domäne zeigt, ist die Bindung des Cofaktors bei der Mutante anders. Hier ist das Phosphat um 3,9 Å verschoben, es zeigt nun mehr in Richtung der N-terminalen Domäne, wo sich die eingefügten Mutationen befinden. Daher kann angenommen werden, dass durch die Mutation G39S (Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindung) und durch die Mutation R64E (Konformationsänderung des *Rossmann fold*) der Cofaktor nur noch in die Konformation eingelagert werden kann, die die Erhöhung

der Aktivität zur Folge hat. Die Mutationen führen allerdings auch zu einer Erhöhung des K_M -Wertes, was durch die Stabilisierung des Cofaktors erklärbar ist.

Weiterhin kann die Strukturaufklärung eine Erklärung geben, dass es sich bei der 7β -HSDH nicht um eine Substratinhibierung handelt, was anhand der kinetischen Parametern anzunehmen ist, sondern um eine kompetitive Inhibierung, d.h. es konkurrieren zwei Substrate um die aktive Tasche. In diesem Fall konkurrieren nicht die Gallensäuren um das aktive Zentrum, sondern die Cofaktoren in der Cofaktorbindestelle. Je nachdem, wie der Cofaktor gebunden wird, kann es zu einer Verlangsamung der Reaktion kommen und den Anschein einer Substratüberschußinhibierung erwecken. Eine kompetitive Hemmung durch den Cofaktor konnte auch bei einer humanen 3β -HSDH sowie bei zwei 3α -HSDH aus Kaninchen festgestellt werden (Endo et al., 2013; Thomas et al., 2010).

Eine erfolgreiche Eliminierung der Substratinhibierung konnte Ziegler et al. anhand einer Salutaridin Reduktase zeigen (Ziegler et al., 2009). Es wurde aber eine andere Strategie als in dieser Arbeit verfolgt. Es wurden sämtliche Aminosäuren mutagenisiert, die an der Bindung des Substrates beteiligt sind. So konnten Mutanten identifiziert werden, die verbesserte Eigenschaften zeigten und durch Kombination zweier Mutanten zu einer Doppelmutante konnte eine Variante erzeugt werden, die keine Substratinhibierung mehr besitzt.

Analog zur 7β -HSDH konnten die Positionen R34 sowie L68 bei der 3α -HSDH aus *C. testosteroni* identifiziert werden, welche im nachfolgenden Kapitel beschrieben werden.

13.2. 3α -HSDH

Die 3α -HSDH aus *C. testosteroni* wurde das erste Mal im Jahr 1969 beschrieben und anschließend von Skålhegg biochemisch charakterisiert (Aukrust et al., 1976; Michel-Briand, 1969; Skålhegg, 1974a, 1974b). Ausserdem gibt es zahlreiche Publikationen zu Mutagenesestudien an der 3α -HSDH, dennoch konnte in dieser Arbeit eine neue Stelle identifiziert, die im Vergleich zum Wildtyp sowohl eine Steigerung der Aktivität als auch eine andere Kinetik aufweist (Chang et al., 2010; Hwang et al., 2013, 2005). Analog zur Optimierung der 7β -HSDH wurde sowohl das Ende des *Rossmann folds* als auch die Aminosäuren für die Cofaktorspezifität der 3α -HSDH mutagenisiert. Hier stellte sich heraus, dass die Mutagenese zum einen an den Aminosäuren für die Cofaktorspezifität als auch an der Position am Ende des β_4 -Faltblattes eine Aktivitätssteigerung zur Folge hatte. Weiterhin konnte in dieser Arbeit der Einfluss des C-terminalen His-Tags auf die biochemischen Eigenschaften des Proteins festgestellt werden.

13.3. Einfluss des His-Tags

Affinitäts-Tags haben als Werkzeug in der Proteinchemie für die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen im letzten Jahrzehnt stark an Popularität gewonnen (Carson et al., 2007; Smith et al., 1989). Die Aufreinigung über eine Affinitätschromatographie ist ökonomisch, weil sie zum einen hohe Ausbeuten an aufgereinigtem Protein (in der Regel über 90 %) erzielt und durch die Verwendung eines Tags die Aufreinigungsprozedur bedeutend reduziert werden kann. Histidin-Tags sind die am meisten verbreiteten Affinitäts-Tags (Arnau et al., 2006). Sie werden entweder am C- oder N-Terminus des Proteins angefügt und es wird üblicherweise angenommen, dass sie keinen Einfluss auf die Struktur oder die Funktion des Proteins haben (Chant et al., 2005). Dabei gibt es zahlreiche Publikationen, in denen ein negativer Einfluss eines Tags auf das Enzym beschrieben wurde, wie z.B. eine geringere Ausbeute an Protein (Goel et al., 2000), eine Änderung der Proteinstruktur (Chant et al., 2005) oder eine Inhibierung der Enzymaktivität (Fonda et al., 2002; Kim et al., 2001). Allerdings gibt es auch Literaturbefunde, die über eine positive Veränderung der Proteineigenschaften berichtet haben, wie z.B. eine erhöhte Ausbeute der Proteinmenge (Rajan et al., 1998; Sun et al., 2005), das Unterstützen der Faltung (Kou et al., 2007) oder auch die Erhöhung der Löslichkeit des Proteins (Chen et al., 2005; Dyson et al., 2004; Nallamsetty and Waugh, 2006).

Bei der Charakterisierung des Proteins dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die Anbringung eines His-Tags am C-Terminus die biochemischen Eigenschaften des Fusionsproteins änderten, während ein His-Tags am N-Terminus eine geringe Änderung in Aktivität und Affinität bewirkte. Für den Vergleich wurde das nicht-getaggte Enzym aufwendig über eine Q-Sepharose so weit aufgereinigt, dass die 3 α -HSDH mind. ca. 80 Prozent des Gesamtproteingehalts ausgemacht hat. Um den Einfluss des C-terminalen Tags zu überprüfen, wurde der Tag mittels QuikChange™-PCR sowohl auf 3 Histidine verkürzt als auch auf 9 Histidine verlängert. Die kinetischen Konstanten der aufgereinigten Proteine sind in Tabelle 48 aufgeführt.

Tabelle 48: Kinetische Konstanten der 3 α -HSDH mit einem 6xHis-Tag bzw. 9xHis-Tag am C-Terminus im Vergleich zum nativen Protein ohne einen His-Tag.

Variante	Terminus	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	K_I [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]
ohne	x	134,3 \pm 3,8	50*	< 1	59,1 \pm 1,6	1181,2 \pm 9,4
6xHis	C	13,9 \pm 0,8	134,3 \pm 25,6	9,8 \pm 1,4	6,3 \pm 0,7	47,2 \pm 5,4
9xHis	C	19,2 \pm 1,1	70,5 \pm 14,2	4,2 \pm 0,8	8,9 \pm 0,5	126,3 \pm 4,9
6xHis	N	98,7 \pm 4,8	50*	< 1	47,0 \pm 2,2	939,6 \pm 170,3

* = Aufgrund der starken Substratinhibierung aus dem Diagramm abgelesen

Diskussion

Die N-terminale Variante zeigt ähnliche Konstanten wie das native Protein, der v_{\max} -Wert als auch die katalytische Effizienz sind zwar etwas vermindert, aber dennoch bewegen sich die Werte beider Varianten in einer ähnlichen Größenordnung. Das Anbringen eines His-Tags am C-Terminus dagegen beeinflusst das Protein sehr stark, dass sowohl die maximale Geschwindigkeit und die Affinität zum Substrat DHCA verschlechtert werden. In Kapitel 5.2.1. konnte gezeigt werden, dass sich außerdem das Verhalten bei Substratkonzentrationen zwischen 0,5 und 5 mM deutlich geändert hat, die sehr starke Substratüberschussinhibierung ist nicht mehr vorhanden. Der v_{\max} -Wert wurde um 90 % vermindert und der K_M -Wert um das Dreifache erhöht. Die katalytische Effizienz wurde um das 25-fache verringert.

Interessanterweise zeigt die Variante mit dem 9xHistidin-Tag am C-Terminus eine Verdopplung der katalytischen Effizienz gegenüber dem Standard-Tag mit 6 Histidinen. Auch der v_{\max} -Wert konnte um 50 % gesteigert werden, der K_M -Wert wurde ebenfalls verringert und die Variante mit dem 9xHis-Tag hat beinahe die gleiche Affinität wie das native Enzym.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass der Hexahistidinrest am C-Terminus des Enzyms die Eigenschaft in Bezug auf das Verhalten der Substratinhibierung beeinflusst. Die Struktur der 3α -HSDH wurde daraufhin mit den verschiedenen langen Histidinresten am C-Terminus modelliert. In Abbildung 96 zeigt sich, dass der His-Tag offensichtlich selbst eine α -Helix Struktur bildet.

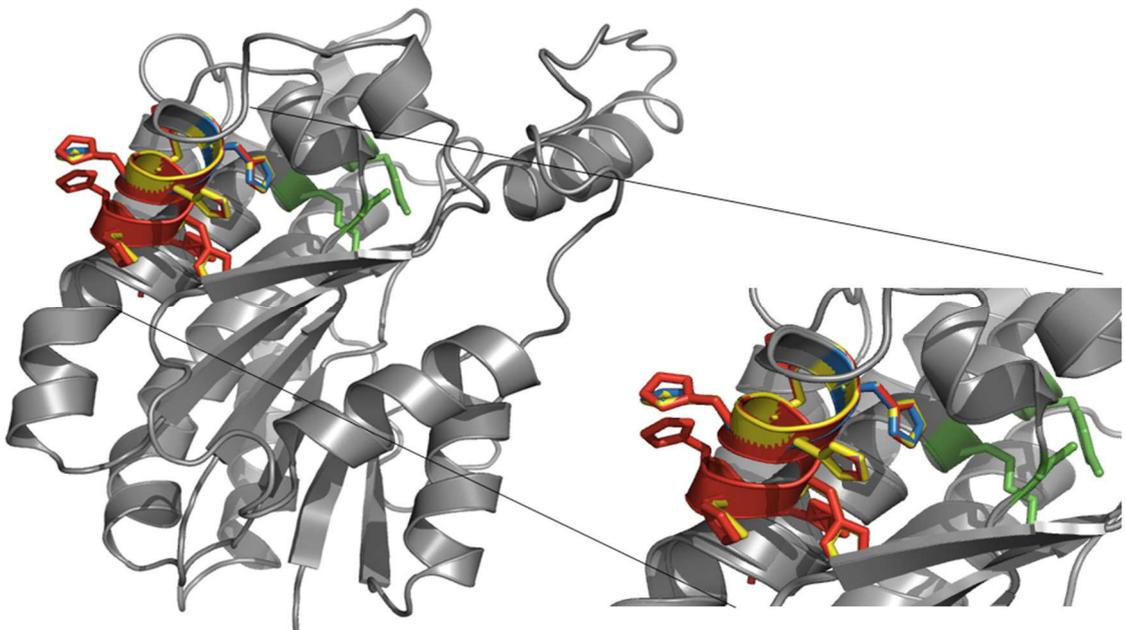


Abb. 96: Alignment der verschiedenen 3α -HSDH-Strukturen mit unterschiedlicher His-Tag Länge. In Blau dargestellt ist die Variante mit 3 Histidinen, in Gelb mit 6 und in Rot die Variante mit 9 Histidinen am C-Terminus. Die Histidine bilden eine α -Helix-Struktur. Je mehr Histidine vorhanden sind, desto länger wird die Helix-Struktur. Das aktive Zentrum (Ser114, Tyr155, Lys159) ist in grün dargestellt (Grimm et al., 2000). Dargestellt ist eine Untereinheit des Dimers. Für die Modellierung wurde die Röntgenstruktur (PDB ID: 1FJH) benutzt.

Diskussion

Abbildung 96 zeigt, dass mit zunehmender Länge der α -Helix diese der Helix der benachbarten Domäne näherkommt. Die Variante mit den 9xHistidinen (rot markiert) kommt sogar der benachbarten Helix so nahe, dass der Seitenrest des letzten Histidins diese durchdringt. Das legt nahe, dass die Flexibilität der benachbarten Domäne sehr stark eingegrenzt und somit die Bindungsfähigkeit des Substrates als auch des Cofaktors reduziert wird. Die sterische Hinderung der flexiblen Binde-Domäne kann somit eine gute Erklärung für das veränderte Kinetikverhalten des getaggtten Enzyms geben, aber eventuell entstehen durch das Einbringen von basischen Histidinen Wechselwirkungen, die den Elektronenfluss oder die Dissoziation des Cofaktors und/oder Substrat stören. Durch die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Cofaktor könnte z.B. die Dissoziation des Cofaktors reibungsloser von statten gehen und so die Substratinhibierung vermindern, wie man anhand des K_i -Wertes der C-terminalen Variante in Tabelle 48 erkennen kann. Dennoch hindert die angefügte Struktur des Tags die benachbarte Domäne so sehr, dass sowohl die Aktivität als auch die katalytische Effizienz beeinträchtigt werden. Vermutlich ist die benachbarte α -Helix weniger flexibel und in ihrer Funktion eingeengt. Hwang et al., haben gezeigt, dass die Bindedomäne im C-terminalen Bereich liegt und dieser sehr flexibel ist, da man diesen Teil nicht in der Röntgenkristallstruktur erfassen kann (Hwang et al., 2013). Sie postulierten, dass der limitierende Schritt in der Redoxreaktion des Proteins das Verlassen des NADH ist. Ein ähnliches Phänomen konnten Charlier und Plapp an der Pferdeleber-ADH beobachten (Charlier and Plapp, 2000).

13.4. Optimierung durch Mutagenese

Um den Einfluss der eingeführten Mutationen auf das Protein überprüfen und vergleichen zu können, werden im Folgenden die Mutanten mit einem C-terminalen und die Varianten mit einem N-terminalen His-Tag verglichen. Wie im vorigen Kapitel geschildert, hat der Terminus, an dem der His-Tag angebracht wird, einen Einfluss und kann somit die ermittelten Werte verfälschen, wenn C-terminal getaggte Mutanten mit Mutanten mit einem N-terminalen Tag verglichen werden. Die Varianten mit C-terminalem Tag zeigten durchweg geringere katalytische Aktivitäten, wie in Tabelle 49 zu erkennen ist.

Diskussion

Tabelle 49: Kinetische Konstanten für die 3 α -HSDH (Wildtyp und Mutanten) für das Substrat DHCA. Es sind die Konstanten für die Varianten mit C-terminalem 6xHis-Tag aufgeführt.

Bezeichnung	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	K_i [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]
Wildtyp	13,9 ± 0,8	134,3 ± 25,6	9,8 ± 1,4	6,3 ± 0,3	47,2 ± 6,7
L68A	27,3 ± 1,2	165,2 ± 20,6	4,6 ± 0,4	12,5 ± 0,5	75,6 ± 6,3
R34N/L68A	16,5 ± 0,6	77,5 ± 10,9	17,6 ± 1,9	7,5 ± 0,3	97,1 ± 9,5
* T188A	16,4 ± 12,9	2561 ± 2493	1,1 ± 1,1	7,8 ± 6,2	3,0 ± 2,8
* L68A/T188A	6,2 ± 0,2	350 ± 26	14,42 ± 4,0	2,9 ± 0,1	7,9 ± 0,4

* = Werte aus der Bachelorarbeit von Simone Rath

Die Mutagenese des Leucin an Position 68 der 3 α -HSDH hat gezeigt, dass diese Position im *Rossmann fold* eine essentielle Rolle in der katalytischen Aktivität des Proteins einnimmt. Wie bei der 7 β -HSDH konnten auch hier katalytische Eigenschaften verbessert werden. Aus Tabelle 48 geht hervor, dass durch die Mutation L68A der 3 α -HSDH die katalytische Effizienz um ca. 66 % gesteigert werden konnte. Hier stellte sich heraus, dass die Mutagenese von Leu68 hin zu einer kleinen Aminosäure wie Cystein oder Alanin eine Aktivitätssteigerung zur Folge hatte. Ein Austausch zu einer polaren Aminosäuren hingegen führte in der Regel zu einem Aktivitätsverlust. Weiterhin führte die Kombination mit der R34N-Variante im Vergleich zum Wildtyp zu einer Verdopplung der katalytischen Effizienz. Zwar zeigt die Doppelmutante einen geringeren v_{\max} -Wert als die L68A-Variante, aber dafür besitzt sie den niedrigsten K_M -Wert. Auffällig ist allerdings auch, dass die Variante T188A von Hwang et al. als bedeutend besser beschrieben wurde. Hwang et al., (2013) führten Mutagenesestudie an der flexiblen Substrat-Binde-Domäne durch und konnten zwei Positionen identifizieren, die eine wichtige Rolle in der Binding des Nikotindinukleotid als auch des Substrates Androsteron spielen. Durch den Austausch von Aminosäuren an den Position P185 und T188 gegen ein hydrophoberes Alanin wird die Bindung des NAD⁺ und somit die katalytische Aktivität verbessert. In dieser Arbeit wurden diese beiden Positionen ebenfalls erzeugt und mit dem Substrat DHCA biochemisch charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Mutagenese der Position P185 als Einzelmutante oder in Kombination eine geringere bis gar keine Steigerung der katalytischen Aktivität ergab. Die Position T188 dagegen zeigte eine deutliche Steigerung, allerdings nur in der Variante mit einem N-terminalen His-Tag, welches wiederum ein Beleg dafür ist, dass der His-Tag einen deutlichen Einfluss auf das Enzym besitzt. In Tabelle 50 sind die erzeugten Mutanten dargestellt, die einen N-terminalen His-Tag besitzen.

Diskussion

Tabelle 50: Kinetische Konstanten für die 3 α -HSDH (Wildtyp und Mutanten) für das Substrat DHCA. Es sind die Konstanten für die Varianten mit N-terminalem 6xHis-Tag aufgeführt.

Bezeichnung	v_{\max} [U mg ⁻¹]	K_M [μ M]	K_I [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ mM ⁻¹]
Wildtyp	98,7 \pm 4,8	50	< 1	47,1 \pm 2,2	939,6 \pm 170
* L68A	290,6 \pm 45,4	75,4 \pm 22,6	< 1	138,5 \pm 21,6	1841 \pm 289
* T188A	327,4 \pm 18,9	122,0 \pm 16,4	1,73 \pm 0,2	155,4 \pm 9,4	1295,5 \pm 5
* L68A/T188A	233,5 \pm 12,5	164,4 \pm 20,4	14,42 \pm 4,0	111,1 \pm 6,0	677,4 \pm 48,7

* = Werte aus der Bachelorarbeit von Simone Rath

In Tabelle 50 zeigt sich, dass der Wildtyp der 3 α -HSDH als Fusionsprotein mit einem His-Tag am N-Terminus einen hohen v_{\max} -Wert und eine hohe katalytische Effizienz besitzt. Im Vergleich zu der C-getaggen Variante ist der v_{\max} -Wert um den Faktor 7 und die katalytische Effizienz um den Faktor 20 höher. Dafür ist die Substratinhibierung allerdings auch deutlich höher, wie beim nativen Enzym ist der Wert nicht berechenbar und wurde aus der Grafik abgelesen. Der Wert wird auf <1 mM geschätzt. Im Vergleich der Mutanten zeigte sich, dass die neu identifizierte Position L68A gegenüber den bekannten T188A einen höheren Wert für die katalytische Effizienz sowie einen kleineren K_M -Wert besitzt. In der Folge wurde dann geprüft, ob sich die positiven Eigenschaften der Einzelmutationen durch Kombination der beiden Positionen verstärken. Die biochemische Charakterisierung zeigte unerwarteterweise ein anderes Bild, die katalytische Effizienz ging unter die des Wildtyps (ca. 66% im Vergleich zum Wildtyp) zurück, insbesondere der K_M -Wert war für die Doppelmutante am höchsten. Allerdings besitzt die Doppelmutante den höchsten K_I -Wert, d.h. die Inhibierung wurde deutlich verbessert.

Skålegg und Mitarbeiter konnten anhand des aufgereinigten Proteins aus dem Ursprungsorganismus zeigen, dass das Enzym ein Dimer bildet und je nach eingesetzter Proteinkonzentration schneller oder langsamer in das aktivere Monomer zerfällt. Durch Experimente, die bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt wurden, konnten sie zeigen, dass bei höheren pH-Werten und bei einer geringen Proteinkonzentration von 0,1 μ g ml⁻¹ eine doppelt so hohe Aktivität gegenüber dem Versuch mit dem niedrigeren pH-Wert detektiert werden konnte (Skållegg, 1974b). Das bedeutet, dass sowohl der pH-Wert als auch die eingesetzte Menge an Protein direkten Einfluss auf die quartäre Struktur das Protein hat. Die in dieser Arbeit durchgeführte Mutagenese kann daher auch die Stabilität der Bindung des Proteins weiter herabgesetzt haben, so dass auch bei höheren Proteinkonzentrationen das Dimer in die aktivere Form des Monomers zerfällt. In einer Michaelis-Menten Kinetik würde sich das in Form einer schwächeren Substratinhibierung ausdrücken. Weiterhin könnte man diese Theorie überprüfen, indem man die erstellten Mutanten und den Wildtyp mittels Gelfiltration aufreingt. So könnte man eventuell das Verhältnis von Monomer zum Dimer abschätzen.

14. Vor- und Nachteile von Biotransformationen mit isolierten Enzymen sowie Ganzzellbiokatalysatoren

Biotransformationen können sowohl mit isolierten Enzymen als auch mit Ganzzellbiokatalysatoren durchgeführt werden. Der Einsatz von isolierten Enzymen kann mit unterschiedlichen Reinheitsgraden der Proteine durchgeführt werden. Als Ganzzellbiokatalysatoren kommen in der Regel rekombinante Mikroorganismen, sogenannte „*Designer cells*“ zum Einsatz. Als Expressionshost wird in den meisten Fällen *E. coli* verwendet, er ist sehr leicht zu kultivieren und es stehen eine Vielzahl von Vektoren und weiteren molekularbiologisch nützlichen Tools zur Verfügung. Beide Ansätze, die Verwendung isolierter Enzyme oder von Ganzzellbiokatalysatoren, besitzen Vor- und Nachteile, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

Isolierte Enzyme

Vorteil der Synthese mit isolierten Enzymen (Rohextrakt) ist, dass diese individuell angepasst in der Biotransformation eingesetzt werden können. Das ermöglicht es, genau die erforderliche Protein- bzw. Aktivitätsmenge in einer Reaktion einzusetzen. Das ist insbesondere wichtig, wenn mehrere Enzyme zusammenwirken sollen, wie beispielsweise eine Reduktase und ein Cofaktor-regenerierendes Enzym. Die Verwendung der Formiat-Dehydrogenase (FDH) als NADH-regenerierendes Enzym ist in vielen Fällen nur in Form isolierter Enzyme sinnvoll, da dieses Enzym nur eine niedrige spezifische Aktivität von ca. 5 U mg⁻¹ aufweist. In Kombination mit Alkohol-Dehydrogenasen, deren Aktivität häufig im Bereich von mehreren 100 U mg⁻¹ liegen, kann man bei Verwendung isolierter Enzyme die niedrige Aktivität der FDH durch Einsatz hoher Proteinmengen kompensieren. Allerdings gibt es auch Nachteile bei der Verwendung von isolierten Enzymen, da Zeit- und kostenintensive Aufarbeitungsschritte anfallen (Duetz et al., 2001; Gröger and Asano, 2012). Mittels großtechnischer Geräte müssen die *E. coli*-Zellen aufgebrochen werden, sowie die Zelltrümmer entfernt und die Enzyme (Rohextrakt) in eine lagerstabile Form gebracht werden. Dagegen kann bei der Verwendung von isolierten Enzymen die Reinheit je nach Bedarf selbst bestimmt werden, um gegebenenfalls *E. coli* eigene Proteine zu entfernen, die Nebenreaktionen verursachen. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei zellfreien Verfahren ist prinzipiell die schnellere Reaktionsgeschwindigkeit. Im Vergleich zum Ganzzellsystem ist hier kein Stofftransport durch die Zellwand- oder membran nötig, die eine Limitierung darstellen können. Die Zellmembran ist allerdings, gerade bei *E. coli* durch die Lagerung nicht mehr intakt, insbesondere mehrfaches Einfrieren und Auftauen führt zu permeablen Zellmembranen (Gruber et al., 2013). Als ein Nachteil für die zellfreie Reaktion kann der Zusatz an Cofaktor gesehen werden (Koeller and Wong,

Diskussion

2001; Liese, 2005). Trotz der Regenerierung insbesondere von NADPH werden diese in katalytischen Konzentrationen benötigt, die erforderliche Konzentration ist dabei durch den K_M -Wert für das jeweilige Substrat gegeben. Durch die Erhöhung der Enzymkonzentration kann eine zu niedrige intrazelluläre Konzentration an Coenzym mitunter kompensiert werden, um dennoch einen vollständigen Umsatz der Reaktion zu erzielen. Sinnvoller wäre aber eine Erhöhung der Cofaktor-Konzentration durch externen Zusatz. Als ein weiterer Nachteil könnte angesehen werden, dass durch die Verwendung von mehreren Enzymen mehrere Kultivierungen bzw. Fermentationen zur Bereitstellung der Enzyme benötigt werden. In den Schüttelkolben-Fermentationen zeigte sich, dass die HSDHs besonders gut bei niedrigeren Temperaturen (25 °C) und die Glucose-Dehydrogenase bei höheren (37 °C) exprimiert werden. So werden für die Synthese von 12-Keto-UDCA drei Enzyme benötigt, die separat hergestellt werden müssen, die bei Verwendung eines Ganzzellbiokatalysators durch eine einzige Fermentation vorliegen.

Ganzzellbiokatalysatoren

Im Vergleich zur Verwendung isolierter Enzyme stellt die Biotransformation mit ganzen Zellen eine attraktive Alternative dar (Gröger et al., 2006). Die Synthese von 12-Keto-UDCA mittels ganzer Zellen hat den Vorteil, dass nur eine Kultivierung und nicht, wie bei isolierten Enzymen, bis zu drei Kultivierung nötig sind, um die Biokatalyse durchzuführen. Die separate Fermentation des Cofaktorregenerierungsenzym als auch der HSDHs wird vermieden. Weiterhin trägt zur Kostenreduktion bei, dass ein Zellaufschluss nicht benötigt wird, wodurch die Aufarbeitungskosten wegfallen. Die Lagerfähigkeit ist im Vergleich zu isolierten Enzymen besser, da die Enzyme in ihrem natürlichen Milieu vorliegen. Daher wird eine Lagerung bei -20 °C bevorzugt, welche zusätzlich den Vorteil bietet, die Membran zu permeabilisieren, die dann außerdem den Stofftransport in und aus den Zellen erleichtert. Der Hauptpunkt für die Verwendung eines Ganzzellbiokatalysators stellt aber die erhöhte Stabilität der Enzyme dar, was ebenfalls daran liegt, dass die Enzyme in ihrer natürlichen Umgebung vorliegen (Goldberg et al., 2007). Bei Kaskadenreaktionen kann es ebenso von Vorteil sein, einen Ganzzellbiokatalysators zu verwenden, da es sowohl zeitlich als auch mengenmäßig bei *in vitro* Prozessen zu Komplikationen in der Bereitstellung der Enzyme als auch Substrate und Coenzym kommen kann (Duetz et al., 2001). Nachteilig für die Verwendung von Ganzzellbiokatalysatoren mit mehreren Enzymen ist mitunter, dass das Verhältnis der beteiligten Enzyme nicht beliebig eingestellt werden kann. Möglichkeiten zur Variation bestehen beispielsweise durch die Wahl von Ein- oder Zweiplasmid-Systemen oder der Auswahl von Plasmiden mit geeigneter Kopienzahl (Kratzer et al., 2015).

15. Bewertung der entwickelten Syntheserouten

Für die Herstellung von UDCA als auch der Vorstufe 12-Keto-UDCA kann, in Abbildung 92 dargestellt, von zwei Verbindungen ausgegangen werden, zum einen von Cholsäure und zum anderen von Chenodesoxycholsäure. Die enzymatischen Schritte sind in dieser Abbildung mit einem durchgezogenen Pfeil markiert und die chemischen mit einem unterbrochenen. Aus der Abbildung geht hervor, dass beide Ausgangsverbindungen jeweils initial direkt mit einem enzymatischen oder einem vorgeschalteten chemischen Schritt umgesetzt werden können. Weiterhin ist ersichtlich, dass, unabhängig vom Substrat, auch die gleichen Enzyme verwendet werden können. Allerdings wird bei der Nutzung von Cholsäure ein weiteres Enzym benötigt, das die α -ständige Hydroxygruppe in C₁₂-Position oxidiert, um diese dann in einer nachgeschalteten Reaktion durch die Wolff-Kishner-Reduktion entfernen zu können. In dieser Arbeit wurde eine Enzymplattform entwickelt, die je nach verwendetem Substrat eingesetzt werden kann, um an das gewünschte Produkt UDCA oder eben auch 12-Keto-UDCA zu gelangen.

15.1. Bewertung der chemoenzymatischen Syntheseroute ausgehend von Dehydrocholsäure

Für die Synthese von 12-Keto-UDCA ausgehend von DHCA (wird gewonnen durch die chemische Oxidation von CA) wurden sowohl ein Ganzzellverfahren als auch eine Biotransformation mit isolierten Enzymen entwickelt. Hier zeigte sich, dass in einer Biokatalyse unter Einsatz von Ganzzellbiokatalysatoren, aber auch mit isolierten Enzymen Produkt-Umsätze von $\geq 99\%$ erreicht werden können. Weiterhin konnten durch strukturbasierte Mutagenese die Aktivitäten der 3 α -HSDH und der 7 β -HSDH gesteigert werden. Beide Enzyme zeigten in Gegenwart von DHCA eine ausgeprägte Substratüberschussinhibierung. Die Substratüberschussinhibierung der 7 β -HSDH konnte durch rationales Design eliminiert werden. Bei der 3 α -HSDH konnte die Substratinhibierung zwar nicht vollständig beseitigt werden, die Mutante L68A wies aber zum einen eine Veränderung in der Kinetik, zum anderen auch eine gesteigerte Aktivität auf. Der Einsatz der Mutanten in einer Biotransformation, ob mit isolierten Enzymen oder in Form eines Ganzzellbiokatalysators, zeigte ebenfalls Umsatzraten von $\geq 99\%$.

Das hier vorgestellte Verfahren zur Synthese von 12-Keto-UDCA ausgehend von Dehydrocholsäure stellt ein Verfahren dar, das wesentliche Vorteile gegenüber bisherigen Verfahren bietet. Die bevorzugte Route, die in dieser Arbeit ausgiebig untersucht wurde, ist die, die von DHCA ausgeht und zu 12-Keto-UDCA führt.

Diskussion

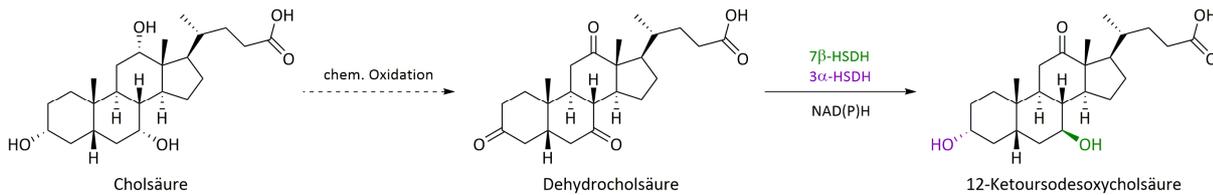


Abb. 97: Schematische Darstellung des Prozesses zur Herstellung von 12-Keto-UDCA ausgehend von Cholsäure. Die enzymatische Reaktion (DHCA zu 12-Keto-UDCA) ist mit einem durchgezogenen Pfeil und die chemische (CA zu DHCA) mit einem gestrichelten Pfeil dargestellt. Von 12-Keto-UDCA ausgehend erfolgt dann abschließend noch die Wolff-Kishner-Reduktion zur Eliminierung der 12-Keto-Gruppe.

Der gesamte Prozess besteht aus einem enzymatischen Schritt (Kombination von 2 Enzymen) sowie zwei chemischen Schritten. Cholsäure wird im ersten chemischen Schritt zu DHCA oxidiert, das kann beispielsweise mittels Natriumhypochlorit (NaOCl) oder anderen Standardmethoden der chemischen Oxidation durchgeführt werden, der zweite chemische Schritt ist die Wolff-Kishner-Reduktion, die sich nach der enzymatischen Reduktion anschließt. Dabei werden Ketogruppen durch eine relativ aggressive Reaktion entfernt. Die Reaktion wird unter anderem bei einer Temperatur von ca. 200 °C durchgeführt. Der Vorteil, der durch die Wolff-Kishner-Reduktion nebenbei entsteht, ist, dass bei diesen hohen Temperaturen alles organische Material wie Proteine oder *E. coli*-Zellen beseitigt wird. Dadurch wird das hergestellte UDCA, welches bereits das aktive Pharmazeutikum (API) darstellt, gereinigt und benötigt daher keine weiteren kostspieligen Aufreinigungsschritte. Es erfüllt somit den pharmazeutischen Qualitätsanspruch der verschiedenen Zulassungsverfahren (FDA für den Nordamerikanischen Markt, European Union (EU) export certificate list für den Europäischen Markt).

Ein wesentlicher Aspekt dieser Route ist die quantitative Überführung von DHCA in 12-Keto-UDCA. Das bedeutet, es sollte im besten Fall kein Intermediat, insbesondere das 7,12-Diketo-UDCA in der Reaktion verbleiben. Wie beschrieben, werden durch die Wolff-Kishner Reduktion die Ketogruppen eliminiert. Durch den Verbleib der Zwischenverbindung 7,12-Diketo-UDCA in der Lösung würde diese zur toxischen Gallensäure Lithocholsäure (LC; 3α-hydroxy-5β-cholan-24-oicssäure) umgewandelt werden (Bernstein et al., 2005). LC ruft schweres Fieber, Entzündungen und Zellschädigungen im Menschen hervor (Palmer and Bolt, 1971).

Neben den oben aufgeführten Vorteilen einer Biotransformation mit isolierten Zellen (Rohextrakt) wurde eine NAD⁺-abhängige 7β-HSDH erzeugt, um die Kosten des Prozesses weiter senken zu können. Die Kostenreduktion erfolgt durch den Verzicht auf den teuren Cofaktor NADP⁺. NADP⁺ ist um den Faktor 5 teurer als NAD⁺ (Preise Biomol GmbH, Mai 2014). Die Umsetzung verlief zu 99,8 % Umsatz an 12-Keto-UDCA (Kapitel 7.2.2.). Trotz des guten Umsatzes mit einem geringen Anteil an Zwischenprodukt wird von der NAD⁺-abhängigen 7β-HSDH im Vergleich zum Wildtyp die fünffache Menge an Enzyme benötigt, da die Mutante eine um rund 80 % geringe Aktivität (mit entsprechendem Cofaktor) zum Wildtyp aufweist. Diese Variante stellt somit keine kostengünstigere Alternative dar.

Diskussion

Die intrazellulären Konzentrationen an NAD(H) bzw. NADP(H) in rekombinanten *E. coli*-Zellen liegen laut Literatur bei ca. $566 \mu\text{M NAD}^+$ / $3,1 \mu\text{M NADH}$ bzw. $47,8 \mu\text{M NADP}^+$ / $0,59 \mu\text{M NADPH}$ (Schroer et al., 2009). Der K_M -Wert für NADH für die 3α -HSDH beträgt ca. $50 \mu\text{M}$, für NADPH für die 7β -HSDH ca. $20 \mu\text{M}$. Somit wird deutlich, dass die intrazelluläre Konzentration an Cofaktor ($3,1 \mu\text{M NADH}$ und $0,59 \mu\text{M NADPH}$) nicht ausreichend ist. Zusätzlich muss beachtet werden, dass nicht der gesamte Cofaktor in der Zelle frei zugänglich ist, sondern zum Teil auch an *E. coli*-eigenen Enzyme gebunden ist (Veech, 2006). Die Untersuchungen mit den konstruierten Ganzzellkatalysatoren ohne Zugabe an Cofaktor haben bestätigt, dass die intrazelluläre Konzentration an NADP^+ und NAD^+ nicht ausreichend ist, sofern eine Zellmenge von $1 \text{ mg}_{(\text{BFM})} \text{ ml}^{-1}$ in der Biotransformation eingesetzt wird. Bei Erhöhung der Zellmenge um das 20-fache konnte innerhalb einer kurzen Reaktionsdauer von ca. 5 Stunden ein vollständiger Umsatz detektiert werden (siehe Kapitel 7.3.4.). Hier zeigt sich, dass sich die Anforderungen an den Prozess mit ganzen Zellen gegenüber dem mit isolierten Enzymen nicht wesentlich geändert haben. Der Zusatz an Coenzym wird benötigt, da aus ökonomischer Sicht die Bereitstellung der Enzyme bzw. des Ganzzellbiokatalysators teurer ist als die Zugabe von Cofaktor. Um beurteilen zu können, wie viel Coenzym erforderlich ist, um eine vollständige Umsetzung zu erhalten, wurden Umsetzungen durchgeführt, in denen jeweils ein Coenzym variiert wurde. Hier zeigte sich, dass die Zugabe von sowohl $25 \mu\text{M NAD}^+$ als auch NADP^+ ausreicht, um eine vollständige Umsetzung zu erzielen (siehe Abbildung 98 und 99).

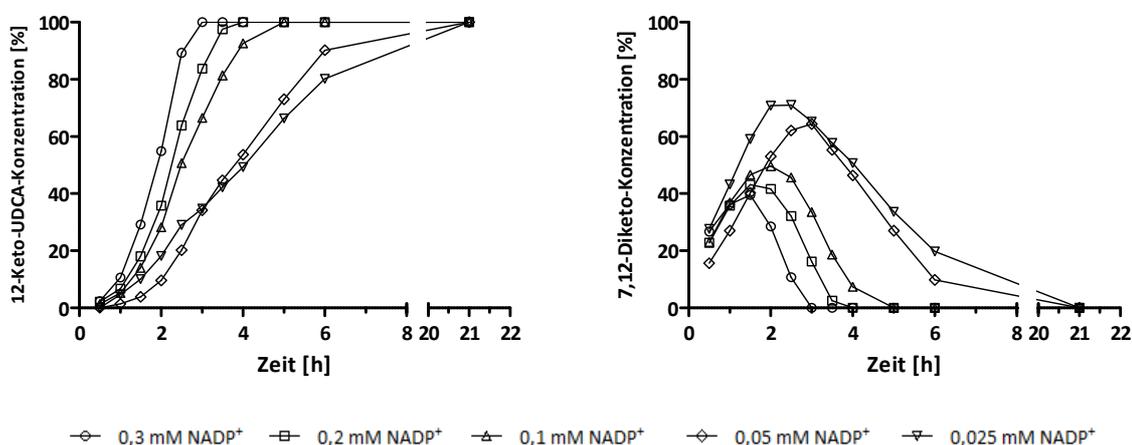


Abb. 98: Darstellung der Bildung von 12-Keto-UDCA und 7,12-Diketo-UDCA mittels Ganzzellumsetzung über einen definierten Zeitraum mit verschiedener Konzentration an NADP^+ . Die Konzentration an NAD^+ betrug konstant $0,3 \text{ mM}$.

Diskussion

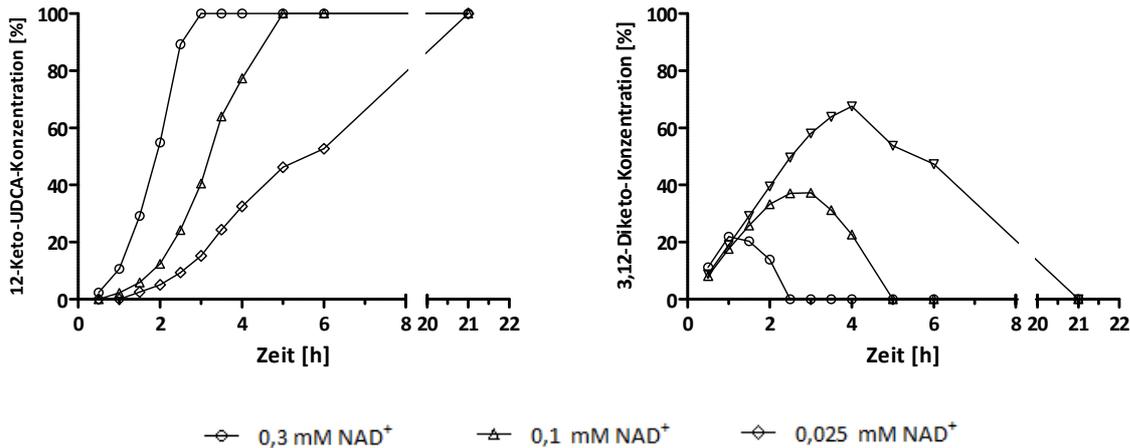


Abb. 99: Darstellung der Bildung von 12-Keto-UDCA und 3,12-Diketo mittels Ganzzellumsetzung über einen definierten Zeitraum mit verschiedener Konzentration an NAD⁺. Die Konzentration an NADP⁺ betrug konstant 0,3 mM.

In den oben gezeigten Abbildungen (linkes Bild) ist zu erkennen, dass die Bildung des Produktes 12-Keto-UDCA umso langsamer verläuft, je weniger Cofaktor NAD(P)⁺ eingesetzt wird. Weiterhin zeigt sich, dass sich das Intermediat (rechtes Bild) bezüglich des notwendigen Cofaktor-Zusatzes genauso verhält. In beiden Fällen führten die niedrigen Konzentrationen an Cofaktor zur Akkumulation der Zwischenverbindung bis zu 71 % 7,12-Diketo bzw. 68 % 3,12-Diketo-UDCA. Bei Betrachtung der K_M -Werte für das jeweilige Enzym und Substrat zeigt sich, dass die 3 α -HSDH aus *C. testosteroni* bedeutend schlechtere Werte aufweist. In Tabelle 51 sind diese Werte nochmal dargestellt. Hier zeigt sich, dass die Werte der 3 α -HSDH um mehr als den Faktor 30 schlechter sind.

Tabelle 51: K_M -Werte der beiden HSDHs für das jeweilige Intermediat und Coenzym. Die Werte sind in mM angegeben.

Enzym	K_M -Wert Intermediat	K_M -Wert Cofaktor
3 α -HSDH	2,2	0,047
7 β -HSDH	0,07	0,015

Die Akkumulation der Zwischenverbindung 7,12-Diketo ist insofern verwunderlich, da die 7 β -HSDH eine hohe Affinität zum Substrat 7,12-Diketo im Vergleich zur 3 α -HSDH besitzt. Sofern aber noch das eigentlich Startsubstrat DHCA in der Lösung vorhanden ist, wird dieses von der 7 β -HSDH umgesetzt, da die Affinität noch mal um den Faktor 3 höher ist.

Bei einem Vergleich der Biotransformation mit isolierten Enzymen gegenüber den mit ganzen Zellen, wie sie in Tabelle 52 dargestellt ist, zeigte sich, dass die Auslastung der Enzyme im Ganzzellbiokatalysator zum einen sehr unterschiedlich ist und zum anderen, dass die Aktivität in den Ganzzellbiokatalysatoren deutlich niedriger ist im Vergleich zur Nutzung isolierter Enzyme.

Diskussion

Tabelle 52: Enzymaktivitäten der einzelnen HSDHs und deren Ausnutzung bei Anwendung in einer Ganzzellbiokatalyse von DHCA zu 12-Keto-UDCA. Die Enzymaktivitäten wurden im photometrischen Test bestimmt, die Zellaktivität aus den Kinetiken der Umsetzungen ermittelt.

Konstrukt	Enzymaktivität pro g Zellen [U]			Zellaktivität [U g ⁻¹]	^a Ausnutzung [%]	
	3α-HSDH	7β-HSDH	GDH		3α-HSDH	7β-HSDH
<i>E. coli</i> . DB02	104	220	1000	10	9,6	4,5
<i>E. coli</i> . DB03	108	380	1320	11	10,2	2,9
<i>E. coli</i> . DB04	60	248	988	8,5	14,2	3,4

$$^a = (\text{Zellaktivität} / \text{Enzymaktivität}) * 100$$

In Tabelle 52 ist ein Vergleich der Aktivitäten zwischen isolierten Enzymen und ganzen Zellen im Prozess DHCA zu 12-Keto-UDCA dargestellt. Die Berechnung der Zellaktivität in den Ganzzellbiokatalysatoren ergab, dass diese deutlich geringer sind als im Vergleich die Enzymaktivitäten der aufgeschlossenen GZKs erwarten lassen. Die Aktivität der einzelnen HSDHs lag zwischen 3% (7β-HSDH im GZK DB03) und 14 % (3α-HSDH im GZK DB04). Im Vergleich liegen die ermittelten Werte relativ nahe an dem Literaturwert, der in der Regel mit ca. 7 % beschrieben wird (Kratzer et al., 2015).

Wie bereits erwähnt ist der interne Cofaktorpool an NAD(H) gegenüber NADP(H) in *E. coli* um den Faktor 6 grösser. Bei Betrachtung der prozentualen Aktivität könnte dies eine gute Erklärung sein, warum die Aktivität der 3α-HSDH gegenüber der NADP⁺-abhängigen 7β-HSDH um den Faktor 2 bis 4 höher ist. Intrazellulär kann das NADH-abhängige Enzym auf eine im Vergleich zum Cofaktor NADP⁺ höhere Konzentration an Cofaktor zugreifen und somit eine höhere Ausnutzung bzw. höhere Aktivität erreichen.

Es konnte somit in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass eine geringe Menge an Cofaktor (25 μM NAD(P)⁺) nötig ist, um eine vollständige Umsetzungen innerhalb kurzer Zeit zu erzielen. Die Biotransformationen mit einer Konzentration von 25 μM NADP⁺ zeigten in einigen wenigen präparativen Ansätzen allerdings eine unvollständige Umsetzung. Überraschenderweise zeigt sich in den höhervolumigen Ansätzen eine Akkumulation des Intermediats 7,12-Diketo-UDCA. Das kann zwei Ursachen haben: Zum einen haben Stabilitätstests gezeigt, dass die 7β-HSDH kein übermäßig stabiles Enzym ist, so dass dieses Enzym im größervolumigen Ansatz inaktiviert sein könnte. Zugabe von neuem Protein während der Reaktion hat allerdings keinen weiteren Umsatz gezeigt. Der andere Grund könnte in der Cofaktor-Versorgung liegen. Tatsächlich startete die Reaktion durch die Zugabe von neuem Coenzym erneut. Offensichtlich wurde NADP(H) während der Reaktion abgebaut, möglicherweise durch Dephosphorylierung. Analytisch ist das sehr schwer zu erfassen, daher wurden dazu keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass durch Verdopplung der Konzentration (50 μM) nun ein vollständiger Umsatz stattfand (Kapitel: 7.3.). Weitere

Diskussion

Untersuchungen zur Optimierung der Reaktion sollten sich daher mit dem Aspekt beschäftigen, ob ein enzymatischer Abbau von Nicotinamid-Cofaktoren durch *E. coli*-eigene Enzyme stattfindet. Das hätte auch grundlegende Bedeutung für Anwendungen mit Dehydrogenasen.

Der Ansatz, von DHCA ausgehend 12-Keto-UDCA herzustellen, der in dieser Arbeit etabliert wurde, stellt im Vergleich zu anderen Verfahren eine bedeutend kostengünstigere Methode dar. Monti et al. (2009) erreichte mit 12,5 mM CA zwar eine vollständige Biotransformation (zu 12-Keto-UDCA), allerdings konnten bei höheren Ausgangskonzentrationen keine vollständige Umsetzung erreicht werden (Monti et al., 2009). Ausserdem wurden für diese Biotransformation insgesamt 5 Enzyme benötigt, die weitere Enzymherstellungskosten verursachen. Carrea et al. (1992) haben in einem Verfahren 12,5 mM DHCA innerhalb 15 Stunden nahezu vollständig zu 12-Keto-UDCA umgesetzt. Allerdings wurden hier nicht-rekombinante Wildtyp-Enzyme eingesetzt, dabei hat sich gezeigt, dass es Probleme beim Umsatz höherer Substratkonzentrationen gibt, wahrscheinlich bedingt durch störende Fremdenzyme aus den jeweiligen Wildtyp-Stämmen. Ein anderes beschriebenes Verfahren geht zwar auch von DHCA aus, hier wurde allerdings 12-Ketochenodeoxycholsäure hergestellt, welches die Vorstufe von CDCA darstellt (Sawada et al., 1980). CDCA besitzt im Vergleich zu UDCA in der Behandlung von Gallensteinen diverse Nebenwirkungen wie z.B. eine erhöhte Lebertoxizität (Hofmann, 2009; Leuschner et al., 1989).

15.2. Bewertung der enzymatischen Syntheseroute aus Cholsäure

Das hier vorgestellte Prinzip zur Synthese von 12-Keto-UDCA ausgehend von Cholsäure beinhaltet von Anfang an drei enzymatische Schritte, dem ein chemischer Schritt (Wolff-Kishner) angeschlossen ist, der wie bei den anderen Syntheseschritten nicht Bestandteil dieser Arbeit ist. Im Gegensatz zur Synthese ausgehend von DHCA wurde hier keine Prozeßoptimierung untersucht, sondern lediglich ein *proof of concept* durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die chemoenzymatische Syntheseroute (Kapitel 9.3.) von zwei chemischen und einem enzymatischen Schritt zu einem einzigen chemischen Schritt und zwei enzymatischen Schritten geändert werden konnte. Dank der hohen Regio- und Enantiospezifität der beteiligten HSDHs kann ein nahezu vollständiger Umsatz erzielt werden, bei der chemischen Oxidation beträgt der Umsatz ca. 80 %. In Abbildung 100 ist das Reaktionsschema dargestellt.

Diskussion

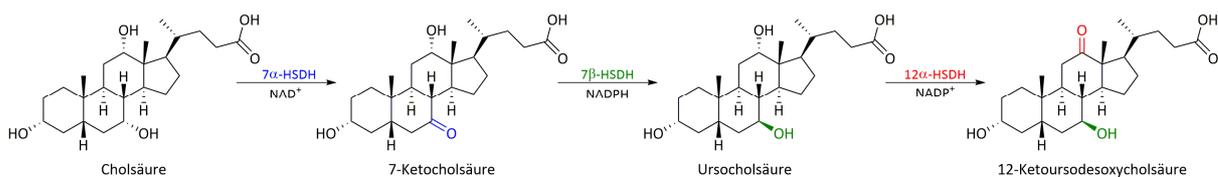


Abb. 100: Schematische Darstellung der alternativen Syntheseroute zur Herstellung von 12-Keto-UDCA ausgehend von CA. Der 1. enzymatische Schritt beinhaltet die Epimerisierung der α -ständigen Hydroxylgruppe an C₇-Position zur β -ständigen Hydroxylgruppe (Ursocholsäure). Der 2. Schritt beinhaltet die enzymatische Oxidation der α -ständigen Hydroxylgruppe an C₁₂-Position der Ursocholsäure zu 12-Keto-UDCA.

Die enzymatische Synthese, wie sie in Abbildung 100 dargestellt ist, stellt eine „one-pot“ Kaskadenreaktion dar, in der 6 Enzyme auf 2 Ganzzellbiokatalysatoren aufgeteilt sind. Für den 1. Schritt wird die Epimerisierung der α -ständigen Hydroxylgruppe am C₇-Atom des Sterangerüst zur β -ständigen Hydroxylgruppe (Ursocholsäure) durchgeführt. Hierfür wurden die bekannte NADPH-abhängige 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* (Liu et al., 2011) sowie die literaturbekannte NAD⁺-abhängige 7 α -HSDH aus *E. coli* (Yoshimoto et al., 1991) und zwei weitere Cofaktor-regenerierende Enzyme auf zwei Plasmiden zu einem *designer bug* konstruiert. Für den 1. Schritt, der Oxidation von CA zu 7-Ketocholsäure, wurde das in dieser Arbeit etablierte System NADH-Oxidase/O₂ verwendet, das in der Oxidation von Chenodesoxycholsäure eingesetzt wurde. Die verwendete NADH-Oxidase (NOX) aus *L. brevis* ist ein rein NAD⁺-abhängiges Enzym (Geueke et al., 2003; Hummel and Riebel, 2003), genauso wie die 7 α -HSDH aus *E. coli*. Durch die Verwendung einer NOX ist die Cofaktorregenerierungsreaktion irreversibel und das thermodynamische Gleichgewicht liegt vollständig bei 7-Ketocholsäure. Als Reaktionspartner dient Sauerstoff, der als Wasserstoffakzeptor fungiert. Sauerstoff ist ubiquitär und liegt wie der Cofaktor intrazellulär in der *E. coli*-Zelle vor. Für die Regenerierung des NADPH wurde für die Reduktion das System ADH/Isopropanol gewählt, da das entstehende Aceton sehr leicht der Reaktion entzogen werden kann und somit ein thermodynamisches Gleichgewicht in Richtung des Produkts Ursocholsäure entsteht. Weiterhin ist die verwendete ADH aus *L. kefir* rein NADPH-abhängig (Hummel et al., 1989; Niefind et al., 2003), wohingegen die Verwendung einer GDH, die beide Nikotinamidadenindinukleotide akzeptiert, in dieser Reaktion nachteilig ist. Bei Verwendung einer GDH würde diese ebenfalls den Cofaktor NAD⁺, der für die Oxidationsreaktion benötigt wird, zu NADH reduzieren also eine störende Nebenreaktion bewirken, die den ersten Schritt der Oxidation von CA nicht mehr möglich macht. Diese Epimerisierung stellt den 1. Schritt der Synthese dar und nach der Reaktion kann durch einen kurzen Hitzeschock der erste GZK inaktiviert werden, um unerwünschte Nebenreaktion im folgenden 2. Schritt zu vermeiden. Diese Strategie wurde auch bei der Synthese von UDCA ausgehend von CDCA benutzt, da eine GDH verwendet wurde und die Epimerisierung deshalb sequentiell ablief (Bovara et al., 1993; Zheng et al., 2015).

Für den 2. Schritt, die Oxidation der Ursocholsäure zu 12-Keto-UDCA, wurde die literaturbekannte 12 α -HSDH aus *Clostridium* sp. group P verwendet (Braun et al., 1991). Dadurch, dass diese HSDH

Diskussion

NADP⁺-abhängig ist, kann allerdings zum einen nicht die NOX aus *L. brevis* verwendet werden, zudem ist es nicht möglich, diesen Schritt mit den anderen enzymatischen Schritten zu kombinieren. Für die Regeneration des NADP⁺ wurde daher die NOX aus *L. plantarum* kloniert, und dieses Enzym, da es als Wildtyp ebenfalls NAD⁺ annimmt, durch Mutagenese zu einer NADP⁺-abhängigen Oxidase geändert (Park et al., 2011).

Im Verlauf dieser Arbeit wurden ein Ganzzellbiokatalysator mit der 12 α -HSDH sowie der NADP⁺-abhängigen LpNOX konstruiert und in der multienzymatischen Kaskadenreaktion eingesetzt. Im 1. Schritt konnte ein Umsatz von $\geq 99\%$ detektiert werden und nach dem anschließenden 2. Schritt konnte ein Umsatz von $\geq 95\%$ 12-Keto-UDCA gemessen werden. Die hohen Umsatzraten sind darauf zurückzuführen, dass bei jeder Einzelreaktion in der Kaskadenreaktion ein thermodynamisches Gleichgewicht auf der Seite des jeweiligen Produktes liegt, welches durch den Einsatz der jeweiligen Cofaktor-regenerierenden Enzyme, speziell den jeweiligen NAD(P)H-Oxidase, hervorgerufen wird.

Im Vergleich mit der Literatur konnte somit in der Arbeit das erste industriell relevante System zur Synthese von 12-Keto-UDCA vorgestellt werden. Monti et al., haben 2009 ein ähnliches multienzymatisches Verfahren zu 12-Keto-UDCA, ausgehend von 12,5 mM CA, publiziert. Sie konnten in ihrer Kaskadenreaktion mit 5 isolierten Enzymen nach 5 Stunden einen nahezu vollständigen Umsatz feststellen. Einen vollständigen Umsatz konnten Sie allerdings nicht erzielen, was darauf zurückzuführen ist, dass eine GDH aus *Thermoplasma acidophilum* genutzt wurde, die zwar eine hohe Affinität für den Cofaktor NADPH besitzt, aber auch den Cofaktor NADH mit einer niedrigeren Affinität annimmt. Diese fehlende Spezifität gegenüber dem Cofaktor zeigt sich dann besonders bei längeren Reaktionslaufzeiten, es wurden unerwünschte Nebenprodukte wie Ursocholsäure detektiert (Monti et al., 2009). Das verwendete Lactat-Dehydrogenase/Pyruvat-System zur Regenerierung des NAD⁺ ist gegenüber den in dieser Arbeit verwendete NOX/O₂-System unvorteilhaft, da Pyruvat extern der Reaktion zugefügt werden muss und die Lactat-Dehydrogenase-Reaktion reversibel ist. Weiterhin ist das hier verwendete ADH/Isopropanol-System von Vorteil, da die verwendete ADH spezifisch gegenüber NADPH ist, zudem wird durch den Zusatz von Isopropanol bei höheren Konzentrationen an Gallensäuren die Viskosität der Lösung vorteilhaft erniedrigt. Durch die amphiphile Eigenschaft der Gallensäuren fallen sie ab einer relativ niedrigen Konzentration aus und erhöhen so die Viskosität der Lösung.

Einen anderen Weg publizierten Giovannini und Mitarbeiter, sie haben einen Mikroorganismus identifiziert, der sowohl eine 7 α - als auch eine 12 α -HSDH besitzt, die dieselbe Cofaktorabhängigkeit besitzen. Über mehrere Aufreinigungsprozeduren konnten sie die beiden Proteine aufreinigen und separat in die Reaktion einsetzen. Zuerst erfolgte die Oxidation der α -ständigen Hydroxylgruppe an C₁₂, in der Folge wurde diese Gruppe dann durch die Wolff-Kishner Reduktion entfernt. Anschließend

wurde die α -ständige Hydroxylgruppe an C₇ oxidiert und das entstandene 7-KLCA chemisch zu UDCA reduziert. Die Gesamtausbeute an UDCA, die gewonnen wurde, wird mit 70 % angegeben, was für einen präparativen Ansatz, insbesondere im Vergleich zu den alternativen enzymatischen Umsetzungen, deutlich zu gering ist, da das UDCA durch die chemische unspezifische Reduktion aufwendig vom Nebenprodukt CDCA getrennt werden müsste. Bei beiden enzymatischen Oxidationen wurde eine Lactat-Dehydrogenase mit dem Cosubstrat Pyruvat eingesetzt (Giovannini et al., 2008).

1982 wurde ein rein enzymatischer Syntheseweg von CA zu 12-Keto-UDCA publiziert, hier konnten aber nur rund 40 % Ausbeute nachgewiesen werden. Die geringe Ausbeute ist vermutlich auf fehlende Cofaktorregenerierungsenzyme zurückzuführen. Weitere chemoenzymatische Umsetzungen aus den 1980-er Jahren, die direkt zu UDCA führten, ergaben ebenfalls niedrigere Umsätze von 50 % (Sutherland et al., 1982).

15.3. Bewertung der Syntheseroute ausgehend von CDCA

Als weiteres Startmaterial kann außer DHCA bzw. Cholsäure (Bovara et al., 1996, 1993; Carrea et al., 1985; Monti et al., 2009) noch Chenodesoxycholsäure (CDCA) (Medici et al., 2002; Pedrini et al., 2006) verwendet werden (siehe Abbildung 101). Letzteres wurde in dieser Arbeit ebenfalls ausführlich bearbeitet. Ein Vorteil, ausgehend von CDCA, ist, dass die Hydroxylgruppe am C₃-Atom schon in der α -ständigen Position ist und insgesamt nur noch eine Epimerisierung am C₇-Atom, also eine Oxidation der α -Hydroxylgruppe mit anschließender Reduktion zur β -ständigen Hydroxylgruppe stattfinden muss. Ausgehend von CA muss dann abschließend noch die Hydroxylgruppe an der C₁₂-Position zur Carbonylgruppe oxidiert und mittels einer Wolff-Kishner-Reduktion entfernt werden. Insbesondere die Epimerisierung der α - zur β -ständigen Hydroxylgruppe am C₇-Atom stellt eine besondere Hürde dar, da sie chemisch als auch enzymatisch schwer zu realisieren ist.

In der Literatur wurden bisher Experimente zu einer solchen Epimerisierung mit ganzen Zellen beschrieben, dabei wurden allerdings Wildtyp-Zellen statt rekombinanter *designer bugs* eingesetzt (Dean et al., 1999; Kole and Altosaar, 1985; Lepercq et al., 2004b; Macdonald et al., 1982; Macdonald and Hutchison, 1982; Medici et al., 2002; Sutherland and Macdonald, 1982). Hierbei wurde wie in dieser Arbeit die „einstufige“-Biotransformation, also ohne zusätzliche Cofaktorregenerierungsenzyme versucht, aber bei allen publizierten Versuchen stellte sich, da es sich um reversible enzymatische Schritte handelt, ein Gleichgewicht ein. Die Endkonzentration liegt zwar deutlich beim gewünschten Produkt UDCA, über eine Endkonzentration von ca. 74 % bis 80 % kommt man aber bei

Diskussion

Beendigung der Reaktion nicht hinaus. Zusätzlich wurden auch Versuche durchgeführt, in denen aus Fermentationen der Wildtyp-Zellen die Proteine aufwendig aufgereinigt und diese dann in Biotransformationen ohne oder auch mit den unterschiedlichsten Cofaktorregenerierungs-Enzymen eingesetzt wurden (Bovara et al., 1993; Giovannini et al., 2008; Pedrini et al., 2006). Aber auch in diesen Umsetzungen wurde kein vollständiger Umsatz erreicht, die Endkonzentration an UDCA pendelte sich, wie bei den Ganzzell-Versuchen, bei ca. 75 % ein.

Eine weitere Methode, die in der Literatur von Cao und Mitarbeiter beschrieben wird, ist die elektrochemische Umwandlung von Chenodesoxycholsäure zu 7-Ketolithocholsäure, gefolgt von einer elektrochemischen Reduktion zu UDCA. Im ersten Schritt, der Oxidation von CDCA zu 7-KLCA, wird in Gegenwart von Bromid eine definierte Stromstärke an eine Anode aus Blei(IV)-oxid/Titan angelegt, dabei wird das Bromanion zum elementaren Brom oxidiert und dieses wiederum oxidiert CDCA zu 7-KLCA. Dieser letzte Schritt regeneriert dann das Bromid, so dass, ähnlich wie bei enzymatischen Regenerierungsmethoden, der Prozeß kontinuierlich mit eher katalytischen Mengen an Bromid ablaufen kann (Zhao et al., 2010). Im zweiten Schritt, der Reduktion zu UDCA wird ein ähnliches Verfahren benutzt, in diesem Fall mit DMSO als Zusatz. Insgesamt erreicht man aber auch hier keinen vollständigen Umsatz. Im Vergleich mit den rein enzymatischen Epimerisierungsreaktionen liegt der Umsatz leicht höher bei ca. 88 %, die Ausbeute an UDCA liegt dann bei ca. 72 % liegt (Huang and Cao, 2015).

15.3.1. Enzymatische Synthese

Für den ersten oxidativen Schritt wird eine 7 α -HSDH benötigt, die die α -Hydroxylgruppe an der C₇ Position zur Ketogruppe oxidiert. Es sind zwei Arten von mikrobiellen Enzymen beschrieben, die eine solche Umsetzung katalysieren. Sie unterscheiden sich in ihrer Cofaktorspezifität, es gibt also NAD⁺ oder NADP⁺-abhängige 7 α -HSDHs. NAD⁺-abhängige Enzyme sind z.B. aus *E. coli* (Tanabe et al., 1998; Yoshimoto et al., 1991), *Clostridium scindens* (Bennett et al., 2003) und *Stenotrophomonas maltophilia* (Pedrini et al., 2006) bekannt, NADP⁺-abhängige aus *C. absonum* (Ferrandi et al., 2011; Lou et al., 2016) und *Eubacterium* sp. (Dawson et al., 1996). Für den zweiten reduktiven Schritt wird eine 7 β -HSDH benötigt, die die Carbonylgruppe in eine β -ständige Hydroxylgruppe reduziert. In dieser Arbeit wurden zwei Strategien, UDCA ausgehend von CDCA zu synthetisieren, verfolgt: eine „einstufige“ und eine „zweistufige“ Umsetzung. Bei der zweistufigen Biotransformation werden im Vergleich zur einstufigen Oxidation und Reduktion getrennt betrachtet und über verschiedene Cofaktorregenerierungs-Enzyme voneinander getrennt. Das hat zum einen den Vorteil, dass das thermodynamische Gleichgewicht jeder

Diskussion

Teilreaktion auf der Seite des Produktes ist. Andererseits werden dazu weitere Enzyme benötigt, die wiederum auch Cosubstrate benötigen, die der Reaktion extern hinzugefügt werden müssen. Bei dem Einsatz von Cofaktorregenerierungsenzymen ist es sehr wichtig, dass die 7 α - und 7 β -HSDH unterschiedliche Cofaktorspezifitäten aufweisen, um die Oxidation auf diese Weise von der Reduktion zu trennen. Durch diese Trennung in einem „one-pot“ System wird gewährleistet, dass keine Kreuzreaktionen verursacht werden. Für die einstufige Biotransformation, also ohne externe Cofaktorregenerierungsenzyme, werden dagegen HSDs mit derselben Präferenz benötigt.

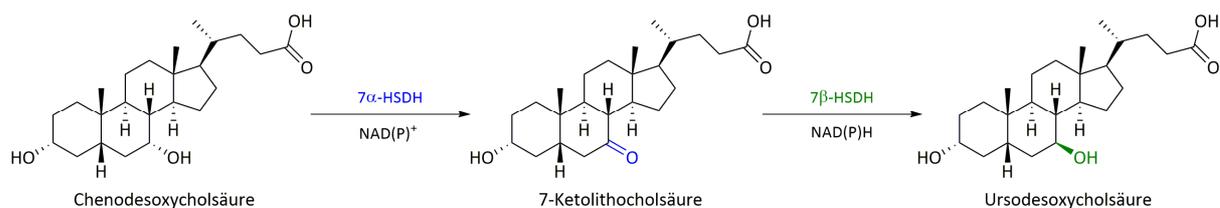


Abb. 101: Schematische Darstellung der alternativen Syntheseroute zur Herstellung von UDCA ausgehend von CDCA. Die Syntheseroute beinhaltet lediglich einen enzymatischen Schritt, die Epimerisierung der α -ständigen Hydroxylgruppe an C7-Position zur β -ständigen Hydroxylgruppe. Die Cofaktorregenerierung kann durch die HSDhs (interne Regenerierung; einstufiger Prozess) oder durch externe Dehydrogenasen (externe Regenerierung; zweistufiger Prozess) erfolgen.

Für die einstufige Biotransformation (Schema siehe Abbildung 101) gibt es wiederum zwei Möglichkeiten, die durch die beiden Cofaktoren NAD⁺ und NADP⁺ bedingt sind. Für die Variante mit NAD⁺ als Coenzym spricht einerseits, dass der Cofaktor billiger sowie stabiler als die unphosphorylierte Form ist und das für den oxidativen Schritt mit der *E. coli* 7 α -HSDH ein hoch aktives Enzym zur Verfügung steht. Für den reduktiven Schritt wird daher eine NAD⁺-abhängige 7 β -HSDH benötigt. Da bislang alle publizierten 7 β -HSDH NADP⁺-abhängig sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit die NADPH-abhängige 7 β -HSDH aus *C. aerofaciens* so verändert, dass diese nur noch die unphosphorylierte Form akzeptiert. Alternativ wurde auch die Biotransformation mit NADP⁺-abhängigen Enzymen untersucht, da für den reduktiven Schritt auf die bereits vorhandene optimierte 7 β -HSDH zurückgegriffen werden konnte, die eine gesteigerte Aktivität besitzt (Kapitel 5.1.2.4.). Für den oxidativen Schritt konnte eine neue, NADP⁺-abhängige 7 α -HSDH aus *Clostridium difficile* durch ein *in silico*-Screening identifiziert werden. Dieses Enzym wurde in der Folge dann kloniert und das rekombinante Enzym biochemisch umfassend charakterisiert (Kapitel 5.4.). Des Weiteren wurde die NAD⁺-abhängige 7 α -HSDH aus *E. coli* durch rationale Mutagenese in eine NADP⁺-abhängige Variante überführt (Kapitel 5.3.2.). Damit konnte ein weiteres System aufgebaut werden, das die gut-aktive NADP⁺-abhängige 7 β -HSDH verwendet, diesmal in Kombination mit der 7 α -HSDH aus *E. coli*. Da letzteres Enzym in der NAD⁺-abhängigen Wildtyp-Form hoch aktiv ist, ist ein Aktivitätsverlust einer NADP⁺-abhängigen Mutante problemlos hinnehmbar. Ein erfolgreicher Cofaktorswitch konnte an der Variante D42G/I43R festgestellt werden, der apparente v_{\max} -Wert betrug im Vergleich zum Wildtyp

Diskussion

noch ca. 91 % (v_{\max} des Wildtyp: 183,9 U mg^{-1} mit NAD^+ und v_{\max} D42G/I43R: 167,8 U mg^{-1} , jeweils mit 0,5 mM NAD(P)^+ und variierende Konzentration an CDCA).

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl Systeme für „einstufige“- als auch „zweistufige“-Verfahren mit rekombinanten Enzymen (isolierten Enzymen als auch mit Ganzzellbiokatalysatoren) entwickelt werden. Die „einstufigen“ Synthese, also ohne externe Cofaktorregenerierungs-Enzyme, stellt zwar ein innovatives Konzept dar, allerdings konnte kein vollständiger Umsatz erzielt werden. Für das Konzept mit NADP^+ als Coenzym konnte mit isolierten Enzymen ein Umsatz von ca. 63 % gemessen werden und ein etwas höherer Umsatz von ca. 74 % mit dem Ganzzellbiokatalysator, der die NADP^+ -abhängige Variante der 7α -HSDH aus *E. coli* zusammen mit der 7β -HSDH [G39S/R64E] Variante enthielt. Für das Konzept mit NAD^+ als Coenzym wurde sowohl der Wildtyp der 7α -HSDH aus *E. coli* als auch die NAD^+ -abhängigen G39E-Mutante der 7β -HSDH verwendet. Nach 24 Stunden konnte hier lediglich ein Umsatz von ca. 38% festgestellt werden. Aufgrund der fehlenden Cofaktorregenerierungs-Enzyme, die das thermodynamische Gleichgewicht auf Seiten des Produktes ziehen, ist der unvollständige Umsatz bei dem einstufigen System zu erklären, damit bewegt sich das Ergebnis im Rahmen der literaturbeschriebenen Daten für dieses System.

Für die „zweistufige“ Synthese, also mit externen Cofaktorregenerierungs-Enzymen, wurden für die Versuche mit isolierten Enzymen die NOX aus *L. brevis* für die Regenerierung des NAD^+ und die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) aus *E. coli* für die Regenerierung des NADPH gewählt. Hier zeigte sich in ersten Versuchen ein Umsatz von ca. 87 %. Das war unerwartet, da eigentlich mit einem vollständigen Umsatz zu rechnen war, der Grund war höchstwahrscheinlich aber eine Instabilität der G6PDH. Das wurde durch die detaillierte HPLC-Analyse der Umsetzung bestätigt, da eine Akkumulation der Zwischenverbindung 7-KLCA bei gleichbleibender Konzentration an UDCA festgestellt wurde. Das heisst, der zweite Schritt, die Reduktion von 7-KLCA fand nicht mehr statt, wobei das eigentlich reduzierende Enzym, die 7β -HSDH, sich in zahlreichen Umsetzungen als hinreichend stabil erwiesen hat, so dass für die unvollständigen Umsätze nur das Regenerierungssystem in Frage kommt. Daher hat es sich angeboten, ein alternatives Cofaktorregenerierungs-System einzusetzen, wobei wir uns für eine Alkohol-Dehydrogenase entschieden haben. Fossati und Mitarbeiter haben den Einfluß sowohl von Aceton als auch von 12-Ketochenodesoxycholsäure auf die 12α -HSDH und auf drei weitere ADHs untersucht, eine davon war die ADH aus *L. brevis*, die der LkADH sehr ähnlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass durch hohe Konzentrationen an Aceton und auch an der Gallensäure 12-Ketochenodesoxycholsäure die Aktivität der ADH zwar abnimmt, trotzdem aber noch genügend Aktivität vorhanden bleibt, um Biotransformationen durchzuführen (Fossati et al., 2006). Der Wechsel zur Glucose-Dehydrogenase wäre in dieser Reaktion, wie auch bei der Synthese von CA zu 12-Keto-UDCA nachteilig, da die GDH sowohl die phosphorylierte als auch unphosphorylierte Form des

Diskussion

Cofaktors akzeptiert und somit das NAD^+ , das als Akzeptor für die Oxidation benötigt wird, zu NADH reduziert.

Um den erzielten Umsatz im zweistufigen Prozess mit isolierten Enzymen von 87 % weiter zu verbessern, bedarf es noch weiterer Optimierungsarbeit. In dieser Arbeit wurde der Fokus eher auf Ganzzellbiokatalysatoren gelegt. So wurden, wie in Kapitel 5.5.2. bereits erwähnt, zwei Ganzzellbiokatalysatoren konstruiert, die jeweils dieselben Plasmide mit der NAD^+ -abhängigen 7α -HSDH aus *E. coli* und der NADPH-abhängigen 7β -HSDH aus *C. aerofaciens* sowie die beiden Cofaktorregenerierungsenzyme LbNOX und LkADH beinhalteten. Der Unterschied in den beiden GZKs liegt in dem verwendeten Expressionshost. Bei allen Experimenten musste zuvor ein knock-out *E. coli* BL21(DE3) benutzt werden, der das chromosomale 7α -HSDH-Gen nicht mehr besitzt. Für die Epimerisierung der Hydroxylgruppe am C_7 -Atom des Sterangerüst wird eine 7α -HSDH benötigt, daher kann auch der normale *E. coli* BL21(DE3) verwendet werden. In den Experimenten zeigte sich, dass beide Expressionshosts verwendet werden können, es wurde kein Unterschied in den ermittelten Umsätzen festgestellt. Das liegt vermutlich daran, dass die Aktivität der chromosomalen 7α -HSDH sehr gering ist.

In den ersten Experimenten wurde der pH-Bereich untersucht, in denen die höchste Bildungsrate an UDCA ermittelt werden konnte. Hier zeigte sich die höchste Konzentration an UDCA nach 3 als auch nach 24 Stunden bei einem pH-Wert von 6,0. Vergleicht man jetzt die pH-Optima der Proteine, ist der ermittelte pH-Wert nicht verwunderlich, da zwei der vier eingesetzten Enzyme ihr Optima bei pH 6 besitzen, wie in Tabelle 53 dargestellt ist.

Tabelle 53: Vergleich der pH-Optima der eingesetzten Enzyme in der zweistufigen Synthese von UDCA.

Enzym	pH-Optimum	^{a)} pH-Bereich	Quelle
7α -HSDH	8,5	8,5 - 10	(Prabha et al., 1990; Yoshimoto et al., 1991)
7β -HSDH	6,0	6,0 - 7,0	diese Arbeit
LbNOX	6,0	5,5 - 6,5	(Geueke et al., 2003)
LkADH	9,0	5,0 - 9,0	(Hummel et al., 1989)

^{a)} Der Bereich, in der 50 % Restaktivität gemessen werden konnte.

Tabelle 53 verdeutlicht ausserdem, dass die 7α -HSDH anhand der Literaturwerte ein alkalisches Milieu bevorzugt. Die LkADH dagegen hat einen sehr großen Bereich, so dass wahrscheinlich die 7β -HSDH oder LbNOX bei alkalischen pH-Werten und die 7α -HSDH bei sauren Bedingungen nur eine begrenzte Stabilität aufweisen. Zwar liegen die Proteine in *E. coli* als Ganzzellbiokatalysator in ihrem natürlichen Milieu vor und weisen somit eine höhere Stabilität auf, aber die Membran von *E. coli* ist nicht sehr

Diskussion

stabil und durch das wiederholte Einfrieren und wieder Auftauen wird die Membran permeabilisiert, was dazu führt, dass sich das Cytosol mit der Reaktionslösung vermischt.

Weiterhin stellte sich heraus, dass phosphathaltige Puffer eine langsamere Umsatzrate in der Bildung von UDCA besitzen. So ist nach 3 Stunden ca. 30 % UDCA im Zitronensäurephosphatpuffer gebildet worden, während im Zitronensäurepuffer ohne Phosphat zur gleichen Zeit bereits 77 % UDCA nachgewiesen wurde. Ein ähnliches Bild wurde beim Kaliumphosphatpuffer (pH 6) beobachtet, nach 3 Stunden konnte ca. 19 % UDCA und nach 24 Stunden ca. 46 % UDCA nachgewiesen werden, also auch hier eine deutliche Inhibierung der Gesamtreaktion durch Phosphat. Die biochemische Ursache für diese Inhibierung ist nicht bekannt, bislang sind Einflüsse auf die Aktivität der HSDHs durch Phosphat nicht beobachtet worden, allerdings wurde ein solcher Einfluß bislang auch nicht näher untersucht. Anschließend wurde das Verhältnis der beiden Cofaktoren untersucht. Hier zeigte sich, dass NADP⁺ für die Reduktion leicht im Überschuss vorhanden sein sollte. Nach 3 Stunden im Zitronensäurepuffer (pH 6) mit 0,3 mM NAD⁺ und 0,6 mM NADP⁺ konnte ein Umsatz von ca. 96 % gemessen werden, nach 24 Stunden sogar ein Umsatz \geq 99 %. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass bei einer 4-mal so hohen Konzentration an NADP⁺ bedeutend weniger UDCA gebildet wird. Nach 3 Stunden sind ca. 45% und nach 24 Stunden nur noch ca. 33% nachweisbar. Das deutet darauf hin, dass ein Enzym zur Regenerierung des Cofaktors inaktiviert wurde. Die HPLC-Analyse hat gezeigt, dass der unvollständige Umsatz auf nicht-umgesetztes Edukt zurückzuführen ist. Das bedeutet, dass in diesem Fall der erste Schritt, die Oxidation von CDCA nur partiell stattgefunden hat. Auch hier kann man argumentieren, dass das Gallensäure-oxidierende Enzym, die 7 α -HSDH als relativ stabiles Enzym bekannt ist, so dass es wahrscheinlich ist, dass der unvollständige Umsatz auf eine Inaktivierung der NADH-Oxidase zurückzuführen ist. Mit NAD⁺ konnte Findrik et al., nachweisen, dass die LbNOX inhibiert wird (Findrik et al., 2008). Möglicherweise wird dieses Enzym durch die höhere Menge an NADP⁺ in der Reaktion inhibiert oder inaktiviert. Allerdings muss bei allen Gallensäure-umsetzenden Reaktionen auch berücksichtigt werden, dass Gallensäuren als amphiphile oberflächenaktive Substanzen grundsätzlich problematische Verbindungen für viele Enzyme darstellen

Zusätzlich wurde in diesen Systemen die Menge an Isopropanol variiert bzw. optimiert, da der Alkohol als Cosubstrat dient und ab einer bestimmten Konzentration auf Dehydrogenasen inhibierend oder inaktivierend wirken kann. Es zeigte sich, dass bis zu 10% Isopropanol keine Beeinträchtigung bewirken. Bei 15% Isopropanol sanken sowohl der Umsatz als auch die Bildungsrate an UDCA, mit 20% Isopropanol wurde dann gar kein UDCA mehr detektiert. Vorherige Arbeiten zeigten, dass die LkADH sehr hohe Konzentration an Isopropanol (bis 60 %) ohne Aktivitätsverlust aushält, daher liegt die Vermutung nahe, dass entweder eine der beiden HSDHs oder die NADH-Oxidase durch höhere Konzentrationen an Isopropanol inaktiviert werden. Auch hier muss zudem mit einem negativen

Diskussion

Einfluß der Gallensäuren gerechnet werden. Dieser Einfluß könnte durch kontinuierliche Zugabe an Isopropanol umgangen werden, so dass das Volumenverhältnis nicht über 5 % (v/v) der Gesamtreaktion überschritten wird.

In dieser Arbeit konnte somit durch erstmalige Kombination einer NADH-Oxidase und einer Alkohol-Dehydrogenase mit den Hydroxysteroid-Dehydrogenasen mittels Ganzzellbiokatalyse ein vollständiger Umsatz von UDCA ausgehend von CDCA gezeigt werden. Weiterhin stellt dieses innovative Verfahren die erste erfolgreiche „one-pot one-step“-Reaktion dar, d.h. die Epimerisierung kann durch Trennung der Redoxreaktion durch die unterschiedliche Cofaktorspezifität im selben Topf durchgeführt werden. Bisher konnten vollständige Synthesen von UDCA ausgehend von CDCA nur als „one-pot two-step“-Reaktionen beschrieben werden (Bovara et al., 1993; Zheng et al., 2015). Für eine vollständige Umsetzung musste also bisher immer die Reduktion von der Oxidation zeitlich getrennt werden, während hier die „one-pot one-step“-Reaktion durch die Trennung der Cofaktorspezifität erfolgreich durchgeführt werden konnte.

15.3.2. Chemoenzymatische Synthese

Eine weitere Strategie, die in dieser Arbeit untersucht und auch etabliert wurde, ist eine alternative Route der chemoenzymatischen Synthese von UDCA, ebenfalls ausgehend von CDCA. Hier wird allerdings zuerst CDCA chemisch oxidiert, anschließend wird die Doppelreduktion mit den beiden HSDHs (3 α - und 7 β -HSDH), die bereits in der Synthese von DHCA zu 12-Keto-UDCA eingesetzt wurden, durchgeführt.

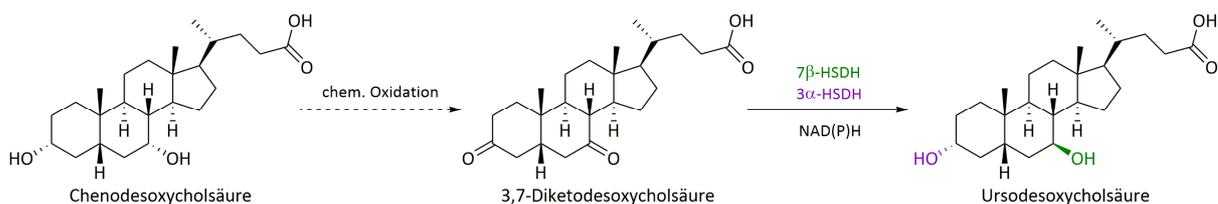


Abb. 102: Schematische Darstellung der alternativen Syntheseroute zur Herstellung von UDCA ausgehend von CDCA. Die Syntheseroute beinhaltet eine chemische Oxidation der Alkoholgruppen (gestrichelter Pfeil) und einen enzymatischen Schritt, die Epimerisierung der α -ständigen Hydroxylgruppe an C-7-Position zur β -ständigen Hydroxylgruppe. Die Cofaktorregenerierung erfolgt durch das System Glucose/GDH.

Die chemische Oxidation kann sowohl nach SWERN als auch mit stöchiometrischen Mengen an Natriumhypochlorit durchgeführt werden. Bei beiden Methoden konnten sehr gute Ausbeuten von ca. 80 % mit Produkt-Reinheiten von bis zu 98 % erhalten werden. Anschließend wurde die Doppelreduktion enzymatisch durchgeführt. Hierfür konnte auf das bereits etablierte System der Verwendung von 3 α - sowie 7 β -HSDH, gekoppelt mit der GDH, zurückgegriffen werden. Das Prinzip ist

Diskussion

somit analog zum Verfahren zur Synthese von 12-Keto-UDCA ausgehend von DHCA, lediglich das verwendete Substrat ist ein anderes. Das hier entwickelte Verfahren bietet allerdings den großen Vorteil, dass auf die Wolff-Kishner-Reaktion verzichtet werden kann, da CDCA an der Position C₁₂ von vornherein keine Carbonylgruppe enthält.

In den Untersuchungen zur Charakterisierung der kinetischen Parameter zeigte sich, dass, wie beim Edukt DHCA, nur die 3 α -HSDH eine ausgeprägte Substratinhibierung mit dem Substrat 3,7-Diketo-UDCA zeigt. Für die Zwischenverbindung 3-Keto-UDCA war diese deutlich geringer, was anhand der K_i-Werte sichtbar wird (0,5 mM gegen 6,8 mM).

In den Biotransformationen von 3,7-Diketo über das entsprechende Intermediat zum gewünschten Produkt UDCA wurden die Biokatalysatoren sowohl in Form von isolierten Enzymen als auch Ganzzellbiokatalysatoren erfolgreich eingesetzt. Es konnte mit allen Präparaten ein vollständiger Umsatz erreicht werden. Sowohl bei den Umsetzungen mit freien Enzymen als auch mit dem GZK zeigte sich, dass der verwendete pH-Wert von großer Bedeutung ist. So konnte mit isolierten Proteinen erst dann ein vollständiger Umsatz von 10 mM 3,7-Diketo-UDCA erreicht werden, als der pH-Wert der Reaktion 8,5 oder höher betrug. Bei einem pH-Wert von 7,5 konnten nach 16 Stunden lediglich ca. 49 % UDCA und ca. 51 % des Zwischenprodukts 7-KLCA nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der pH-Profile der einzelnen Proteine zeigte sich, dass die Ursache für die langsame Reaktion wahrscheinlich darin begründet ist, dass sowohl die GDH als auch die 7 β -HSDH ihre maximale Aktivität im alkalischen Bereich besitzen (Macdonald et al., 1982; Weckbecker and Hummel, 2005).

Für die Ganzzellbiokatalyse wurde der Ganzzellbiokatalysator *E. coli* DB03 verwendet, da in diesem System die höchste Aktivität an 7 β -HSDH gemessen werden konnte. Die Synthese von 12-Keto-UDCA konnte erfolgreich bei pH 7,0 durchgeführt werden. Die enzymatische Synthese mittels Ganzzellbiokatalysator von UDCA ausgehend von CDCA gelang dagegen bei einem pH-Wert von 6,0. Daher wurde auf ein aufwendiges Screening verzichtet und lediglich die bekannten Parameter in den Biotransformationen getestet. Es stellte sich heraus, dass bei beiden pH-Werten sehr gute Umsatzraten (pH 6 ca. 96 % Umsatz und bei pH 7 \geq 99 %) erzielt werden konnten. In Tabelle 54 sind die ermittelten Daten dargestellt.

Tabelle 54: Vergleich der Enzymaktivitäten der einzelnen HSDHs und deren Ausnutzung bei Anwendung in einer Ganzzellbiokatalyse von CDCA zu UDCA bei verschiedenen pH-Werten.

Konstrukt <i>E. coli</i> DB03	Enzymaktivität pro g Zellen [U]		Zellaktivität [U g ⁻¹]	^a Ausnutzung [%]	
	3 α -HSDH	7 β -HSDH		3 α -HSDH	7 β -HSDH
pH 7,0	36,8	232,8	3,8	10,4	1,6
pH 6,0	36,8	232,8	0,6	1,7	0,3

^a = (Zellaktivität / Enzymaktivität) * 100

Diskussion

Der verwendete Ganzzellbiokatalysator *E. coli* DB03 zeigte nach Expression die höchste Aktivität sowohl für das Substrat DHCA als auch 3,7-Diketo-UDCA. Aus Tabelle 54 ist ersichtlich, dass sich die Aktivitäten der isolierten Enzyme stark unterscheiden, die 7 β -HSDH ist 6-mal so aktiv wie die 3 α -HSDH. Bei Betrachtung der Ausnutzung ergibt sich ein anderes Bild, die 3 α -HSDH ist nun in beiden Fällen um den Faktor 6 aktiver. Vermutlich ist wie auch beim Prozess von DHCA zu 12-Keto-UDCA der Grund, dass die 3 α -HSDH ein NADH-abhängiges Enzym ist und daher auf einen größeren Pool an intrazellulären NAD(H) zurückgreifen kann.

Bei Betrachtung der kinetischen Konstanten könnte eine weitere Erklärung für die bessere Ausnutzung der 3 α -HSDH sein, dass dieses Protein einen deutlich kleineren K_M -Wert besitzt. Innerhalb der Zelle ist die Konzentration an Edukt als auch den anderen Verbindungen wahrscheinlich sehr gering, so dass die 3 α -HSDH bei niedrigen Konzentrationen eine weitaus höhere Aktivität als die 7 β -HSDH erzielen kann, da die 3 α -HSDH eine 8-mal höhere Affinität als die 7 β -HSDH besitzt. Bei der Zwischenverbindung wird dieses nochmal deutlich, hier besitzt die 3 α -HSDH einen 10-mal so kleinen K_M -Wert, das begründet auch die Akkumulation der Zwischenverbindung 7-KLCA, also die mangelhafte Umsetzung dieser Verbindung durch die 7 β -HSDH.

Bei den Biotransformationen bei einem pH-Wert von 6,0 konnte dagegen keine große Akkumulation der Zwischenverbindungen beobachtet werden. Vermutlich sind die K_M -Werte der einzelnen Enzyme bei diesen Parametern weniger entscheidend. Die Limitierung geht aller Voraussicht von der GDH aus, da dieses Protein bei diesem pH-Wert eine sehr geringe Restaktivität aufweist und die Bereitstellung der Coenzyme nicht mehr in dem erforderlichen Maße gewährleistet ist, so dass die eigentlichen Hauptenzyme, die HSDHs, nicht ihre maximale Aktivität abrufen können.



V. Zusammenfassung

Aufgrund der komplexen Regio- und Stereochemie ist die chemische Synthese von Ursodesoxycholsäure bisher mit einem Aufwand verbunden, der zu hohen Ausbeuteverlusten führt. Ursodesoxycholsäure wird unter anderem zur nicht-invasiven Behandlung von Gallensteinen eingesetzt und stellt ein wichtiges Pharmakon dar, das immer höheren Zuspruch findet. Die Motivation dieser Arbeit war daher, alternative Synthesewege zu etablieren, die zum einen die Ausbeute an UDCA verbessern, zum anderen auch möglicherweise den Herstellungsprozess verkürzen, da für die siebenstufige chemische Synthese umweltschädliche Chemikalien benötigt werden. Zum Erreichen dieses Ziels stellt die Biotransformation durch den Einsatz von mikrobiellen Hydroxysteroid-Dehydrogenasen als Biokatalysatoren ein geeignetes Werkzeug dar. Das Hauptziel dieser Arbeit war die Etablierung sowie Prozessoptimierung der Reduktion ausgehend von Dehydrocholsäure mittels einer 3α -HSDH aus *Comamonas testosteroni* sowie einer 7β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens* zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure. 12-Keto-Ursodesoxycholsäure wird dann mittels chemischer „Wolff-Kishner Reduktion“ zu Ursodesoxycholsäure umgewandelt. Durch das Einbringen des enzymatischen Schrittes werden somit nur noch zwei chemische Schritte (Oxidation von Cholsäure zu Dehydrocholsäure sowie die Entfernung der Carbonylgruppe von 12-Keto-UDCA) benötigt, so dass der Herstellungsprozess bei höheren Ausbeuten deutlich verkürzt werden konnte.

Neben der Biotransformation mittels isolierter Enzyme (Zelllysate) wurde auch ein biokatalytischer Ganzzellprozess ausgearbeitet. Diese *designer bugs* enthalten sowohl die beiden HSDHs als auch das Cofaktor-regenerierende Enzym. Bei beiden Umsetzungen konnte eine 70 mM Lösung an DHCA mit einer Reinheit von 99,8 % vollständig umgesetzt werden. Die Etablierung eines Ganzzellsystems stellt im Vergleich zum Einsatz von Zelllysate eine erfolgreiche Prozessoptimierung dar.

Für die weitere Optimierung des Prozesses wurde mittels rationalem Proteindesign die Cofaktorspezifität der 7β -HSDH geändert. Das Enzym ist als Wildtyp strikt NADP(H) abhängig und konnte durch Sequenz- und Strukturinformationen erfolgreich geändert werden, so dass nur noch die unphosphorylierte Form des Coenzymes akzeptiert wird. Die beste Mutante weist mit NAD⁺ eine um 80 % niedrigere spezifische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp mit dem Cofaktor NADPH auf. Die Biotransformation zeigte zwar eine nahezu vollständige Umsetzung, aber es wurde bedeutend mehr Zelllysate benötigt, um eine äquivalente Reaktionsdauer beizubehalten.

Bei der Charakterisierung der HSDHs wurde eine Substratüberschussinhibierung festgestellt. Hierbei konnte bei der 3α -HSDH eine ausgeprägtere Substratinhibierung im Vergleich zur 7β -HSDH beobachtet werden. In Anbetracht der Kinetiken der HSDHs würde eine Eliminierung bzw. Verminderung der Inhibierung die Reaktionsführung bedeutend erleichtern. Aufgrund dieser Charakteristik wurde in

Zusammenfassung

dieser Arbeit ein großes Augenmerk auf die Mutagenese der vorhandenen HSDHs gesetzt. Hier konnte von der 7 β -HSDH eine Mutante erzeugt werden, die an den Positionen G39S und R64E so verändert wurde, dass das Enzym zum einen keine Substratinhibierung mehr aufweist und zum anderen eine um den Faktor 6 bis 7 höhere spezifische Aktivität besitzt. Analog zur Mutagenese der 7 β -HSDH wurde die 3 α -HSDH optimiert und eine Mutante erzeugt, die zwar noch eine Substratinhibierung aufweist, aber eine bedeutend höhere Aktivität (L68A als auch T188A) besitzt. Weiterhin konnte ein Einfluss des 6xHistidin-Tag am C-Terminus nachgewiesen werden, der die ausgeprägte Substratinhibierung in niedrigen Konzentrationsbereichen vermindert. Durch Mutagenese des 6xHistidin-Tags zu einem 9xHistidin-Tags konnte die katalytische Effizienz nochmals verdoppelt werden.

Eine interessante, aber bisher wenig untersuchte Syntheseroute stellt die enzymatische Biotransformation ausgehend von Cholsäure direkt dar. Dadurch kann der erste chemische Schritt, die Oxidation aller Hydroxylgruppen entfallen, lediglich die Wolff-Kishner Reaktion wäre noch erforderlich. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die rein enzymatische Synthese von Ursodesoxycholsäure, Epimerisierung der α -ständigen Hydroxylgruppe an Position C₇ des Sterangerüsts in eine β -ständige mit einer 7 α -HSDH und 7 β -HSDH sowie die Oxidation der α -ständigen Hydroxylgruppe an Position C₁₂ mit einer 12 α -HSDH, zu ca. 95 % 12-Keto-UDCA möglich ist.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, alternative Syntheserouten zur Gewinnung von Ursodesoxycholsäure zu finden. Hierzu wurde die Biotransformation von Chenodesoxycholsäure untersucht. Chenodesoxycholsäure bietet den Vorteil, dass durch die Epimerisierung der α -ständigen zur β -ständigen Hydroxylgruppe am C₇-Atom keine weiteren Schritte (chemische als auch enzymatische) benötigt werden. Hierfür wurde eine mikrobielle 7 α -HSDH aus *E. coli*, die eine hochspezifische Aktivität aufweist sowie eine neuartige aus *Clostridium difficile*, die keine Substratinhibierung mit dem Cofaktor NADPH aufweist, identifiziert und kloniert. Ein Cofaktorregenerierungssystem musste für diese Biotransformation nicht etabliert werden, da die Reaktion ohne zusätzliche Cofaktorregenerierungsenzyme auskommt, der Cofaktor wird durch die eingesetzten HSDHs intern regeneriert. Die Biotransformationen mittels isolierten Enzymen als auch einem Ganzzellsystem mit interner Cofaktorregenerierung konnte zu einem Umsatz von ca. 63 % bzw. 74 % erzielt werden.

Aufgrund der unvollständigen Biotransformation von Chenodesoxycholsäure zu Ursodesoxycholsäure mittels interner Cofaktorregenerierung (einstufiger Prozess) wurden in dieser Arbeit weitere Wege untersucht und etabliert, die zusätzliche Cofaktorregenerierungsenzyme beinhalten. Der enzymatische Syntheseweg mit externer Cofaktorregenerierung (zweistufiger Prozess) ist dadurch möglich, weil der oxidative von dem reduktiven Schritt mittels Cofaktorspezifität der beiden

Zusammenfassung

eingesetzten Hydroxysteroid-Dehydrogenasen klar getrennt werden konnte. Sowohl mit isolierten Enzymen als auch mit einem Ganzzellbiokatalysator konnten vollständige Umsätze erreicht werden.

Ein Weg der bislang noch nicht beschrieben wurde, ist ein chemoenzymatischer Weg, der ebenfalls von Chenodesoxycholsäure ausgeht. In dieser Arbeit wurde Chenodesoxycholsäure chemisch oxidiert und mit den Proteinen bzw. den Ganzzellbiokatalysator aus der Biotransformation von DHCA zu 12-Keto-Ursodesoxycholsäure rein enzymatisch zu Ursodesoxycholsäure umgesetzt. Es konnte mittels isolierten Enzymen als auch mit einem Ganzzellbiokatalysator ein Umsatz von $\geq 99\%$ erreicht werden.

Zusammenfassend konnte ein sehr kostengünstiges und effizientes System zur Gewinnung von 12-Keto-Ursodesoxycholsäure ausgehend von Dehydrocholsäure etabliert werden, indem die Reaktionsbedingungen als auch die verwendeten Hydroxysteroid-Dehydrogenasen optimiert wurden. Weiterhin konnte eine alternative Syntheseroute mit rekombinanten Enzymen entwickelt werden, die Ursodesoxycholsäure direkt aus Chenodesoxycholsäure gewinnt. Somit konnte durch biochemische Charakterisierung und Optimierung der Enzymeigenschaften in dieser Arbeit eine Enzymplattform etabliert werden, die es ermöglicht, auf vier unterschiedlichen (chemo)-enzymatischen Synthesewegen zum Arzneistoff UDCA bzw. zur Vorstufe 12-Keto-UDCA zu gelangen.

VI. Summary

Due to the complex regio- and stereochemistry the chemical synthesis of ursodeoxycholic acid is time consuming and has been associated with high losses of yield. Ursodeoxycholic acid is used for non-invasive treatment of gallstones and it represents an important drug with increasing applicability. The motivation of this work was therefore to establish alternative routes to synthesize ursodeoxycholic acid with improved yield and shorter manufacturing procedure, compared to the seven-stage chemical synthesis. To achieve this goal, the biotransformation with microbial hydroxysteroid dehydrogenases as biocatalysts represents a suitable tool. A goal of this study was therefore to optimize a process by reduction of dehydrocholic acid by 3α -HSDH from *Comamonas testosteroni* and a 7β -HSDH from *Collinsella aerofaciens* to 12-keto-ursodeoxycholic acid. The 12-keto-ursodeoxycholic acid is then converted by chemical "Wolff-Kishner reduction" to ursodeoxycholic. Thus, only two chemical steps are required by applying the enzymatic steps what shortens the manufacturing process and increases production yields.

In addition to the biotransformation with separated enzymes a whole-cell biocatalytic process has also been developed. These "designer bugs" include the two HSDH enzymes and the cofactor recycling enzyme. In both reactions a 70 mM solution of DHCA could be converted with a nearly complete conversion and a purity of the product of 99.8%. Establishing a whole-cell system resulted in a lean and quite simple system with further process optimization.

Furthermore, to reduce the costs, the cofactor specificity of 7β -HSDH was changed by rational protein design. While the wild-type enzyme is strictly NADP(H)-dependent, mutants could be created which were able to accept now the cofactor NAD(H). Compared to the activity of the wild-type enzyme with NADPH, the activity of the best mutant with NADH was in the range of about 20 %. Applying a higher amount of crude extract enzyme, biotransformation reactions with this NADH-dependent mutant showed a nearly complete conversion.

During the characterization of HSDHs a severe substrate inhibition was observed. This inhibition is significantly more pronounced for 3α -HSDH than for the 7β -HSDH. Considering the kinetics of HSDHs, decreased inhibition would significantly reduce enzyme costs. The 7β -HSDH mutant modified at positions G39S and R64E do not exhibit a substrate inhibition and showed an increased specific activity by a factor of 6 to 7. 3α -HSDH was optimized analogous to the 7β -HSDH, however mutant still showed a substrate inhibition, but with a significantly higher reaction velocity (L68A and T188A). Furthermore, an influence of the C-terminal 6xHis-tag on reduction of the substrate inhibition at low concentration ranges was observed. By adding 9xHis-tag to the C-terminal end of this protein its catalytic efficiency could be doubled.

Summary

A promising, but not so far investigated synthesis route for the biotechnological production of 12-keto-ursodeoxycholic acid is the enzymatic biotransformation of cholic acid. Thus, the first chemical step to oxidise all hydroxyl-groups can be omitted and only the Wolff-Kishner reduction would be needed. The results of this work have shown that the enzymatic synthesis of ursodeoxycholic acid, the epimerisation of the α -hydroxygroup at position C₇ of the sterane backbone into a β -hydroxygroup with a 7 α -HSDH and 7 β -HSDH in combination with the oxidation of the α -hydroxyl group at position C₁₂ with a 12 α -HSDH is possible to obtain 12-keto-ursodeoxycholic acid with approximately 95% conversion.

Another aim of this work was to elaborate alternative synthesis routes for the production of ursodeoxycholic, which in detail means to study the biotransformation of an alternative starting material, the chenodeoxycholic acid. This route has the advantage by epimerization of the α -position to the β -position hydroxyl group of chenodeoxycholic acid at the C₇-atom that no further steps are required. For this purpose, a microbial 7 α -HSDH from *E. coli* with a high specific activity and a novel one from *Clostridium difficile*, which exhibits no substrate inhibition with NADPH as the cofactor, were cloned. In this system no additional enzymes for cofactor recycling are necessary, because the cofactor is regenerated internally by the substrate and the intermediate, respectively. A conversion of 63 % and 74 % could be measured for the biotransformation with internally regenerated coenzyme using isolated enzyme or whole-cell biocatalyst, respectively.

In order to improve this reaction of an incomplete conversion by internally regenerated coenzyme, a new route with two additional enzyme-catalyzed reactions for regenerating the cofactors was investigated and established. This synthesis with externally regenerated coenzyme is possible by separating the oxidative and the reductive step due to different cofactor dependency of the used hydroxysteroid dehydrogenases. Both with isolated enzymes as well as with a whole-cell biocatalyst a complete conversion could be achieved.

Additionally, a completely new chemoenzymatic route to obtain ursodeoxycholic acid outgoing from chenodeoxycholic acid was successfully elaborated. In this work chenodeoxycholic acid was chemically oxidised using standard methods resulting in the 3,7-diketo derivative. This compound was converted completely to ursodeoxycholic acid applying 3 α - and 7 β -HSDH simultaneously. These enzymes are the same used for the reduction of dehydrocholic acid, which means that quite the same technology can be applied. A conversion of $\geq 99\%$ could also using a whole-cell biocatalyst.

In summary, a very efficient system for the production of 12-keto-ursodeoxycholic acid starting from dehydrocholic acid could be established. The reaction conditions and the hydroxysteroid dehydrogenases were optimized by rational protein design. Furthermore, a new system to gain

Summary

ursodeoxycholic acid directly from chenodeoxycholic acid based on recombinant enzymes was developed. Thus, an enzyme platform could be established by biochemical characterization and optimization of the enzymatic properties, which makes it possible to approach the active ingredient compound UDCA or the precursor 12-keto-UDCA on four different (chemo)-enzymatic synthesis routes.

VII. Literaturverzeichnis

- Abalain, J.H., Di Stefano, S., Abalain-Colloc, M.L., Floch, H.H., 1995. Cloning, sequencing and expression of *Pseudomonas testosteroni* gene encoding 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*
- Adamczak, M., Krishna, S., 2004. Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis. *Food Technol. Biotechnol.* 42, 251–264.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G.E., Pedersen, J., 2006. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Express Purif* 48, 1–13.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T., 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195–201.
- Aukrust, L.E., Norum, K.R., Skåhegg, B.A., 1976. Affinity chromatography of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. Use of N,N-dimethylformamide to prevent hydrophobic interactions between the enzyme and the ligand. *Biochem. Biophys. Acta* 438, 13–22.
- Bakonyi, D., Hummel, W., 2017. Cloning, expression, and biochemical characterization of a novel NADP-dependent 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Clostridium difficile* and its application for the oxidation of bile acid. *Enzym. Microb. Technol.* 99, 16–24.
- Bakonyi, D., Wirtz, A., Hummel, W., 2012. Large-scale Enzymatic Synthesis of 12-Ketoursodeoxycholic Acid from Dehydrocholic Acid by Simultaneous Combination of 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni* and 7 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Collinsella aerofaciens*. *Z. Naturforsch., B Chem. Sci* 67b, 1037–1044.
- Baron, S., Franklund, C., Hylemon, P., 1991. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for bile acid 7 α -Hydroxysteroid dehydrogenase from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708. *J. Bacteriol.* 173, 4558–69.
- Baron, S.F., Hylemon, P.B., 1997. Biotransformation of bile acids, cholesterol, and steroid hormones. *Gastrointest. Microbiol.* 24, 470–510.
- Begley, M., Gahan, C.G.M., Hill, C., 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 625–651.
- Bennett, M., McKnight, S., Coleman, J., 2003. Cloning and Characterization of the NAD-dependent 7 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Bacteroides fragilis*. *Curr. Microbiol.* 47, 475–484.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E., 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235–242.
- Bernstein, H., Bernstein, C., Payne, C., Dvorakova, K., Garewal, H., 2005. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat. Res.* 589, 47–65.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T., 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 1–7.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Biwler, A., Heinzle, E., 2004. Environmental assessment in early process development. *J. Chem. Technol. Biot.* 79, 597–609.
- Boivin, S., Kozak, S., Meijers, R., 2013. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Express Purif* 91, 192–206.

Literaturverzeichnis

- Bommarius, A.S., Riebel, B.R., 2004. Biocatalysis. Wiley-VCH.
- Bornscheuer, U.T., Huisman, G.W., Kazlauskas, R.J., Lutz, S., Moore, J.C., Robins, K., 2012. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485, 185–194.
- Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, J.R., 2012. Enzymatic Catalytic Promiscuity and the Design of New Enzyme Catalyzed Reactions, in: Drauz, K.-H., Gröger, H., May, O. (Eds.), *Enzym. Catal. Org. Synth.* pp. 1695–1733.
- Bornscheuer, U.T., Pohl, M., 2001. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 137–143.
- Both, P., Busch, H., Kelly, P.P., Mutti, F.G., Turner, N.J., Flitsch, S.L., 2016. Whole-Cell Biocatalysts for Stereoselective C-H Amination Reactions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 55, 1511–1513.
- Bovara, R., Canzi, E., Carrea, G., Pilotti, A., Rivat, S., 1993. Enzymatic alpha/beta inversion of the C-7-hydroxyl of steroids. *J. Org. Chem.* 499–501.
- Bovara, R., Carrea, G., Riva, S., Secundo, F., Mario, V., Milano, B., 1996. A new enzymatic route to the synthesis of 12-Ketoursodeoxycholic acid. *Biotechnol. Lett* 18, 305–308.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54.
- Braun, M., Lünsdorf, H., Bückmann, A., 1991. 12 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Clostridium group P*, strain C 48-50. Production, purification and characterization. *J. Biochem.* 196, 439–450.
- Briggs, G., Haldane, J., 1925. A note on the kinetics of enzyme action. *Biochem. J.* 19, 338–339.
- Cahalane, M.J., Neubrand, M.W., Carey, M.C., 1988. Physical-chemical pathogenesis of pigment gallstones. *Semin. Liver Dis.* 8, 317–328.
- Carey, M., Small, D., 1978. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. Relationship to gallstone formation and dissolution in man. *J. Clin. Invest.* 61, 998–1026.
- Carrea, G., Bovara, R., Cremonesi, P., Lodi, R., 1983. Enzymatic preparation of 12-ketochenodeoxycholic acid with NADP regeneration. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 560–563.
- Carrea, G., Bovara, R., Longhi, R., Barani, R., 1984. Enzymatic reduction of dehydrocholic acid to 12-ketochenodeoxycholic acid with NADH regeneration. *Enzym. Microb. Technol.* 6, 307–311.
- Carrea, G., Bovara, R., Longhi, R., Riva, S., Bianco, V., 1985. Preparation of 12-ketochenodeoxycholic acid from cholic acid using dehydrogenase and glutamate dehydrogenase with NADP⁺ cycling at high efficiency. *Enzym. Microb. Technol.* 7, 597–600.
- Carrea, G., Pilotti, A., Riva, S., Canzi, E., Ferrari, A., 1992. Enzymatic synthesis of 12-ketoursodeoxycholic acid from dehydrocholic acid in a membrane reactor. *Biotechnol. Lett* 14, 1131–1134.
- Carson, M., Johnson, D.H., McDonald, H., Brouillette, C., DeLucas, L.J., 2007. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 63, 295–301.
- Carugo, O., Argos, P., 1997. NADP-dependent enzymes. I: Conserved stereochemistry of cofactor binding. *Proteins* 28, 10–28.
- Chang, Y.-H., Wang, C.-Z., Chiu, C.-C., Chuang, L.-Y., Hwang, C.-C., 2010. Contributions of active site residues to cofactor binding and catalysis of 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 235–41.
- Chant, A., Kraemer-Pecore, C.M., Watkin, R., Kneale, G.G., 2005. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. *Protein Express Purif* 39, 152–159.

- Charlier, H. a., Plapp, V., 2000. Kinetic Cooperativity of Human Liver Alcohol Dehydrogenase gamma 2. *J. Biol. Chem.* 275, 11569–11575.
- Chen, H., Xu, Z., Xu, N., Cen, P., 2005. Efficient production of a soluble fusion protein containing human beta-defensin-2 in *E. coli* cell-free system. *J. Biotechnol.* 115, 307–315.
- Chenault, H.K., Whitesides, G.M., 1987. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 14, 147–97.
- Chiang, J.Y.L., 2004. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J. Hepatol.* 40, 539–551.
- Coleman, J., Hudson, L., Adams, M., 1994. Characterization and regulation of the NADP-linked 7alpha-Hydroxysteroid Dehydrogenase gene from *Clostridium sordellii*. *J. Bacteriol.* 176, 4865–74.
- Crosignani, A., Setchell, K., Invernizzi, P., Larghi, A., Rodrigues, C., Podda, M., 1996. Clinical pharmacokinetics of therapeutic bile acids. *Clin Pharmacokinet* 30, 333–358.
- D’Agnolo, H.M.A., Kievit, W., Takkenberg, R.B., Riaño, I., Bujanda, L., Neijenhuis, M.K., Brunenberg, E.J.L., Beuers, U., Banales, J.M., Drenth, J.P.H., 2016. Ursodeoxycholic acid in advanced polycystic liver disease: A phase 2 multicenter randomized controlled trial. *J. Hepatol.* i.
- Dalby, P., 2011. Strategy and success for the directed evolution of enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 473–480.
- Dalby, P. a, 2003. Optimising enzyme function by directed evolution. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 500–505.
- Dallas-Yang, Q., Jiang, Q., Sladek, F., 1998. Avoiding false positives in colony PCR. *Biotechniques* 24, 580–582.
- Danzinger, R.G., Hofmann, A.F., Schoenfield, L.J., Thistle, J.L., 1972. Dissolution of cholesterol gallstones by chenodeoxycholic acid. *New Engl. J. Med.* 286, 1–8.
- Dawson, J., Mallonee, D., Bjorkhem, I., Philip, B., 1996. Expression and characterization of a C24 bile acid 7 alpha-dehydratase from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708 in *Escherichia coli*. *J. Lipid Res.* 37, 1258–1267.
- Dean, M., Fantin, G., Fogagnolo, M., Medici, A., Pedrini, P., Poli, S., 1999. Microbial 7-OH Epimerisation of Bile Acids. *Chem. Lett.* 693–694.
- Declerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R., Gaillardin, C., 2000. Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* alpha-amylase. *J. Mol. Biol.* 301, 1041–1057.
- Di Ciaula, A., Wang, D., Wang, H., Bonfrate, L., Portincasa, P., 2010. Targets for current pharmacologic therapy in cholesterol gallstone disease. *Gastroenterol. Clin. N.* 39, 245–264.
- Donova, M., Egorova, O., 2012. Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1423–47.
- Drauz, K., Gröger, H., May, O. (Eds.), 2012. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Duetz, W.A., van Beilen, J.B., Witholt, B., 2001. Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 419–25.
- Dyson, M.R., Shadbolt, S.P., Vincent, K.J., Perera, R.L., McCafferty, J., 2004. Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnol.* 4, 32.

Literaturverzeichnis

- Edenharder, R., Pfützner, A., Hammann, R., 1989. Characterization of NAD-dependent 3 alpha- and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and of NADP-dependent 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from *Peptostreptococcus productus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1004, 230–238.
- Eggert, T., Bakonyi, D., Hummel, W., 2014. Enzymatic routes for the synthesis of ursodeoxycholic acid. *J. Biotechnol.* 191, 11–21.
- Eguchi, T., Kuge, Y., INOUE, K., YOSHIKAWA, N., MOCHIDA, K., UWAJIMA, T., 1992. NADPH regeneration by Glucose-Dehydrogenase from *Gluconobacter scleroides* from L-Leuovorin synthesis. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 56, 701–703.
- Eisenbrand, G., Hagen Meyer, A., Schreier, P., 2006. RÖMPP Lexikon Lebensmittelchemie, RÖMPP Lexikon Lebensmittelchemie.
- Eklund, H., Nordström, B., Zeppezauer, E., Söderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T., Söderberg, B.O., Tapia, O., Brändén, C.I., Akeson, A., 1976. Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2,4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 102, 27–59.
- Endo, S., Matsunaga, T., Fujimoto, A., Kumada, S., Arai, Y., Miura, Y., Mikamo, H., El-Kabbani, O., Yamano, S., Iinuma, M., Hara, A., 2013. Characterization of rabbit morphine 6-dehydrogenase and two NAD(+)-dependent 3 α (17 β)-hydroxysteroid dehydrogenases. *Arch. Biochem. Biophys.*
- Ericsson, U.B., Hallberg, B.M., DeTitta, G.T., Dekker, N., Nordlund, P., 2006. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal Biochem* 357, 289–298.
- Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H., Cabral, J., 2003. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzym. Microb. Technol.* 32, 688–705.
- Ferrandi, E., Bertolesi, G., Polentini, F., Negri, A., Riva, S., Monti, D., 2011. In search of sustainable chemical processes: cloning, recombinant expression, and functional characterization of the 7 α - and 7 β -hydroxysteroid dehydrogenases from *Clostridium absonum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 1221–33.
- Filling, C., Berndt, K.D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jörnvall, H., Oppermann, U., 2002. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J. Biol. Chem.* 277, 25677–84.
- Findrik, Z., Simunovic, I., Vasic-Racki, D., 2008. Coenzyme regeneration catalyzed by NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* in the reaction of l-amino acid oxidation. *Biochem. Eng. J.* 39, 319–327.
- Fonda, I., Kenig, M., Gaberc-Porekar, V., Pristovaek, P., Menart, V., 2002. Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor-alpha drastically changes its properties. *ScientificWorldJournal.* 2, 1312–1325.
- Fossati, E., Polentini, F., Carrea, G., Riva, S., 2006. Exploitation of the alcohol dehydrogenase-acetone NADP-regeneration system for the enzymatic preparative-scale production of 12-ketocholedeoxycholic acid. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 1216–20.
- Franklund, C., 1990. Purification and Characterization of a microbial, NADP-dependent bile acid 7 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 9842–9849.
- Fukiya, S., Arata, M., Kawashima, H., Yoshida, D., Kaneko, M., Minamida, K., Watanabe, J., Ogura, Y., Uchida, K., Itoh, K., Wada, M., Ito, S., Yokota, A., 2009. Conversion of cholic acid and chenodeoxycholic acid into their 7-oxo derivatives by *Bacteroides intestinalis* AM-1 isolated from human feces. *FEMS Microbiol. Lett.* 293, 263–70.
- Gangloff, A., Garneau, A., Huang, Y., Yang, F., Lin, S.-X., 2001. Human oestrogenic 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase specificity: Enzyme regulation through an NADPH-dependent substrate inhibition towards the highly specific oestrone reduction. *J. Biochem.* 356, 269–276.

- Geueke, B., Riebel, B., Hummel, W., 2003. NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*: A new catalyst for the regeneration of NAD. *Enzym. Microb. Technol.* 32, 205–211.
- Ghosh, D., Pletnev, V., Zhu, D., Wawrzak, Z., 1995. Structure of human estrogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase at 2.20 Å resolution. *Structure* 3, 503–515.
- Giovannini, P., Grandini, A., Perrone, D., Pedrini, P., Fantin, G., Fogagnolo, M., 2008. 7 α - and 12 α -Hydroxysteroid dehydrogenases from *Acinetobacter calcoaceticus Iwoffii*: a new integrated chemo-enzymatic route to ursodeoxycholic acid. *Steroids* 73, 1385–1390.
- Goel, A., Colcher, D., Koo, J.S., Booth, B.J.M., Pavlinkova, G., Batra, S.K., 2000. Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct. *Biochim. Biophys. Acta* 1523, 13–20.
- Goldberg, K., Schroer, K., Lütz, S., Liese, A., 2007. Biocatalytic ketone reduction - A powerful tool for the production of chiral alcohols - Part II: Whole-cell reductions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 249–255.
- Grimm, C., Maser, E., Möbus, E., Klebe, G., Reuter, K., Ficner, R., 2000. The crystal structure of 3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni* shows a novel oligomerization pattern within the short chain dehydrogenase/reductase family. *J. Biol. Chem.* 275, 41333–9.
- Gröger, H., Asano, Y., 2012. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Third Edit. ed.
- Gröger, H., May, O., Werner, H., Menzel, A., Altenbuchner, J., 2006. A “ Second-Generation Process ” for the Synthesis of L -Neopentylglycine : Asymmetric Reductive Amination Using a Recombinant Whole Cell Catalyst † Abstract : *Org. Process Res. Dev.* 10, 4–7.
- Gruber, C., Krahulec, S., Nidetzky, B., Kratzer, R., 2013. Harnessing *Candida tenuis* and *Pichia stipitis* in whole-cell bioreductions of o-chloroacetophenone: Stereoselectivity, cell activity, in situ substrate supply and product removal. *Biotechnol. J.* 8, 699–708.
- Guarino, M.P.L., Cocca, S., Altomare, A., Emerenziani, S., Cicala, M., 2013. Ursodeoxycholic acid therapy in gallbladder disease, a story not yet completed. *World J. Gastroenterol.* 19, 5029–5034.
- Guex, N., Peitsch, M.C., Schwede, T., 2009. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis* 30 Suppl 1, S162–73.
- Hagey, L.R., Crombie, D.L., Espinosa, E., Carey, M.C., Igimi, H., Hofmann, a F., 1993. Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *J Lipid Res.* 34, 1911–1917.
- Hanson, R.L., Schwinden, M.D., Banerjee, A., Brzozowski, D.B., Chen, B.-C., Patel, B.P., McNamee, C.G., Kodersha, G.A., Kronenthal, D.R., Patel, R.N., 1999. Enzymatic synthesis of l-6-hydroxynorleucine. *Bioorgan. Med. Chem.* 7, 2247–2252.
- Haupt, H. a, Rovere, G.D., 1984. Anabolic steroids: A review of the literature. *Am. J. Sport Med.* 12, 469–484.
- Hayakawa, S., 1982. Microbial transformation of bile acids. A unified scheme for bile acid degradation, and hydroxylation of bile acids. *Z. allg. Mikrobiol.* 22, 309–26.
- Herrera, S., 2004. Industrial biotechnology - A chance at redemption. *Nat. Biotechnol.* 22, 671–675.
- Heuser, F., Schroer, K., Lütz, S., Bringer-Meyer, S., Sahm, H., 2007. Enhancement of the NAD(P)(H) Pool in *Escherichia coli* for Biotransformation. *Eng. Life Sci.* 7, 343–353.
- Hewitt, C.O., Eszes, C.M., Sessions, R.B., Moreton, K.M., Dafforn, T.R., Takei, J., Dempsey, C.E., Clarke, a R., Holbrook, J.J., 1999. A general method for relieving substrate inhibition in lactate

Literaturverzeichnis

- dehydrogenases. *Protein Eng.* 12, 491–496.
- Hirano, S., Masuda, N., 1982. Characterization of NADP-dependent 7 β -HSDH from *Peptostreptococcus productus* and *Eubacterium aerofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1057–1063.
- Hirano, S., Masuda, N., Oda, H., Imamura, T., 1981. Transformation of bile acid by mixed microbial cultures from human feces and bile-acid transforming activities of isolated bacterial strains. *Med. Microbiol. Immun.* 25, 271–282.
- Hoffmann, F., Maser, E., 2007. Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug metab. rev.* 39, 87–144.
- Hoffmann, F., Sotriffer, C., Evers, A., Xiong, G., Maser, E., 2007. Understanding oligomerization in 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*: an in silico approach and evidence for an active protein. *J. Biotechnol.* 129, 131–9.
- Hofmann, A.F., 2009. Bile acids: trying to understand their chemistry and biology with the hope of helping patients. *Hepatology* 49, 1403–1418.
- Hofmann, A.F., 1999. Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol. Sci.* 14, 24–29.
- Hofmann, A.F., 1963. The Preparation of Chenodeoxycholic acid and its Glycine and Taurine conjugates. *Acta Chem. Scand.* 17, 173–186.
- Hofmann, A.F., Hagey, L.R., 2014. Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades. *J. Lipid Res.* 55, 1553–1595.
- Holmberg, N., Ryde, U., Bülow, L., 1999. Redesign of the coenzyme specificity in L-lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* using site-directed mutagenesis and media engineering. *Protein Eng.* 12, 851–6.
- Horinouchi, M., Hayashi, T., Kudo, T., 2012. Steroid degradation in *Comamonas testosteroni*. *J. Steroid Biochem.* 129, 4–14.
- Huang, X., Cao, X., 2015. Preparation of ursodeoxycholic acid from 7-ketone lithocholic acid by stereoselective electroreduction. *Bioresour. Bioprocess.* 2, 27.
- Hummel, W., Boermann, F., Kula, M.-R., 1989. Purification and Characterization of an acetoin dehydrogenase from *Lactobacillus kefir* suitable for the production of (+)-acetoin. *Biocatalysis* 2, 293–308.
- Hummel, W., Gröger, H., 2014. Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems. *J. Biotechnol.* 191, 22–31.
- Hummel, W., Riebel, B., 2003. Isolation and biochemical characterization of a new NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnol Lett* 25, 51–54.
- Hwang, C.-C., Chang, Y.-H., Hsu, C.-N., Hsu, H.-H., Li, C.-W., Pon, H.-I., 2005. Mechanistic roles of Ser-114, Tyr-155, and Lys-159 in 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. *J. Biol. Chem.* 280, 3522–3528.
- Hwang, C.-C., Chang, Y.-H., Lee, H.-J., Wang, T.-P., Su, Y.-M., Chen, H.-W., Liang, P.-H., 2013. The catalytic roles of P185 and T188 and substrate-binding loop flexibility in 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. *PLoS One* 8, e63594.
- Hylemon, P., Sherrod, J., 1975. Multiple Forms of 7 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Selected Strains of *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* 122, 418–424.
- Jäger, K.-E., Eggert, T., Eipper, A., Reetz, M.T., 2001. Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 519–530.

- Ji, W., Chen, Y., Zhang, H., Zhang, X., Li, Z., Yu, Y., 2014. Cloning, expression and characterization of a putative 7 α -Hydroxysteroid dehydrogenase in *Comamonas testosteroni*. *Microbiol. Res.* 169, 148–54.
- Jörnvall, H., Höög, J., Persson, B., 1999. SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett.* 445, 261–4.
- Jörnvall, H., Persson, B., 1995. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *J. Am. Chem. Soc.* 34.
- Jörnvall, H., Persson, B., Jeffery, J., 1987. Characteristics of alcohol polyol dehydrogenase - the zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 201, 195–201.
- Jörnvall, H., Persson, M., Jeffery, J., 1981. Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4226–30.
- Ju, S., 2000. Substitution of the critical methionine residues in *Trigonopsis variabilis* alpha-amino acid oxidase with leucine enhances its resistance to hydrogen peroxide. *FEMS Microbiol. Lett.* 186, 215–219.
- Kaiser, P., 1980. Substrate inhibition as a problem of non-linear steady state kinetics with monomeric enzymes. *J. Mol. Catal.* 8, 431–442.
- Kakiyama, G., Pandak, W., Gillevet, P., Hylemon, P., Heuman, D., Daita, K., Takei, H., Muto, A., Nittono, H., Ridlon, J., White, M., Noble, N., Monteith, P., Fuchs, M., Thacker, L., Sikaroodi, M., Bajaj, J., 2013. Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis. *J. Hepatol.* 58, 949–955.
- Kanazawa, T., Shimazake, A., Sato, T., Hoshino, T., 1954. Synthesis of ursodeoxycholic acid and its conjugated bile acid. *Proc Jpn Acad* 30, 391–394.
- Kataoka, M., Rohani, L., Yamamoto, K., Wada, M., Kawabata, H., Kita, K., Yanase, H., Shimizu, S., 1997. Enzymatic production of ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate: asymmetric reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by an *Escherichia coli* transformant expressing the aldehyde reductase gene from yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 699–703.
- Katzberg, M., Skorupa-Parachin, N., Gorwa-Grauslund, M.-F., Bertau, M., 2010. Engineering cofactor preference of ketone reducing biocatalysts: A mutagenesis study on a gamma-diketone reductase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* serving as an example. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 1735–58.
- Kavanagh, K., Jörnvall, H., Persson, B., Oppermann, U., 2008. The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *FASEB J.* 65, 3895–906.
- Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L., Schwede, T., 2009. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 37, D387-92.
- Kim, K.M., Yi, E.C., Baker, D., Zhang, K.Y.J., 2001. Post-translational modification of the N-terminal His tag interferes with the crystallization of the wild-type and mutant SH3 domains from chicken src tyrosine kinase. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 57, 759–762.
- Kisiela, M., Skarka, A., Ebert, B., Maser, E., 2012. Hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) in bacteria: a bioinformatic perspective. *J. steroid Biochem. Mol. Biol.* 129, 31–46.
- Kleiger, G., Eisenberg, D., 2002. GXXXG and GXXXA Motifs Stabilize FAD and NAD(P)-binding Rossmann Folds Through C α -H \cdots O Hydrogen Bonds and van der Waals Interactions. *J. Mol. Biol.* 323, 69–76.
- Koeller, K.M., Wong, C.H., 2001. Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 409, 232–40. doi:10.1038/35051706
- Kole, M., Altosaar, I., 1985. Conversion of chenodeoxycholic acid to ursodeoxycholic acid by

Literaturverzeichnis

- Clostridium absonum* in culture and by immobilized cells. FEMS Microbiol. Lett. 28, 69–72.
- Kou, G., Shi, S., Wang, H., Tan, M., Xue, J., Zhang, D., Hou, S., Qian, W., Wang, S., Dai, J., Li, B., Guo, Y., 2007. Preparation and characterization of recombinant protein ScFv(CD11c)-TRP2 for tumor therapy from inclusion bodies in *Escherichia coli*. Protein Expr. Purif. 52, 131–138.
- Kratzer, R., Woodley, J.M., Nidetzky, B., 2015. Rules for biocatalyst and reaction engineering to implement effective, NAD(P)H-dependent, whole cell bioreductions. Biotechnol Adv 33, 1641–1652.
- Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K., Faber, K., 2004. Biocatalytic Oxidation of Primary and Secondary Alcohols. Adv. Synth. Catal. 346, 125–142.
- Kuhajda, K., Kevresan, S., Kandrac, J., Fawcett, J.P., Mikov, M., 2006. Chemical and metabolic transformations of selected bile acids. Eur. J. Drug. Metab. Ph. 31, 179–235.
- Kühl, P.W., 1994. Excess-substrate inhibition in enzymology and high-dose inhibition in pharmacology: a reinterpretation [corrected]. Biochem. J. 298, 171–80.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.
- Lavinder, J.J., Hari, S.B., Sullivan, B.J., Magliery, T.J., 2009. High-throughput thermal scanning: A general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering. J. Am. Chem. Soc. 131, 3794–3795.
- Lee, S.K., Kim, M.-H., 2009. Updates in the treatment of gallstones. Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol. 3, 649–660.
- Lepercq, P., Gérard, P., Béguet, F., Grill, J.-P., Relano, P., Cayuela, C., Juste, C., 2004a. Isolates from normal human intestinal flora but not lactic acid bacteria exhibit 7 α - and 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities. Microb. Ecol. Heal. Dis. 16, 195–201.
- Lepercq, P., Gérard, P., Béguet, F., Raibaud, P., Grill, J., Relano, P., Cayuela, C., Juste, C., 2004b. Epimerization of chenodeoxycholic acid to ursodeoxycholic acid by *Clostridium baratii* isolated from human feces. FEMS Microbiol. Lett. 235, 65–72.
- Leuschner, U., Fischer, H., Kurtz, W., Güldütuna, S., Hübner, K., Hellstern, A., Gatzert, M., Leuschner, M., 1989. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of a controlled double-blind trial. Gastroenterol. 97, 1268–1274.
- Liese, A., 2005. Technical Application of Biological Principles in Asymmetric Catalysis. Adv. Biochem. Engin./Biotechnol. 92, 197–224.
- Liu, L., Aigner, A., Schmid, R.D., 2011. Identification, cloning, heterologous expression, and characterization of a NADPH-dependent 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Collinsella aerofaciens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90, 127–35.
- Liu, Y., Lv, T., Ren, J., Wang, M., Wu, Q., Zhu, D., 2011. The catalytic promiscuity of a microbial 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase. Reduction of non-steroidal carbonyl compounds. Steroids 76, 1136–40.
- Lorenz, P., Zinke, H., 2005. White biotechnology: differences in US and EU approaches? Trends Biotechnol. 23, 570–574.
- Lou, D., Wang, B., Tan, J., Zhu, L., Cen, X., Ji, Q., Wang, Y., 2016. The three-dimensional structure of *Clostridium absonum* 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase, new insights into the conserved arginines for NADP(H) recognition. Nat. Protoc. 6, 1–11.
- Lountos, G., Jiang, R., Wellborn, W., Thaler, T., Bommarius, A., Orville, A., 2006. The crystal structure of NAD(P)H oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis*: insights into the conversion of O₂ into

- two water molecules by the flavoenzyme. *J. Am. Chem. Soc.* 45, 9648–59.
- Ma, S.K., Gruber, J., Davis, C., Newman, L., Gray, D., Wang, A., Grate, J., Huisman, G.W., Sheldon, R.A., 2010. A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate. *Green Chem.* 12, 81.
- MacDonald, I., 1973. 7 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Escherichia coli*: preliminary studies. *Biochem. Biophys. Acta* 309.
- Macdonald, I.A., Hutchison, D.M., 1982. Epimerization versus dehydroxylation of the 7 α -hydroxyl-group of primary bile acids: Competitive studies with *Clostridium absonum* and 7 α -dehydroxylating bacteria (*Eubacterium* sp.). *J. steroid Biochem.*
- Macdonald, I., Jellett, J., Mahony, D., Holdeman, L., 1979. Bile salt 3 α - and 12 α -Hydroxysteroid Dehydrogenases from *Eubacterium lentum* and related Organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 992–1000.
- Macdonald, I., Meier, E., Mahony, D., Costain, G., 1976. 3 α -, 7 α -And 12 α -hydroxysteroid dehydrogenase activities from *Clostridium perfringens*. *Biochim. Biophys. Acta* 450, 142–153.
- Macdonald, I., Roach, P., 1981. Bile salt induction of 7 α - and 7 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases in *Clostridium absonum*. *Biochem. Biophys. Acta* 665, 262–269.
- Macdonald, I., Rochon, Y., Holdeman, L., 1982. Formation of ursodeoxycholic acid from chenodeoxycholic acid by a 7 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-elaborating *Eubacterium aerofaciens* strain cocultured with 7 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase-elaborating organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1187–1195.
- MacDonald, I., Rochon, Y., Hutchison, D., Holdeman, L., 1982. Formation of ursodeoxycholic acid from chenodeoxycholic acid by a 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-elaborating *Eubacterium aerofaciens* strain cocultured with 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase-elaborating organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1187–95.
- Makino, I., Shinozaki, K., Yoshino, K., Nakagawa, S., 1975. Dissolution of cholesterol gallstones by long-term administration of ursodeoxycholic acid. *J. Gastroenterol.* 72, 690–702.
- Makino, I., Tanaka, H., 1998. From a choleric to an immunomodulator: Historical review of ursodeoxycholic acid as a medicament. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 659–664.
- Maser, E., Möbus, E., Xiong, G., 2000. Functional expression, purification, and characterization of 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 622–8.
- Medici, A., Pedrini, P., Bianchini, E., Fantin, G., Guerrini, A., Natalini, B., Pellicciari, R., 2002. 7 α -OH epimerisation of bile acids via oxido-reduction with *Xanthomonas maltophilia*. *Steroids* 67, 51–6.
- Meng, E.C., Pettersen, E.F., Couch, G.S., Huang, C.C., Ferrin, T.E., 2006. Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics* 7, 339.
- Michaelis, L., Menten, M.L., 1913. The kinetics of the inversion effect. *Biochem. Z.* 49, 333–369.
- Michel-Briand, Y., 1969. Relation between steroid structure and its 5nductor effect on 3 α -hydroxysteroid NAD 6xidoreductae of *Pseudomonas testosteroni*. *Eur. J. Biochem.* 10, 132-.
- Monte, M.-J., Marin, J., Antelo, A., Vazquez-Tato, J., 2009. Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J. Gastroenterol.* 15, 804–816.
- Monti, D., Ferrandi, E.E., Zanellato, I., Hua, L., Polentini, F., Carrea, G., Riva, S., 2009. One-Pot Multienzymatic Synthesis of 12-Ketoursodeoxycholic Acid: Subtle Cofactor Specificities Rule the Reaction Equilibria of Five Biocatalysts Working in a Row. *Adv. Synth. Catal.* 351, 1303–1311.
- Mukhopadhyay, S., Maitra, U., 2004. Chemistry and biology of bile acids. *Curr. Sci. India* 87, 1666–1683.

Literaturverzeichnis

- Nallamsetty, S., Waugh, D.S., 2006. Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners. *Protein Expr. Purif.* 45, 175–182.
- Nguyen, D., Juran, B., Lazaridis, K., 2010. Primary biliary cirrhosis. *Best Pr. Res. Cl. Ga.* 24, 647–54.
- Niefind, K., Müller, J., Riebel, B., Hummel, W., Schomburg, D., 2003. The crystal structure of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* suggests the structural basis of its metal dependency. *J. Mol. Biol.* 327, 317–328.
- Nowak, C., Beer, B., Pick, A., Roth, T., Lommes, P., Sieber, V., 2015. A water-forming NADH oxidase from *Lactobacillus pentosus* suitable for the regeneration of synthetic biomimetic cofactors. *Front. Microbiol.* 6, 1–9.
- Oppermann, U., Netter, K., Maser, E., 1993. Carbonyl reduction by 3 α -HSD from *Comamonas testosteroni*: New properties and its relationship to the SCAD family. *Adv. Exp. Med. Biol.* 328, 379–390.
- Oppermann, U.C., Filling, C., Berndt, K.D., Persson, B., Benach, J., Ladenstein, R., Jörnvall, H., 1997. Active site directed mutagenesis of 3 β /17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase establishes differential effects on short-chain dehydrogenase/reductase reactions. *J. Biochem.* 36, 34–40.
- Oppermann, U.C., Maser, E., 1996. Characterization of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *Eur. J. Biochem.* 241, 744–9.
- Palmer, R.H., Bolt, M.G., 1971. Bile acid sulfates. I. Synthesis of lithocholic acid sulfates and their identification in human bile. *J. Lipid Res.* 12, 671–9.
- Pantoliano, M., Petrella, E., Kwasnoski, J., Lobanov, V., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B., Lane, P., Salemme, F., 2001. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. *J. biomol screen* 6, 429–440.
- Park, J.T., Hirano, J.-I., Thangavel, V., Riebel, B.R., Bommarius, A.S., 2011. NAD(P)H oxidase V from *Lactobacillus plantarum* (NoxV) displays enhanced operational stability even in absence of reducing agents. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 71, 159–165.
- Pawlowski, J.E., Huizinga, M., Penning, T.M., 1991. Cloning and sequencing of the cDNA for rat liver 3 α -hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 266, 8820–5.
- Pedrini, P., Andreotti, E., Guerrini, A., Dean, M., Fantin, G., Giovannini, P., 2006. *Xanthomonas maltophilia* CBS 897.97 as a source of new 7 β - and 7 α -Hydroxysteroid Dehydrogenases and cholyglycine hydrolase: improved biotransformations of bile acids. *Steroids* 71, 189–98.
- Persson, B., Kallberg, Y., Bray, J.E., Bruford, E., Dellaporta, S.L., Favia, A.D., Duarte, R.G., Jörnvall, H., Kavanagh, K.L., Kedishvili, N., Kisiela, M., Maser, E., Mindnich, R., Orchard, S., Penning, T.M., Thornton, J.M., Adamski, J., Oppermann, U., 2009. The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem. Biol. Interact.* 178, 94–8.
- Persson, B., Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H., 2003. Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem. Biol. Interact.* 143–144, 271–8.
- Petschacher, B., Leitgeb, S., Kavanagh, K.L., Wilson, D.K., Nidetzky, B., 2005. The coenzyme specificity of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) explored by site-directed mutagenesis and X-ray crystallography. *Biochem. J* 385, 75–83.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605–1612.

Literaturverzeichnis

- Pettersson, G., 1987. Liver alcohol Dehydrogenase. *Crit. Rev. Biochem.* 21, 349–389.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G., 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598–599.
- Portincasa, P., Ciaula, A. Di, Bonfrate, L., Wang, D.Q.H., 2012. Therapy of gallstone disease: What it was , what it is , what it will be. *World J Gastroenterol.* 3, 7–20.
- Portincasa, P., Moschetta, A., Palasciano, G., 2006. Cholesterol gallstone disease. *Lancet* 368, 230–239.
- Prabha, V., Gupta, M., Seiffge, D., Gupta, K.G., 1990. Purification of 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli* strain 080. *Can J Microbiol* 36, 131–135.
- Rajan, S.S., Lackland, H., Stein, S., Denhardt, D.T., 1998. Presence of an N-terminal polyhistidine tag facilitates stable expression of an otherwise unstable N-terminal domain of mouse tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 13, 67–72.
- Rath, S., 2015. Charakterisierung und Optimierung der 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni*.
- Reed, M., Lieb, A., Nijhout, H., 2010. The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. *BioEssays* 32, 422–9.
- Reetz, M.T., Carballeira, J.D., 2007. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat. Protoc.* 2, 891–903.
- Richter, N., Zienert, A., Hummel, W., 2011. A single-point mutation enables lactate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* to utilize NAD⁺ and NADP⁺ as cofactor. *Eng. Life Sci.* 11, 26–36.
- Ridlon, J., Kang, D.-J., Hylemon, P., 2005. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* 47, 241–259.
- Riva, S., Bovara, R., Pasta, P., Carrea, G., 1986. Preparative-Scale Regio- and Stereospecific Oxidoreduction of Cholic Acid and Dehydrocholic Acid Catalyzed by Hydroxysteroid Dehydrogenases. *J. Org. Chem.* 51, 2902–2906.
- Roma, M.G., Toledo, F.D., Boaglio, A.C., Basiglio, C.L., Crocenzi, F. a, Sánchez Pozzi, E.J., 2011. Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clin. Sci.* 121, 523–544.
- Salen, G., Colalillo, A., Verga, D., Bagan, E., Tint, G., Shefer, S., 1980. Effect of high and low-doses of ursodeoxycholic acid on gallstone dissolution in humans. *Gastroenterol.* 78, 1412–1418.
- Sambrook, J., Green, M.R., 2012. *Molecular Cloning: A laboratory manual (fourth edition)* [WWW Document]. Cold spring Harb. Lab. URL <http://www.molecularcloning.com/> (accessed 5.13.14).
- Savino, S., Ferrandi, E.E., Forneris, F., Rovida, S., Riva, S., Monti, D., Mattevi, A., 2016. Structural and biochemical insights into 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase stereoselectivity. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*
- Sawada, H., Kinoshita, S., Yoshida, T., Taguchi, H., 1980. Microbial production of Chenodeoxycholic acid precursor, 12-Ketochenodeoxycholic acid from Dehydrocholic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 112, 107–112.
- Sawada, H., Kulprecha, S., Nilubol, N., Yoshida, T., Kinoshita, S., Taguchi, H., 1982. Microbial Production of Ursodeoxycholic acid from Lithocholic acid by *Fusarium equiseti* M41. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1249–1252.
- Schafmayer, C., Hartleb, J., Tepel, J., Albers, S., Freitag, S., Völzke, H., Buch, S., Seeger, M., Timm, B., Kremer, B., Fölsch, U.R., Fändrich, F., Krawczak, M., Schreiber, S., Hampe, J., 2006. Predictors of gallstone composition in 1025 symptomatic gallstones from Northern Germany. *BMC gastroenterol.* 6, 36.

Literaturverzeichnis

- Schroer, K., Zelic, B., Oldiges, M., Lütz, S., 2009. Metabolomics for biotransformations: Intracellular redox cofactor analysis and enzyme kinetics offer insight into whole cell processes. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 251–60.
- Schubert, T., Hummel, W., Kula, M.-R., Müller, M., 2001. Enantioselective Synthesis of Both Enantiomers of Various Propargylic Alcohols by Use of Two Oxidoreductases. *Eur. J. Org. Chem.* 11, 4181–4187.
- Sijbesma, F., Schepens, H., 2003. White Biotechnology: Gateway to a more sustainable future. *EuropaBio* 1–26.
- Skålhegg, B.A., 1974a. 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*: Kinetic properties with NAD and its thionicotinamide Analogue. *Eur. J. Biochem.* 603–609.
- Skålhegg, B.A., 1974b. On the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 46, 117–25.
- Smith, M.C., Furman, T.C., Cook, J. a., Ingolia, T., Hsiung, H., 1989. Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography. *J. Inorg. Biochem.* 36, 277.
- Stemmer, W.P., 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370, 389–391.
- Studier, F.W., Moffatt, B.A., 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113–130.
- Sun, H.W., Plapp, B. V., 1992. Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family. *J. Mol. Evol.* 34, 522–35.
- Sun, Q., Chen, L.L., Cao, L., Fang, L., Chen, C., Hua, Z., 2005. An Improved Strategy for High-Level Production of Human Vasostatin120 - 180. *Biotechnol. Prog.* 1048–1052.
- Sutherland, J., Williams, C., 1985. Bile acid induction of 7 α - and 7 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases in *Clostridium limosum*. *J. Lipid Res.* 26, 344–50.
- Sutherland, J.D., Macdonald, I.A., 1982. The metabolism of primary 7-oxo and 7 β -hydroxybile acids by *Clostridium absonum*. *J. Lipid Res.* 23, 726–732.
- Sutherland, J.D., Macdonald, I. a, Forrest, T.P., 1982. The enzymic and chemical synthesis of ursodeoxycholic and chenodeoxycholic acid from cholic acid. *Prep. Biochem.* 12, 307–21.
- Suzuki, K., Ueda, S., Sugiyama, M., Imamura, S., 1993. Cloning and Expression of a *Pseudomonas* 3 α -hydroxy steroid dehydrogenase-encoding gene in *Escherichia coli*. *Gene* 137–140.
- Suzuki, N., Nakamura, Y., Kobayashi, N., Sato, T., 1975. On metal elements in pure gallstones. *J exp. Med.* 116, 233–240.
- Tabor, S., Richardson, C.C., 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes (T7 DNA polymerase/T7 gene 5 protein/proteolysis/13-lactamase/rifampicin). *Biochem* 82, 1074–1078.
- Tamaoka, J., Ha, D., Komagata, K., 1987. Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talaly 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov., with an emended decription of the genus *Comamonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 52–59.
- Tanabe, T., Tanaka, N., Uchikawa, K., Kabashima, T., Ito, K., Nonaka, T., Mitsui, Y., Tsuru, M., Yoshimoto, T., 1998. Roles of the Ser146, Tyr159, and Lys163 residues in the catalytic action of 7 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 124, 634–41.
- Tanaka, N., Nonaka, T., Nakamura, K., Hara, A., 2001. SDR Structure, Mechanism of Action, and Substrate Recognition. *Curr. Org. Chem.* 5, 89–111.

- Tanaka, N., Nonaka, T., Tanabe, T., Yoshimoto, T., Tsuru, D., Mitsui, Y., 1996. Crystal structures of the binary and ternary complexes of 7 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* 35, 7715–30.
- Thomas, J.L., Mack, V.L., Sun, J., Terrell, J.R., Bucholtz, K.M., 2010. The functions of key residues in the inhibitor, substrate and cofactor sites of human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 are validated by mutagenesis. *J. Steroid Biochem.* 120, 192–199.
- Trauner, M., Graziadei, I.W., 1999. Review article: mechanisms of action and therapeutic applications of ursodeoxycholic acid in chronic liver diseases. *Aliment. Pharm. Ther.* 13, 979–996.
- van der Donk, W., Zhao, H., 2003. Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 421–426.
- Vázquez-Figueroa, E., Chaparro-Riggers, J., Bommarius, A., 2007. Development of a thermostable glucose dehydrogenase by a structure-guided consensus concept. *ChemBioChem* 8, 2295–301.
- Veech, R., 2006. Determination of the Redox States and Phosphorylation Potential in Living Tissues and Their Relationship to Metabolic Control of Disease Phenotypes. *Bioch. Mol. Bio. Ed.* 34, 168–179.
- Wade, N., 1972. Anabolic steroids: doctors denounce them, but athletes aren't listening. *Science* (80-). 176, 1399–1403.
- Wang, D.Q.-H., Cohen, D.E., Carey, M.C., 2009. Biliary lipids and cholesterol gallstone disease. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, 406–411.
- Ward, A., Brogden, R.N., Heel, R.C., Speight, T.M., Avery, G.S., 1984. Ursodeoxycholic acid: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drug Inf. J.* 27, 95–131.
- Weckbecker, A., Gröger, H., Hummel, W., 2010. Regeneration of Nicotinamide Coenzymes: Principles and Applications for the Synthesis of Chiral Compounds. *Adv. Biochem. Engin* 195–242.
- Weckbecker, A., Hummel, W., 2005. Glucose Dehydrogenase for the Regeneration of NADPH and NADH, in: Barredo, J.L. (Ed.), *Microbial Enzymes and Biotransformations*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 225–238.
- Wells, J., Hylemon, P., 2000. Identification and Characterization of a bile acid 7 α -Dehydroxylation operon in *Clostridium* sp. strain TO-931, a highly active 7 α -Dehydroxylating strain isolated from Human feces. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Wells, J.E., Williams, K.B., Whitehead, T.R., Heuman, D.M., Hylemon, P.B., 2003. Development and application of a polymerase chain reaction assay for the detection and enumeration of bile acid 7 α -dehydroxylating bacteria in human feces. *Clin. Chim. Acta* 331, 127–34.
- Wierenga, R., Terpstra, P., Hol, W., 1985. Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Bio* 187, 101–7.
- Yoshimoto, T., Higashi, H., Kanatani, A., Lin, X., Nagai, H., Oyama, H., Kurazono, K., Tsuru, D., 1991. Cloning and sequencing of the 7 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase gene from *Escherichia coli* HB101 and characterization of the expressed enzyme. *J. Bacteriol.* 173, 2173–2179.
- You, L., Arnold, F.H., 1996. Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Eng.* 9, 77–83.
- Zhao, H., Tian, H., Jin, Y., Cao, X., 2010. Synthesis of 7-ketolithocholic acid via indirect electrooxidation of chenodeoxycholic acid. *J. Appl. Electrochem.* 40, 1307–1316.
- Zheng, M.M., Wang, R.F., Li, C.X., Xu, J.H., 2015. Two-step enzymatic synthesis of ursodeoxycholic acid with a new 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Ruminococcus torques*. *Process Biochem.* 50, 598–604.6
- Ziegler, J., Brandt, W., Geissler, R., Facchini, P., 2009. Removal of substrate inhibition and increase in

Literaturverzeichnis

maximal velocity in the short chain dehydrogenase/reductase salutaridine reductase involved in morphine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 284, 26758–67.

VIII. Anhang

16. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) in lyophilisierter Form bezogen und in der angegebenen Menge dest. Wasser aufgenommen, so dass sie in einer Konzentration von 100 pmol/μl vorlagen. Oligonukleotide für den Einsatz in einer QuikChange™-PCR (3.4.7), die größer als 50 bp waren, wurden speziell mittels hoch auflösender Flüssigchromatographie (HPLC) aufgereinigt.

In Tabelle 55 sind alle Klonierungsoligonukleotide aufgeführt.

Tabelle 55: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Klonierungsoligonukleotide.

<i>Name</i>	<i>5' → 3'</i>	<i>Bemerkung</i>
GDH for	ACCAACCACATATGTATCCGGATTTAAA	<i>NdeI</i>
GDH for2	ACCAACCAGGTCTCACATGTATCCGGATTTAAA	<i>BsaI</i>
GDH rev	ATAATAACTCGAGTTAACCGCGCCTGC	<i>XhoI</i>
GDH rev2	ATAATAAGCGGCCGCTTAACCGCGCCTGC	<i>NotI</i>
3α-HSDH for	AACCAACCAGGATCCATGTCCATCATCGTGAT	<i>BamHI</i>
3α-HSDH for2	AACCAACCACATATGTCCATCATCGTGATAAG	<i>NdeI</i>
3α-HSDH for3	ATTAGGTCTCACATGTCCATCATCGTGATAAG	<i>BsaI</i>
3α-HSDH rev	ATAATATTCGAATTATCAGAACTGTGTCGGG	<i>HindIII</i>
3α-HSDH rev2	ATAATACTCGAGTTAGAACTGTGTCGGGCGCAT	<i>XhoI</i>
3α-HSDH rev3	ATAATAGCGGCCGCTTAGAACTGTGTCGGGCGCAT	<i>NotI</i>
3α-HSDH (his) rev	ATAATACTCGAGGAAGTGTGTCGGGCGCATCAC	<i>XhoI</i>
7β-HSDH for	AACCAACCACATATGAACCTGAGGGAGAAGTAC	<i>NdeI</i>
7β-HSDH for2	AACCAACCATGGGAATGAACCTGAGGGAGA	<i>NcoI</i>
7β-HSDH rev	ATAATAACTCGAGTTAGTCGCGGTAGAACGACCC	<i>XhoI</i>
7β-HSDH rev2	ATAATAAGCGGCCGCTTAGTCGCGGTAGAACGACCC	<i>NotI</i>
7β-HSDH (his) rev	ATAATACTCGAGTTCGCGGTAGAACGACCCCAT	<i>XhoI</i>
7α-HSDH for	AACCAACCACATATGTTAATTCTGACAAC	<i>NdeI</i>
7α-HSDH for2	AACCAACCATGGGAATGTTAATTCTGACAAC	<i>NcoI</i>
7α-HSDH rev	ATAATAACTCGAGTTAATTGAGCTCCTGTAC	<i>XhoI</i>
7α-HSDH (his) rev	ATAATAACTCGAGATTGAGCTCCTGTAC	<i>XhoI</i>
Cd7α-HSDH for	CCGACCATGGGAATGGAAAAATTACAAGGAAAAAATT	<i>NcoI</i>
Cd7α-HSDH for2	CCGCCGCATATGGAAAAATTACAAGGAAAAAATT	<i>NdeI</i>
Cd7α-HSDH (his) rev	GCGGCCGCTCGAGTCCTAATTATCCTAATATAT	<i>XhoI</i>
Cd7α-HSDH rev	CGCCTAGCGGCCGCTTATCCTAATTATCCTAATATAT	<i>NotI</i>
LkADH for	CGCGGCCATGGGAATGACTGATCGTTTAAAAGGC	<i>NcoI</i>
LkADH rev	CAATTAGCGGCCGCTTATTGAGCAGTGATCCACC	<i>NotI</i>
LbNOX for	AACCAACCATGGGAATGAAAGTACAGTTGTT	<i>NcoI</i>
LbNOX rev	ATAATAACTCGAGAGCGTTAACTGATTG	<i>XhoI</i>
LsNOX for	AACCAACCATGGGAATGAAAGTATTGTAGTA	<i>NcoI</i>
LsNOX rev	ATAATAACTCGAGGTATAGTTTAAAGAC	<i>XhoI</i>
LpNOX for		
Lp NOX rev		

Anhang

In Tabelle 56 bis 61 sind alle Mutageneseoligonukleotide aufgeführt.

Tabelle 56: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Mutageneseoligonukleotide für die Glucose Dehydrogenase.

Name	5' → 3'	Austausch
GDH E170K for	ATAAAGCTGATGACAA <u>AG</u> ACATTAGCGTTGGAA	Glu → Lys
GDH E170K rev	TTCCAACGCTAATGTCTTTGTCATCAGCTTTAT	
GDH Q252L for	GACGGCGGTATGACACTCTATCCTTCATTCCAG	Glu → Leu
GDH Q252L rev	CTGGAATGAAGGATAGAGTGTGCATACCGCCGTC	

Tabelle 57: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Mutageneseoligonukleotide für die 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni*.

Name	5' → 3'	Austausch
3 α -HSDH L68D for	ATGGACGGCCTGGTGGATTGCGCCGGCCT	Leu → Asp
3 α -HSDH L68D rev	AGGCCGGCGCAATCCACCAGGCCGTCCAT	
3 α -HSDH L68E for	GACGGCCTGGTG <u>GAG</u> TGCGCCGGCCT	Leu → Glu
3 α -HSDH L68E rev	AGGCCGGCGCACTCCACCAGGCCGTC	
3 α -HSDH L68G for	ATGGACGGCCTGGTGGGGTGCGCCGGCCT	Leu → Gly
3 α -HSDH L68G rev	AGGCCGGCGCA <u>CCC</u> ACCAGGCCGTCCAT	
3 α -HSDH L68S for	GGACGGCCTGGTGT <u>TCG</u> TGCGCCGGCCTG	Leu → Ser
3 α -HSDH L68S rev	CAGGCCGGCGCA <u>CGA</u> CACCAGGCCGTCC	
3 α -HSDH L68C for	GGACGGCCTGGTGT <u>GCT</u> TGCGCCGGCCTGG	Leu → Cys
3 α -HSDH L68C rev	CCAGGCCGGCGCAG <u>CA</u> CACCAGGCCGTCC	
3 α -HSDH L68V for	ACGGCCTGGTGGTGTGCGCCGGC	Leu → Val
3 α -HSDH L68V rev	GCCGGCGCAC <u>ACC</u> CACCAGGCCGT	
3 α -HSDH L68A for	GACGGCCTGGTG <u>GCG</u> TGCGCCGGCCT	Leu → Ala
3 α -HSDH L68A rev	AGGCCGGCGCAG <u>CC</u> CACCAGGCCGTC	
3 α -HSDH 3his for	CTCGAGCACCACC <u>ACTAG</u> CACCAGATCCG	6 His → 3 His
3 α -HSDH 3his rev	CGGATCTCAGTGGTGCTAGTGGTGGTGTCTCGAG	
3 α -HSDH 9his for	CAGTTCCTCGAGCACCACCACCACCACCATCATCATTAGGCTAACAAAG CCCGAAAGGAAGCTGAGTTG	6 His → 9 His
3 α -HSDH 9his rev	CAACTCAGCTTCTTTGCGGCTTTGTTAGCCTAATGATGATGGTGGTG GTGGTGGTGGTGTCTCGAGGAAGT	
3 α -HSDH Lys for	GCGGTGATGCGCCCGACACAGTTCCTCGAGA <u>AAGAAGAAGAAGAAG</u> TGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAG	6 His → 6 Lys
3 α -HSDH Lys rev	CTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGATCTCA <u>TTCTTCTTCTTCTTCT</u> GAGGAAGTGTGTCGGGCGCATCACCGC	

Tabelle 58: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Mutageneseoligonukleotide für die 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens*.

Name	5' → 3'	Austausch
7 β -HSDH T17A for	ATCCTGGGCGCG <u>GCC</u> GAGGGCGTCGGC	Thr → Ala
7 β -HSDH T17A rev	GCCGACGCCCT <u>GCG</u> CCGCGCCAGGAT	
7 β -HSDH T17I for	ATCCTGGGCGCG <u>ATC</u> GAGGGCGTCGGC	Thr → Iso
7 β -HSDH T17I rev	GCCGACGCCCT <u>GAT</u> CGCGCCAGGAT	
7 β -HSDH T17F for	ATCCTGGGCGCG <u>TTG</u> GAGGGCGTCGGC	Thr → Phe
7 β -HSDH T17F rev	GCCGACGCCCT <u>GAA</u> CGCGCCAGGAT	
7 β -HSDH T17S for	TCCTGGGCGCG <u>AGC</u> GAGGGCGTC	Thr → Ser
7 β -HSDH T17S rev	GACGCCCT <u>GCT</u> CGCGCCAGGA	
7 β -HSDH G39S for	GTCGTCATGGT <u>AGC</u> CGTCGCGAGGAG	Gly → Ser
7 β -HSDH G39S rev	CTCCTCGCGAC <u>GCT</u> GACCATGACGAC	

Anhang

Fortsetzung der Tabelle 56 auf Seite 216.

<i>Name</i>	<i>5' → 3'</i>	<i>Austausch</i>
7β-HSDH G39E for	GTCGTCATGGT <u>CGAG</u> CGTCGCGAGGAG	Gly → Glu
7β-HSDH G39E rev	CTCCTCGCGACG <u>CTCG</u> ACCATGACGAC	
7β-HSDH G39D for	GTCGTCATGGT <u>CGAC</u> CGTCGCGAGGAG	Gly → Asp
7β-HSDH G39D rev	CTCCTCGCGACG <u>GTCG</u> ACCATGACGAC	
7β-HSDH G39D/R40I for	GTCGTCATGGT <u>CGAC</u> ATTTCGCGAGGAGAAG	Gly → Asp
7β-HSDH G39D/R40I rev	CTTCTCCTCGCGA <u>AATGT</u> CGACCATGACGAC	Arg → Iso
7β-HSDH G39D/R40L for	GTCGTCATGGT <u>CGAC</u> CTTCGCGAGGAGAAG	Gly → Asp
7β-HSDH G39D/R40L rev	CTTCTCCTCGCGA <u>AAGGT</u> CGACCATGACGAC	Arg → Leu
7β-HSDH G39D/R40W for	GTCGTCATGGT <u>CGACT</u> GCGCGAGGAGAAG	Gly → Asp
7β-HSDH G39D/R40W rev	CTTCTCCTCGCG <u>CCAGT</u> CGACCATGACGAC	Arg → Try
7β-HSDH R64E for	ACCAAGGTCGTG <u>GAG</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Glu
7β-HSDH R64E rev	GCTAAAGTCGG <u>CTC</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64D for	ACCAAGGTCGTG <u>GAC</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Asp
7β-HSDH R64D rev	GCTAAAGTCGG <u>GCT</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64I for	ACCAAGGTCGTG <u>ATC</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Iso
7β-HSDH R64I rev	GCTAAAGTCGG <u>GAT</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64W for	ACCAAGGTCGTG <u>TGG</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Trp
7β-HSDH R64W rev	GCTAAAGTCGG <u>CCAC</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64Y for	ACCAAGGTCGTG <u>TAC</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Tyr
7β-HSDH R64Y rev	GCTAAAGTCGG <u>GTA</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64F for	ACCAAGGTCGTG <u>TTG</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Phe
7β-HSDH R64F rev	GCTAAAGTCGG <u>GAA</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64C for	ACCAAGGTCGTG <u>TGC</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Cys
7β-HSDH R64C rev	GCTAAAGTCGG <u>GCA</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64N for	ACCAAGGTCGTG <u>AAC</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Asn
7β-HSDH R64N rev	GCTAAAGTCGG <u>GCTT</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64Q for	ACCAAGGTCGTG <u>CAG</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Gln
7β-HSDH R64Q rev	GCTAAAGTCGG <u>CTG</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64H for	ACCAAGGTCGTG <u>CAC</u> GCCGACTTTAGC	Arg → His
7β-HSDH R64H rev	GCTAAAGTCGG <u>GCTG</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64K for	ACCAAGGTCGTG <u>AAG</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Lys
7β-HSDH R64K rev	GCTAAAGTCGG <u>CTT</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64G for	ACCAAGGTCGTG <u>GGC</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Gly
7β-HSDH R64G rev	GCTAAAGTCGG <u>GCC</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64A for	ACCAAGGTCGTG <u>GCC</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Ala
7β-HSDH R64A rev	GCTAAAGTCGG <u>GCC</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64V for	ACCAAGGTCGTG <u>GTC</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Val
7β-HSDH R64V rev	GCTAAAGTCGG <u>GACC</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64T for	ACCAAGGTCGTG <u>ACG</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Thr
7β-HSDH R64T rev	GCTAAAGTCGG <u>GCT</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64P for	ACCAAGGTCGTG <u>CCG</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Pro
7β-HSDH R64P rev	GCTAAAGTCGG <u>GCCG</u> CACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64L for	ACCAAGGTCGTG <u>CTC</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Leu
7β-HSDH R64L rev	GCTAAAGTCGG <u>GCG</u> ACACGACCTTGGT	
7β-HSDH R64S for	ACCAAGGTCGTG <u>AGC</u> GCCGACTTTAGC	Arg → Ser
7β-HSDH R64S rev	GCTAAAGTCGG <u>GCT</u> CACGACCTTGGT	

Tabelle 59: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Mutageneseoligonukleotide für die NADH-Oxidase aus *L. plantarum*.

<i>Name</i>	<i>5' → 3'</i>	<i>Austausch</i>
LpNOX_178R179R for	CAGAAGCAAGGTAAGGAAGTCACACTAATTGAT <u>CGTAG</u> ACCACGGATTTAAATA	Gly → Arg
LpNOX_178R179R rev	TATTTAAATCCGTGG <u>TCTAC</u> GATCAATTAGTGTGACTTCTTACCTTGCTTCTG	Leu → Arg

Anhang

Tabelle 60: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Mutageneseoligonukleotide für die 7 α -HSDH aus *Escherichia coli*.

Name	5' → 3'	Austausch
7 α -HSDH D42G for	GTGGTGGTCAGT <u>GGT</u> ATTAACGCCGAC	Asp → Gly
7 α -HSDH D42G rev	GTCGGCGTTAAT <u>ACCA</u> CTGACCACCAC	
7 α -HSDH D42A for	GTGGTGGTCAGT <u>GCT</u> ATTAACGCCGAC	Asp → Ala
7 α -HSDH D42A rev	GTCGGCGTTAAT <u>AGCA</u> CTGACCACCAC	
7 α -HSDH D42V for	GTCGGCGTTAAT <u>AACA</u> CTGACCACCAC	Asp → Val
7 α -HSDH D42V rev	GTGGTGGTCAGT <u>GTT</u> ATTAACGCCGAC	
7 α -HSDH D42K for	GTGGTGGTCAGT <u>AAG</u> ATTAACGCCGAC	Asp → Lys
7 α -HSDH D42K rev	GTCGGCGTTAAT <u>CTTA</u> CTGACCACCAC	
7 α -HSDH D42R for	GTGGTGGTCAGT <u>CGT</u> ATTAACGCCGAC	Asp → Arg
7 α -HSDH D42R rev	GTCGGCGTTAAT <u>ACGA</u> CTGACCACCAC	
7 α -HSDH D42G/I43R for	CATCTGTGGTGGTCAGT <u>GGTAGGA</u> ACGCCGACGCAGCTAAC	Asp → Gly
7 α -HSDH D42G/I43R rev	GTTAGCTGCGTCGGCGTT <u>CCTACCA</u> CTGACCACCACAGATG	Iso → Arg
7 α -HSDH D42A/I43R for	CATCTGTGGTGGTCAGT <u>GCTAGGA</u> ACGCCGACGCAGCTAAC	Asp → Ala
7 α -HSDH D42A/I43R rev	GTTAGCTGCGTCGGCGTT <u>CCTAGCA</u> CTGACCACCACAGATG	Iso → Arg
7 α -HSDH D42G/I43H for	GCATCTGTGGTGGTCAGT <u>GGTCATA</u> ACGCCGACGCAGCTAAC	Asp → Gly
7 α -HSDH D42G/I43H rev	GTTAGCTGCGTCGGCGTT <u>ATGACCA</u> CTGACCACCACAGATGC	Iso → His
7 α -HSDH D42A/I43H for	GCATCTGTGGTGGTCAGT <u>GCTCATA</u> ACGCCGACGCAGCTAAC	Asp → Ala
7 α -HSDH D42A/I43H rev	GTTAGCTGCGTCGGCGTT <u>ATGAGCA</u> CTGACCACCACAGATGC	Iso → His

Tabelle 61: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Mutageneseoligonukleotide für die 7 α -HSDH aus *Clostridium difficile*.

Name	5' → 3'	Austausch
7 α -HSDH K16G for	AAATTGCAGTAGTTACTGCAGCAACAG <u>GAG</u> GTATTGGATTAGCATCAG	Lys → Gly
7 α -HSDH K16G rev	CTGATGCTAATCCAATACCT <u>CTG</u> TGTGCTGCAGTAACTACTGCAATTT	
7 α -HSDH K16A for	AAATTGCAGTAGTTACTGCAGCAACAG <u>CAG</u> GTATTGGATTAGCATCAG	Lys → Ala
7 α -HSDH K16A rev	CTGATGCTAATCCAATACCT <u>GCT</u> GTTGCTGCAGTAACTACTGCAATTT	
7 α -HSDH K16D for	ATTGCAGTAGTTACTGCAGCAACAG <u>ATG</u> GTATTGGATTAGCATCAG	Lys → Asp
7 α -HSDH K16D rev	CTGATGCTAATCCAATACCAT <u>CTG</u> TGTGCTGCAGTAACTACTGCAAT	
7 α -HSDH K16S for	TTGCAGTAGTTACTGCAGCAACAAG <u>CGG</u> TATTGGATTAGCATCAG	Lys → Ser
7 α -HSDH K16S rev	CTGATGCTAATCCAATACC <u>GCT</u> TGTGCTGCAGTAACTACTGCAA	
7 α -HSDH K16T for	TTGCAGTAGTTACTGCAGCAACAAG <u>GGT</u> TATTGGATTAGCATCAG	Lys → Thr
7 α -HSDH K16T rev	CTGATGCTAATCCAATAC <u>CGT</u> TGTGCTGCAGTAACTACTGCAA	
7 α -HSDH A37D for	GCAACTGTGTA <u>CTTAGCAGAT</u> CGTTCAGAAGAATTAGCT	Ala → Asp
7 α -HSDH A37D rev	AGCTAATTCTTCTGAACGAT <u>CTG</u> CTAAGTACACAGTTGC	
7 α -HSDH A37E for	GAGCAACTGTGTA <u>CTTAGCAGAG</u> CGTTCAGAAGAATTAGCTCAT	Ala → Glu
7 α -HSDH A37E rev	ATGAGCTAATTCTTCTGAACG <u>CTG</u> CTAAGTACACAGTTGCTC	
7 α -HSDH A37S for	AGCAAAAAATGGAGCAACTGTGTA <u>CTTAGCAAG</u> TCGTTTTCAGAAGAATTA	Ala → Ser
7 α -HSDH A37S rev	TAATTCTTCTGAACG <u>ACTT</u> GCTAAGTACACAGTTGCTCCATTTTTTCT	
7 α -HSDH R38I for	AAATGGAGCAACTGTGTA <u>CTTAGCAGAT</u> TTTTCAGAAGAATTAGCTCATGAAGT	Arg → Iso
7 α -HSDH R38I rev	TAACTTCATGAGCTAATTCTTCTGAAATAT <u>CTG</u> CTAAGTACACAGTTGCTCCATTT	
7 α -HSDH R38L for	GAGCAACTGTGTA <u>CTTAGCAGAT</u> CTTTTCAGAAGAATTAGCTCATGA	Arg → Leu
7 α -HSDH R38L rev	TCATGAGCTAATTCTTCTGAAAGAT <u>CTG</u> CTAAGTACACAGTTGCTC	
7 α -HSDH R38V for	TGGAGCAACTGTGTA <u>CTTAGCAGAT</u> GTTTTCAGAAGAATTAGCTCATGAAG	Arg → Val
7 α -HSDH R38V rev	CTTCATGAGCTAATTCTTCTGAAACAT <u>CTG</u> CTAAGTACACAGTTGCTCCA	
7 α -HSDH R38N for	AAATGGAGCAACTGTGTA <u>CTTAGCAGATA</u> ATTTCAGAAGAATTAGCTCATGAAGTTA	Arg → Asn
7 α -HSDH R38N rev	TAACTTCATGAGCTAATTCTTCTGAAATAT <u>CTG</u> CTAAGTACACAGTTGCTCCATTT	

17. SDS-Gele

SDS-Bilder der heterologen Expression der Sättigungsmutanten von 7 β -HSDH an Position Arg64

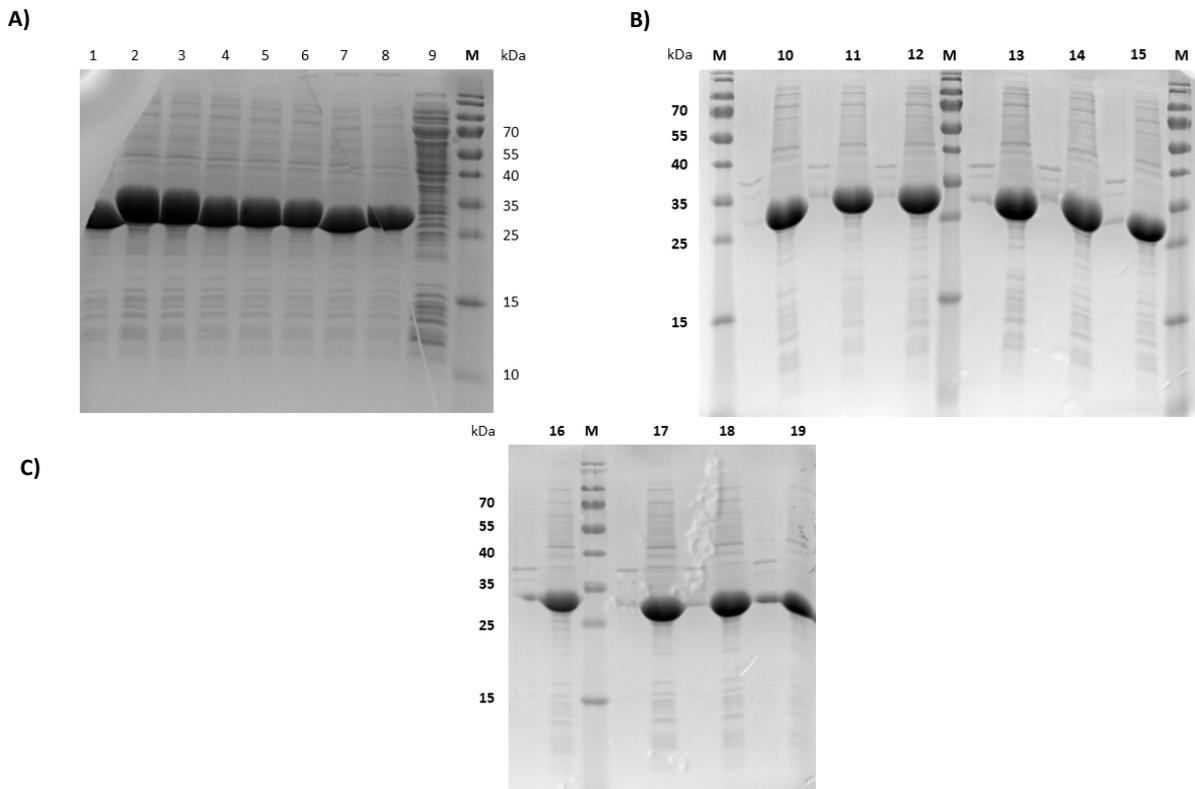


Abb. 103: SDS-Gel der 7 β -HSDH Sättigungsmutanten an der Position Arg64 nach Expression in Schüttelkolben-Fermentation in LB. Als lösliche Fraktion ist der zellfreie Rohextrakt aufgetragen. Weiterhin wurde teilweise auch die inclusion body-Fraktion aufgetragen. Die Größe der 7 β -HSDH-Mutanten beträgt ca. 28 bis 29 kDa. Aufgetragen wurde ca. 15 μ g (Bild A) bzw. 10 μ g (Bild B und C) Protein.

1 = Wildtyp; 2 = Glutaminsäure; 3 = Asparaginsäure; 4 = Threonin; 5 = Prolin; 6 = Serin; 7 = Leucin; 8 = Tyrosin; 9 = (N) Asparagin; 10 = Tryptophan; 11 = Histidin; 12 = Cystein; 13 = Glycin; 14 = Threonin; 15 = Phenylalanin; 16 = Alanin; 17 = Isoleucin; 18 = Valin; 19 = Lysin

SDS-Bilder der heterologen Expression und Aufreinigung der Doppelmutanten 7 β -HSDH [G39S/R64D] und [G39S/R64E]

Anhang

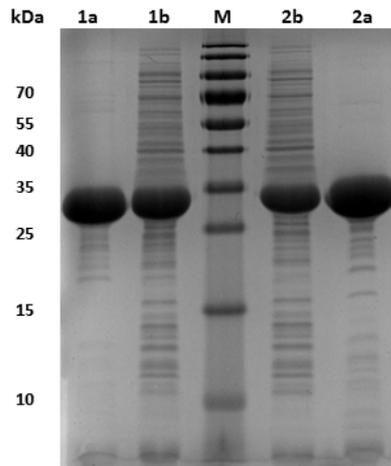


Abb. 104: SDS-Gel der erstellten 7β -HSDH Mutanten [G39S/R64D] (1) und [G39S/R64E] (2) aus *C. aerofaciens* nach Expression in Schüttelkolben-Fermentation in LB. Als lösliche Fraktion ist der zellfreie Rohextrakt (b) und das aufgereinigte Protein (a) aufgetragen. Die Größe und Mutanten beträgt ca. 29,8 kDa. Aufgetragen wurde ca. 10 μ g Protein.

SDS-Bilder der heterologen Expression der Cd7 α -HSDH-Mutanten

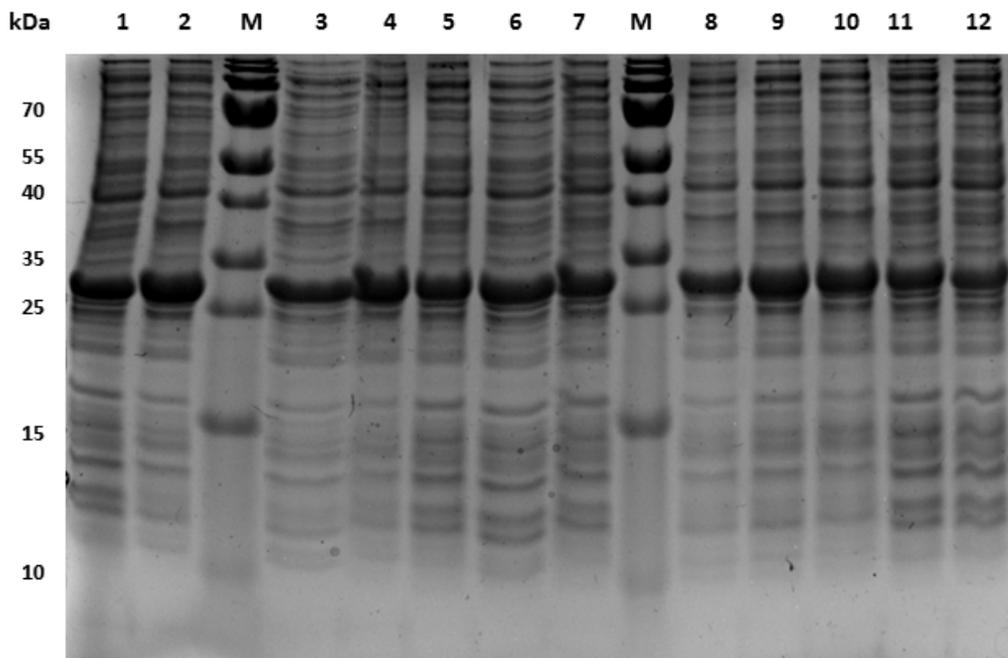


Abb. 105: SDS-Gel der erstellten NAD⁺-abhängigen 7α -HSDH Mutanten aus *C. difficile* nach Expression in Schüttelkolben-Fermentation in LB. Als lösliche Fraktion ist der zellfreie Rohextrakt aufgetragen. Die Größe der Cd7 α -HSDH (Wildtyp und Mutanten) beträgt ca. 30 kDa. Aufgetragen wurde ca. 10 μ g Protein.

1 = Cd7 α -HSDH [A37S]; 2 = Cd7 α -HSDH; 3 = Cd7 α -HSDH [K16A]; 4 = Cd7 α -HSDH [K16G]; 5 = Cd7 α -HSDH [K16S]; 6 = Cd7 α -HSDH [K16T]; 7 = Cd7 α -HSDH [K16D]; 8 = Cd7 α -HSDH [A37D/K16A]; 9 = Cd7 α -HSDH [A37D/K16G]; 10 = Cd7 α -HSDH [A37D/K16S]; 11 = Cd7 α -HSDH [A37D/K16T]; 12 = Cd7 α -HSDH [A37D/K16D]

SDS-Bilder der heterologen Expression und der Aufreinigung der 7α -HSDH aus *E. coli*

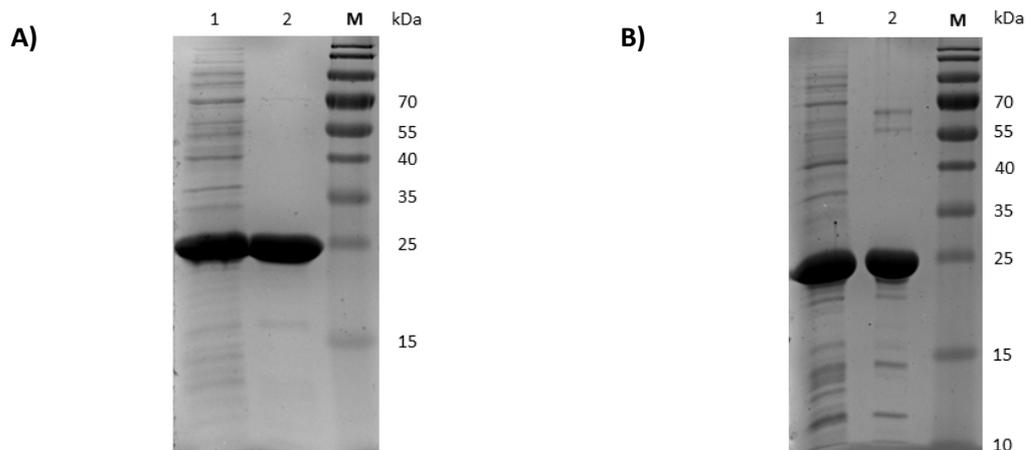


Abb. 106: SDS-Gel der 7α -HSDH aus *E. coli* mit N-terminalen 6xHis-Tag (Bild **A**) bzw. C-terminalen 6xHis-Tag (Bild **B**) nach Expression in Schüttelkolben-Fermentation in LB. Als lösliche Fraktion ist der zellfreie Rohextrakt aufgetragen. Die Größe der 7α -HSDH mit N-terminalen 6xHis-Tag beträgt ca. 28,9 kDa und mit C-terminalen 6xHis-Tag ca. 27,8 kDa. Aufgetragen wurden ca. 10 μ g Protein.

1 = Rohextrakt; 2 = aufgereinigtes Protein nach Ni-NTA Chromatographie; M = Marker.

SDS-Bilder der heterologen Expression der NADP^+ -abhängigen 7α -HSDH Mutanten aus *E. coli*

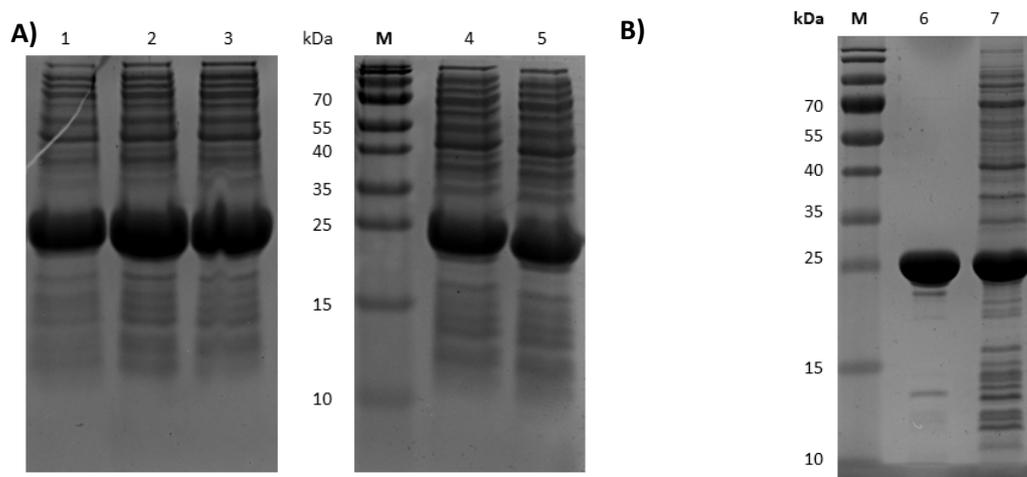


Abb. 107: SDS-Gel der erstellten NADP^+ -abhängigen 7α -HSDH Mutanten aus *E. coli* nach Expression in Schüttelkolben-Fermentation in LB. Als lösliche Fraktion ist der zellfreie Rohextrakt aufgetragen. Die Größe der 7α -HSDH-Mutanten beträgt ca. 26 bis 27 kDa. Aufgetragen wurden ca. 15 μ g (Bild A) bzw 10 μ g (Bild B) Protein.

1 = 7α -HSDH; 2 = 7α -HSDH [D42G]; 3 = 7α -HSDH [I43R]; 4 = 7α -HSDH [D42G/I43R]; 5 = 7α -HSDH [D42A/I43R]; 6 = aufgereinigte 7α -HSDH [D42G/I43R]; 7 = 7α -HSDH [D42G/I43R]; M = Marker.

SDS-Bilder der heterologen Expression und aufgereinigten Varianten der 3α -HSDH

Anhang

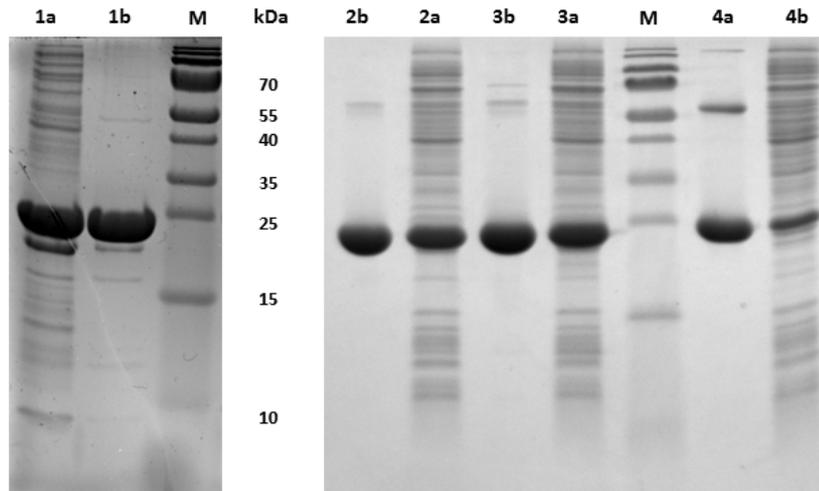
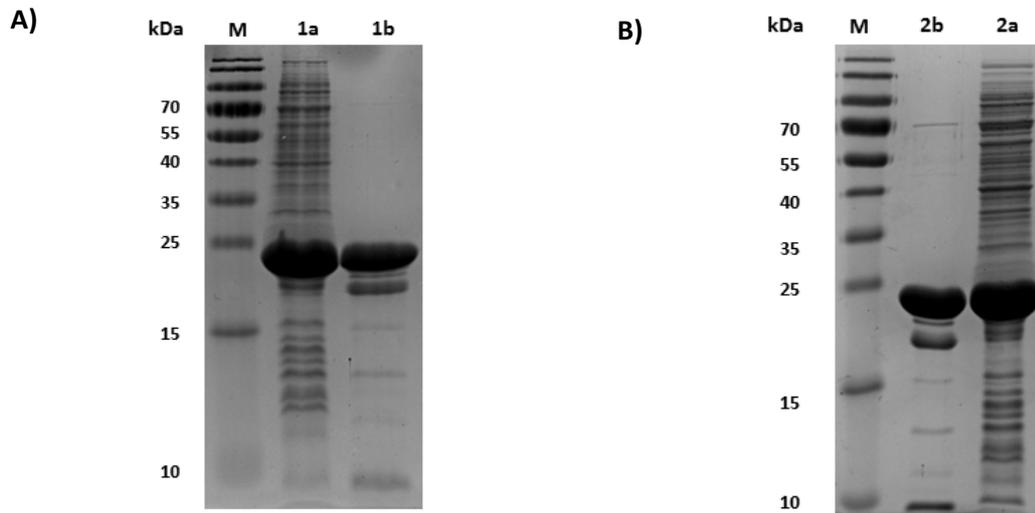


Abb. 108: SDS-Gel der erstellten Varianten der 3 α -HSDH mit verschiedenen langen Tags am C-Terminus nach Expression in Schüttelkolben-Fermentation in LB. Als lösliche Fraktion ist der zellfreie Rohextrakt (a) und das aufgereinigte Protein (b) aufgetragen. Die Größe der 3 α -HSDH-mit 3xHis-Tag beträgt ca. 27,1 kDa. Mit 6xHis-Tag ca. 27,5 kDa und mit 9xHis-Tag a. 27,9 kDa. Als Vergleich wurde noch die Variante mit N-terminalen 6xHis-Tag aufgetragen. Aufgetragen wurden ca. 10 μ g Protein.

1 = 3 α -HSDH mit 3xHis-Tag; 2 = 3 α -HSDH mit 6xHis-Tag; 3 = 3 α -HSDH mit 9xHis-Tag; 4 = 3 α -HSDH mit 6xHis-Tag am N-Terminus; M = Marker.

SDS-Bilder der heterologen Expression der 3 α -HSDH Mutanten



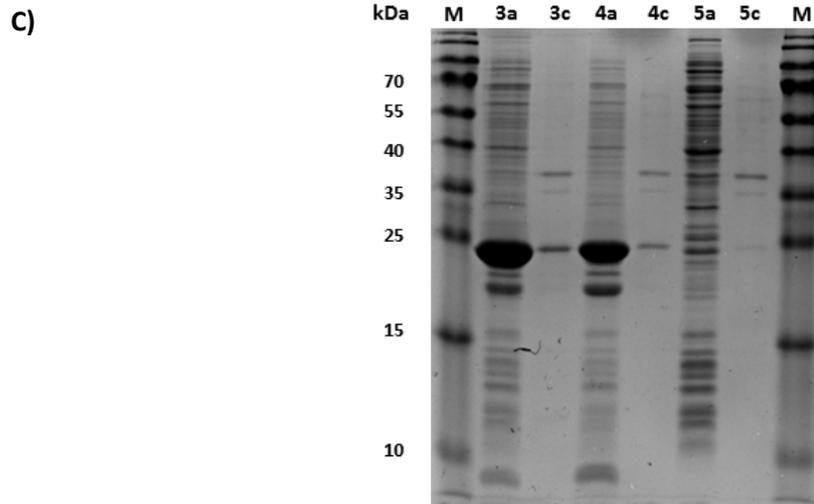


Abb. 109: SDS-Gel der erstellten Mutanten der 3α -HSDH mit C-terminalen 6xHis-Tag nach Expression in Schüttelkolben-Fermentation in LB. Als lösliche Fraktion ist der zellfreie Rohextrakt (a) und das aufgereinigte Protein (b) bzw. die inclusion bodies (c) aufgetragen. Die Größe der Mutanten beträgt ca. 27,5 kDa bis 28,1 kDa. Aufgetragen wurden ca. 10 μ g Protein. 1 = 3α -HSDH [L68A]; 2 = 3α -HSDH [R34N/L68A]; 3 = 3α -HSDH [L68A]; 4 = 3α -HSDH [L68V]; 5 = 3α -HSDH [L68K]; M = Marker.

18. Sequenzen der Dehydrogenasen

Sequenz der 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni* (Uniprot: Q9ZFY9)

```

1 atgtccatca tcgtgataag cggctgcgcc accggcattg gtgcccgtac gcgcaaggtc ctggaggcgg cgggtcacca
1 M S I I V I S G C A T G I G A A T R K V L E A A G H
81 gatcgtaggc atcgatatac gcgatgcgga agtgattgcc gatctctcga cggccgaagg tcgaaagcag gcgattgccg
27 Q I V G I D I R D A E V I A D L S T A E G R K Q A I A
161 atgtactggc gaagtgcagc aagggcatgg accggcctgg gctgtgcgcc ggccctgggac cgcagaccaa ggtgcttggc
54 D V L A K C S K G M D G L V L C A G L G P Q T K V L G
241 aatgtggttt cggtaatta ttttggcgcg accgagctga tggatgcctt tttgccagcg ctgaaaaaag gccatcagcc
81 N V V S V N Y F G A T E L M D A F L P A L K K G H Q
321 cgcagccgtc gtcattctgt ccgtggcttc cgcgcatctg gcttttgaca agaaccact ggcgctggca ctggaagccg
107 P A A V V I S S V A S A H L A F D K N P L A L A L E A
401 gcgaggaagc caaggcccgc gccattgtcg aacatgcggg agagcagggc ggaaatctgg cctatgcggg cagcaagaat
134 G E E A K A R A I V E H A G E Q G G N L A Y A G S K N
481 gctttgacgg tggctgtgcg caaacgcgcc gccgcctggg gcgaggctgg cgtgcgcctg aacaccatcg cccccgtgc
161 A L T V A V R K R A A A W G E A G V R L N T I A P G
561 aaccgagact cccttgctgc agcgggcct gcaggaccg cgctatggcg aatccattgc caagttcgtt cctcccattg
187 A T E T P L L Q A G L Q D P R Y G E S I A K F V P P M
641 gccgcgctgc cgagccgtcc gagatggcgt cggtcacgc cttttgatg agcccggccg caagctatgt gcatggcgcg
214 G R R A E P S E M A S V I A F L M S P A A S Y V H G A
721 cagatcgtca ttgatggcg cattgatgcg gtgatgcgcc cgacacagtt ctga
241 Q I V I D G G I D A V M R P T Q F -

```

Abb. 110: Aminosäure- und Nukleinsäuresequenz der 3 α -HSDH aus *Comamonas testosteroni* (DMZ Nr.: 50244).

Sequenz der 7 α -HSDH aus *E. coli* (Uniprot: POAET8)

```

1 atgtttaatt ctgacaacct gagactgcac ggaaaatcgc ccatcatcac aggtgcgggt gcaggattg gtaaaaaaat
1 M F N S D N L R L D G K C A I I T G A G A G I G K E
81 cgccattaca ttcgagcagc ctggcgcac tttggtggtc agtgatatta acgcccagc agctaaccat gttgtagacg
27 I A I T F A T A G A S V V V S D I N A D A A N H V V D
161 aaattcaaca actgggtggt caggcatttg cctgcccttg tgatattact tccgaacag aactctctgc actggcagac
54 E I Q Q L G G Q A F A C R C D I T S E Q E L S A L A D
241 tttgctatca gtaagctggg taaagttgat attctggtta acaacgccgg tggcggtgga cctaaaccgt ttgatatgcc
81 F A I S K L G K V D I L V N N A G G G G P K P F D M
321 aatggcggat tttcgcctg cttatgaact gaatgtggtt tctttttcc atctgtcaca actgttgcg ccagaaatgg
107 P M A D F R R A Y E L N V F S F F H L S Q L V A P E M
401 aaaaaaatgg cgggtgctgt attctgacca tcacttctat ggccgcagaa aataaaaaa taaacatgac ttcctatgca
134 E K N G G G V I L T I T S M A A E N K N I N M T S Y A
481 tcattctaaag ctgcccagc tcattctggtc agaaatatgg cgtttgacct gggtgaaaaa aatattoggg taaatggcat
161 S S K A A A S H L V R N M A F D L G E K N I R V N G
561 tgcgcccggg gcaatattaa ccgatgccct gaaatccgtt attacaccag aaattgaaca aaaaatgta cagcacagc
187 I A P G A I L T D A L K S V I T P E I E Q K M L Q H T
641 cgatcagacg tctgggcca cgcgaagata ttgctaaccg agcgtgttcc ctttgctcgc ctgctgcgag ctgggtaagc
214 P I R R L G Q P Q D I A N A A L F L C S P A A S W V S
721 ggacaaatc tcaccgtctc cgggtggtgg gtacaggagc tcaattaa
241 G Q I L T V S G G G V Q E L N -

```

Abb. 111: Aminosäure- und Nukleinsäuresequenz der 7 α -HSDH aus *E. coli* K12.

Anhang

Sequenz der 7 α -HSDH aus *Clostridium difficile* (Uniprot: Q18CF0)

```
1 atggaataat tacaaggaaa aattgcagta gttactgcag caacaaaagg tattggatta gcatcagcag agatattagc
1 M E K L Q G K I A V V T A A T K G I G L A S A E I L

81 aaaaaatgga gcaactgtgt acttagcagc tcgttcagaa gaattagcta atgaagttaa aaataaata agtgcagaag
27 A K N G A T V Y L A A R S E E L A N E V I N K I S A E

161 gtggttggtc taagtttgtt tactttaatg ctctggaaga agagaccttt acctcaatga tagaagaggt agttaaataa
54 G G C A K F V Y F N A R E E E T F T S M I E E V V K K

241 gaaggtaaga tagatatact tgtaaacaa tttggttcaa caaaccttcc tcttgacaaa gacctgttaa ctggggatac
81 E G K I D I L V N N F G S T N P S L D K D L V T G D

321 agataatttc tttgacacag taaatactaa tttaaaaagt gtgtatttac catgtaaagc agcaattcct catatgataa
107 T D N F F D T V N T N L K S V Y L P C K A A I P H M I

401 agaatggaaa aggaagtata gtaaatatat caagtatagg ttcagtatta cctgatttat ctagaatagc ttactgtgta
134 K N G K G S I V N I S S I G S V L P D L S R I A Y C V

481 tcaaaagcag caatcaactc attaactcaa aacatagcta cacaatagc taaagacaa gttagatgta atgctgtact
161 S K A A I N S L T Q N I A T Q Y A K D N V R C N A V

561 tccagggtct attgcaacta aagcagcatt agacaatatg tctccagagt tcataaaaga atttttaaag catgttctct
187 L P G L I A T K A A L D N M S P E F I K E F L K H V P

641 taaatcgtat aggggaacca gatgatatag caaaagctgt tctattctat gctagtgatg actcatcatt tataacaggg
214 L N R I G E P D D I A K A V L F Y A S D D S S F I T G

721 gatttacttg aagtgcagg aggatttggg ttacctactc cacaatttgc agataatata ttaggataa
241 D L L E V A G G F G L P T P Q F A D N I L G -
```

Abb. 112: Aminosäure- und Nukleinsäuresequenz der 7 α -HSDH aus *Clostridium difficile* (DMZ Nr.: 12056).

Sequenz der 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens* (Uniprot: A4ECA9)

```
1 atgaacctga gggagaagta cgggtgagtgg ggcctgatcc tgggcgcgac cgaggggcgtc ggcaaggcgt tctgcgagaa
1 M N L R E K Y G E W G L I L G A T E G V G K A F C E

81 gatcgccgcc ggcggcatga acgtcgtcat ggctcgccgt cgcgaggaga agctgaacgt gctcgcagcc gagatccgcc
27 K I A A G G M N V V M V G R R E E K L N V L A G E I R

161 agacctacgg cgtggagacc aaggctcgtc gcgcccactt tagccagccc ggcgctgccc agaccgtcct cgcccgacc
54 E T Y G V E T K V V R A D F S Q P G A A E T V F A A T

241 gagggcctgg acatgggctt catgagctac gtggcctgcc tgcacagctt cggtaagatc caggacaccc cctgggagaa
81 E G L D M G F M S Y V A C L H S F G K I Q D T P W E

321 gcacgaggcc atgatcaacg tcaacgtcgt gacctctctc aagtgtctcc accactacat gcggatcttt gccgcccagg
107 K H E A M I N V N V V T F L K C F H H Y M R I F A A Q

401 accgcgccgc cgtgatcaac gtctcgtcga tgaccggcat cagctccagc ccctggaacg gccagtagcg cgcgggcaag
134 D R G A V I N V S S M T G I S S S P W N G Q Y G A G K

481 gccttcattc tcaagatgac cgaggccgtg gcctgcgagt gcgagggcac cggcgtcgac gtcgaggtea tcaccctcgg
161 A F I L K M T E A V A C E C E G T G V D V E V I T L

561 caccacccta acccccagcc tgctgtccaa cctccccggc ggccccagc gcgaggcctt catgaagatc gccctcaccc
187 G T T L T P S L L S N L P G G P Q G E A V M K I A L T

641 ccgaggagtg cgttgacgag gcctttgaga agctgggtaa ggagctctcc gtcacgcgag gccagcgcaa caaggactcc
214 P E E C V D E A F E K L G K E L S V I A G Q R N K D S

721 gtccacgact ggaaggcaaa ccacaccgag gacgagtaca tccgctacat ggggtcgttc taccgagact aa
241 V H D W K A N H T E D E Y I R Y M G S F Y R D -
```

Abb. 113: Aminosäure- und Nukleinsäuresequenz der 7 α -HSDH aus *Collinsella aerofaciens* (DMZ Nr.:3979).

Anhang

Sequenz der 12 α -HSDH aus *Clostridium sp.* (Uniprot: U2EZF0)

```
1 atgatctttg acggaaaagt cgcaatcatt actggcgggg gcaaggccaa atcgatcggc tacggcattg ccgtggccta
1 M I F D G K V A I I T G G G K A K S I G Y G I A V A
81 tgctaaggag ggggccaacc tggtcctgac cggcagaaac gacgagaac tgctggacgc caaggaggag ctggagcgcc
27 Y A K E G A N L V L T G R N E Q K L L D A K E E L E R
161 tctacggcat caaggtgttg ccgctggcgg tggacgtcac cccagcgat gagtcggagg accgggtcaa ggaagccgtg
54 L Y G I K V L P L A V D V T P S D E S E D R V K E A V
241 cagaaggcca tcgccgaatt cggccgcata gacgtgctga tcaacaacgc ccaggcgtcg gcctcgggca tccccctgtc
81 Q K V I A E F G R I D V L I N N A Q A S A S G I P L
321 catgcagacc aaagaccact ttgacctggg catctactcc gggctctacg ccaccttcta ctacatgagg gactgctatc
107 S M Q T K D H F D L G I Y S G L Y A T F Y Y M R E C Y
401 cctacctgaa ggagaccagc ggctcgggca tcaacttcgc ctccggcgcc ggctcttcgc gcaacgtggg tcaagtctcc
134 P Y L K E T Q G S V I N F A S G A G L F G N V G Q C S
481 tacgccgccc caaagaggc catccgcggc ctctcccgcg tcggggccac cgagtggggc aaggacaaca tcaacgtcaa
161 Y A A A K E G I R G L S R V A A T E W G K D N I N V
561 cgtggtctgc cccctggcca tgaccgcca gctggagaac ttcaagctct cctaccctga ggctacgag aaaaacctca
187 N V V C P L A M T A Q L E N F K L S Y P E A Y E K N L
641 gaggggtgcc catgggcccg ttcggtgacc ccgagctgga catcgccggg gtctgctgac agctcggctc gcccgacttc
214 R G V P M G R F G D P E L D I G R V C V Q L G S P D F
721 aagtacatgt ccggcgagac cctcaccctg gaaggcggca tgggtcagcg ccctag
241 K Y M S G E T L T L E G G M G Q R P -
```

Abb. 114: Aminosäure- und Nukleinsäuresequenz der 12 α -HSDH aus *Clostridium sp.* (DMZ Nr.:4029).

Sequenz der GDH aus *Bacillus subtilis* strain 168 (Uniprot: P12310)

```
1 atgtatccgg atttaaaagg aaaagtgcgc gctattacag gagctgcttc agggctcgga aaggcgatgg ccattcgctt
1 M Y P D L K G K V V A I T G A A S G L G K A M A I R
81 cgcaaggag caggcaaaag tggttatcaa ctattatagt aataaacaag atccgaacga ggtaaaagaa gaggtcatca
27 F G K E Q A K V V I N Y Y S N K Q D P N E V K E E V I
161 agcgggggcgg tgaagctggt gtcgtccaag gagatgtcac gaaagaggaa gatgtaaaaa atatcgtgca aacggcaatt
54 K A G G E A V V V Q G D V T K E E D V K N I V Q T A I
241 aaggagtctg gcacactcga tattatgatt aataatgcgc gtcttgaaaa tcctgtgcca tctcagaaa tgccgctcaa
81 K E F G T L D I M I N N A G L E N P V P S H E M P L
321 ggattgggat aaagtcacgc gcacgaactt aacgggtgcc tttttaggaa gccgtgaagc gattaaatat ttogtagaaa
107 K D W D K V I G T N L T G A F L G S R E A I K Y F V E
401 acgatatcaa gggaaatgac attaacatgt ccagtgtgca cgaagtgatt ccttgccgct tatttgcca ctatgggca
134 N D I K G N V I N M S S V H E V I P W P L F V H Y A A
481 agtaaaaggc ggataaagct gatgacaaag acattagcgt tggaatacgc gccgaagggc attcgcgcca ataatttgg
161 S K G G I K L M T K T L A L E Y A P K G I R V N N I
561 gccaggtgcg atcaacacgc caatcaatgc tgaaaaattc gctgacccta aacagaaagc tgatgtagaa agcatgattc
187 G P G A I N T P I N A E K F A D P K Q K A D V E S M I
641 caatgggata tatcggcgaa ccggaggaga tcgcccagct agcagcctgg cttgcttoga aggaagccag ctacgtcaca
214 P M G Y I G E P E E I A A V A A W L A S K E A S Y V T
721 ggcatcacgt tattcggcga ccggcgtatg acactctatc cttcattcca ggcaggccgc ggtaa
241 G I T L F A D G G M T L Y P S F Q A G R G -
```

Abb. 115: Aminosäure- und Nukleinsäuresequenz der GDH aus *Bacillus subtilis* strain 168 (DMZ Nr.:23778).

Sequenz der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase aus *E. coli* (Uniprot: B7MBR1)

```

1 atggcggtaa cgcaaacagc ccaggcctgt gacctggtca ttttcggcgc gaaaggcgac cttgcgcgtc gtaaattgct gccttccctg tatcaactgg aaaagccgg tcagctcaac
1  M A V T Q T A Q A C D L V I F G A K G D L A R R K K L L P S L Y Q L E K A G Q L N
121 cgggacacc ggattatcgg cgtaggcgt gctgactggg ataaagcgc ttataccaaa gttgtccgcg aggcgctcga aactttcatg aaagaaacca ttgatgaag tttatgggac
41  P D T R I I G V G R A D W D K A A Y T K V V R E A L E T F M K E T I D E G L W D
241 accctgagtg cacgtctgga tttttgtaat cttgatgtca atgacactgc tgcattcagc cgtctcggcg cgatgctgga tcaaaaaat cgtatcacca ttaactact tgccatgcc
81  T L S A R L D F C N L D V N D T A A F S R L G A M L D Q K N R I T I N Y F A M P
361 cccagcactt ttggcgaat ttgcaaaagg cttggtgagg caaaactgaa tgctaaaccg gcacgcgtag tcatggagaa accgctggg acgtcgttg cgacctgca ggaatcaac
121  P S T F G A I C K G L G E A K L N A K P A R V V M E K P L G T S L A T S Q E I N
481 gatcaggttg gcgaataact cgaggagtgc caggtttacc gtatcgacca ctatcttggt aaagaaacag tgctgaacct gttggcgtg cgttttgcta actctctgtt tgtgaacaac
161  D Q V G E Y F E E C Q V Y R I D H Y L G K E T V L N L L A L R F A N S L F V N N
601 tgggacaatc gcaccattga tcatgttgag attaccctgg cagaagaagt ggggatcgaa gggcgtcggg gctatttga taaagccggt cagatgcgcy acatgatcca gaaccacctg
201  W D N R T I D H V E I T V A E E V G I E G R W G Y F D K A G Q M R D M I Q N H L
721 ctgcaaatc tttgatgat tgcgatgtct ccgcctctg acctgagcgc agacagcadc cgcgatgaaa aagtgaagt actgaagtct ctgcccgcga tcgaccgctc caactgccc
241  L Q I L C M I A M S P F S D L S A D S I R D E K V K V L K S L R R I D R S N V R
841 gaaaaaactg tacgcgggca atatactgcy ggcttcgctc agggcaaaaa agtgcggcgc tatctggaag aagagggcgc gaacaagagc agcaatacag aaacctcgt ggcgatccgc
281  E K T V R G Q Y T A G F A Q G K K V P G Y L E E E G A N K S S N T E T F V A I R
961 atcgacattg ataactggcg ctgggcccgt gtgccattct acctgcgtac tggtaaacgt ctgcccacca aatgttctga agtctggtc tatttcaaaa cacctgaact gaatctgtt
321  I D I D N W R W A G V P F Y L R T G K R L P T K C S E V V V Y F K T P E L N L F
1081 aaagagtcgt ggcaggtct gccgcagaat aaactgacta tccgtctgca acctgatgaa ggcgtggata tccaggtact gaataaagt cctggccttg accacaaaca taacctgaa
361  K E S W Q D L P Q N K L T I R L Q P D E G V D I Q V L N K V P G L D H K H N L Q
1201 atcaccagc tggatctgag ctattcagaa acctttaac aaacgcctc ggcagatgcc tatgaacgtc tgcctctgga aacctcgtt ggtattcag cactgtttgt acgtcgtgat
401  I T K L D L S Y S E T F N Q T H L A D A Y E R L L L E T M R G I Q A L F V R R D
1321 gaagtggaag aagcctggaa atgggtgagc tccattactg aggcgtgggc gatggacaat gatgcgcgca aaccgtatca ggcgggaacc tggggcccgc ttgcctcgtt ggcgatgatt
441  E V E E A W K W V D S I T E A W A M D N D A P K P Y Q A G T W G P V A S V A M I
1441 acccgtgagc gtcgttcctg gaatgagttt gagtaa
481  T R D G R S W N E F E -

```

Abb. 116: Aminosäure- und Nukleinsäuresequenz der G6pDH aus *E. coli*.

Sequenz der NAD(P)H-Oxidase aus *Lactobacillus sanfranciscensis* (Uniprot: Q9F1X5)

Anhang

```
1 atgaaaagtta ttgtagtagg ttgtactcac gctggcactt ttgcagttaa gcaaacgatt gccgatcacc ccgatgcaga tgtgactgca tatgaaatga
1 M K V I V V G C T H A G T F A V K Q T I A D H P D A D V T A Y E M
101 atgataacat ttccttttta tcatgtggaa tcgcccttta cttaggtaaa gaaattaaaa acaatgatcc ccgagggctt ttctactcaa gtccagaaga
34 N D N I S F L S C G I A L Y L G K E I K N N D P R G L F Y S S P E
201 attaagcaat cttggagcta acgtccaat gcgtcatcaa gttacaaacg ttgatccaga acaaaaaaca atcaaagtta aagatttaac caccaacgaa
67 E L S N L G A N V Q M R H Q V T N V D P E T K T I K V K D L I T N E
301 gaaaaaacag aagcatatga caaattaatt atgaccactg gttctaagcc tactgttcct ccaatccctg gaatcgatag tagtcgcggt tacctttgta
101 E K T E A Y D K L I M T T G S K P T V P P I P G I D S S R V Y L C
401 aaaactataa cgatgctaaa aagttatttg aagaagctcc caaagctaaa acgattacta tcattgggtc tggttatatt ggtgccgaac tggctgaagc
134 K N Y N D A K K L F E E A P K A K T I T I I G S G Y I G A E L A E
501 ctactcaaac caaaattata acgttaattt aattgatggt catgaacgag ttctttacaa gtattttgat aaagaattta ctgatatttt agccaaagat
167 A Y S N Q N Y N V N L I D G H E R V L Y K Y F D K E F T D I L A K D
601 tatgaagctc atggtgttaa cctggttctt gttcctaaa tagctgcttt tgaagaagtc gatgatgaaa ttactactaa aacctagat ggtaagaaaa
201 Y E A H G V N L V L G S K V A A F E E V D D E I I T K T L D G K E
701 ttaaatctga tattgcaatt ctttgtatcg gtttcgccc taactctgaa ttacttaag gtaaaagttgc catgttggat aacggtgcaa tcattactga
234 I K S D I A I L C I G F R P N T E L L K G K V A M L D N G A I I T
801 tgaatacatg cattcatcaa atocgcacat ttttctgct ggtgatagtg ccgccgttca ctacaacccc actaattcta acgctacat tcctttagct
267 D E Y M H S S N R D I F A A G D S A A V H Y N P T N S N A Y I P L A
901 accaacgccc tagccaagg gagattagtt ggccctaaac tgactgaaga caaagtaaaa gacatgggaa cccaatcttc atctggtctt aaactatagc
301 T N A V R Q G R L V G L N L T E D K V K D M G T Q S S S G L K L Y
1001 gtcggactta tgtctcaact ggaatcaata cggctcttgc taaagccaat attttaaaag ttagcgaagt aatcatagct gataattatc gtccagaatt
334 G R T Y V S T G I N T A L A K A N N L K V S E V I I A D N Y R P E
1101 tatgttatca acggatgaag ttttaatgtc attagtgat gatcctaaga ctctgtgtaat tttgggaggg gcgctttcaa gtatgcacga tgtttcgcaa
367 F M L S T D E V L M S L V Y D P K T R V I L G G A L S S M H D V S Q
1201 tcagcgaacg tcttatcagt atgtattcaa aataaaaaa cgattgacga tttagcaatg gtggatagtg tattccaacc acaatttgat cgtcctgtta
401 S A N V L S V C I Q N K N T I D D L A M V D M L F Q P Q F D R P F
1301 actacttaaa cattctagtc caagctgctc aagcacaagc tgacaaagca cataaataa
434 N Y L N I L G Q A A Q A Q A D K A H K -
```

Abb. 117: Aminosäure- und Nukleinsäuresequenz der NAD(P)H-Oxidase aus *Lactobacillus sanfranciscensis* (DSMZ-Nr.: 20451).

Sequenz der NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* (Uniprot: Q8KRG4)

Anhang

```
1 atgaaagtca cagttgttgg ttgtacacat gccggaacct ttgcgattaa acaaatcttg gccgaacacc ctgatgcoga agtgaccgtc tacgaacgta
1 M K V T V V G C T H A G T F A I K Q I L A E H P D A E V T V Y E R
101 acgatgtcat ttcatttctc tcttgtggaa tcgcccttta cctgggggga aaagtcgctg atccgcaagg cctcttttat tcaagtcctg aagaactcca
34 N D V I S F L S C G I A L Y L G G K V A D P Q G L F Y S S P E E L
201 aaaattagcg gctaagtgtcc aaatgaatca caatgtttta gcgatcgatc ctgatcaaaa gacagtgacc gttgaggact taaccagtca tgcacaaacg
67 Q K L G A N V Q M N H N V L A I D P D Q K T V T V E D L T S H A Q T
301 actgagtcac acgataaact agtcatgacg tctgtttctt ggccaattgt cccaagatt cggggcatcg atagcgcgctg cgtaagctc tgcaaaaact
101 T E S Y D K L V M T S G S W P I V P K I P G I D S D R V K L C K N
401 gggcacatgc gcaagctcta atcgaagatg ctaaggaagc caagcggatt accgttattg gtgccggcta tattgggtct gaactagcag aagcctactc
134 W A H A Q A L I E D A K E A K R I T V I G A G Y I G A E L A E A Y
501 cactactggt catgacgtaa ccttaattga tgcgatggac cgggttatgc ccaagtactt tgatgctgat tttacggatg tcattgaaca agattatcgg
167 S T T G H D V T L I D A M D R V M P K Y F D A D F T D V I E Q D Y R
601 gatcacggtg tccaacttgc cttaagttaa acggttgaaa gctttactga tagtgaact gggttgacca ttaagactga taagaacagc tatgaacgg
201 D H G V Q L A L S E T V E S F T D S A T G L T I K T D K N S Y E T
701 atctcgctat tttatgcatt ggcttttagc caaataccga cctgctgaaa ggcaaaagtcg atatggcacc aaacgggcg attattacgg atgactacat
234 D L A I L C I G F R P N T D L L K G K V D M A P N G A I I T D D Y
801 gcgttcttct aaccctgata ttttcgccgc tggtgacagt gctgctgtgc actacaaccc aaccatcag aatgcttaca ttcccttagc aactaacgg
267 M R S S N P D I F A A G D S A A V H Y N P T H Q N A Y I P L A T N A
901 gtgcgtcaag gtatcctagt cggtaaaaac ctagttaagc cgaccgtcaa gtatatggga acacaatcat cttctgtgtt ggcactctat gatcggacga
301 V R Q G I L V G K N L V K P T V K Y M G T Q S S S G L A L Y D R T
1001 tcgtctcaac tggtttaacg ctagcagctg caaacaaca aggggtgaac gctgaacaag tgattgttga agataattat cgcccagagt ttatgccgtc
334 I V S T G L T L A A A K Q Q G V N A E Q V I V E D N Y R P E F M P
1101 aactgaaccc gttttgatgt cattagtctt tgaccccgac acacaccgga tcttaggttg tgcgttaatg agtaaatcag atgtttcaca atcgcccaac
367 S T E P V L M S L V F D P D T H R I L G G A L M S K Y D V S Q S A N
1201 accctttctg tttgatccca aaacgaaaat acaattgatg acttagcgat ggttgatag ctcttcacgc ctaactttga tcgaccattc aactacctaa
401 T L S V C I Q N E N T I D D L A M V D M L F Q P N F D R P F N Y L
1301 acatcttagc gcaagctgct caggcgaag ttgcccaatc agttaacgct taa
434 N I L A Q A A Q A K V A Q S V N A -
```

Abb. 118: Aminosäure- und Nukleinsäuresequenz der NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* (DSMZ-Nr.: 20054).

Anhang

Sequenz der NADH-Oxidase aus *Lactobacillus plantarum* (Uniprot: F9UUC2)

```
1 atgaaagtta ttgtaattgg ttgtaccocat gccggcactg ctgccgttaa tcagatttta gcatcaaatc cagatactga agtgacgatt tatgaaagaa
1 M K V I V I G C T H A G T A A V N Q I L A S N P D T E V T I Y E R
101 atgacaatgt ctcgttccta tccgtgggga tcgcacttta ccttggcggc caagttgctg atcctcaagg cctattttat tccagtctcg aacagtttagc
34 N D N V S F L S C G I A L Y L G G Q V A D P Q G L F Y S S P E Q L
201 taagttaggc gcaactgttc atatgcaaca tgatgtgacg gatgtgaata ctgacaaaaca tgaattacg gttactgatt taaagactgg tgaatctaag
67 A K L G A T V H M Q H D V T D V N T D K H E I T V T D L K T G E S K
301 actgatcact atgacaagtt agttgtcact actggttcat gccctgttat tccaccaatt gacggcatcg atagtcccaa tgtctactta tgcaagaact
101 T D H Y D K L V V T T G S W P V I P P I D G I D S P N V Y L C K N
401 ggacgcacgc tcagaattta tgggaagcag ccaaaccagc taagcgggtc attgtgatcg gtggcgggta tatcggctact gaattagttg aagcttacca
134 W T H A Q N L W E A A K P A K R V I V I G G G Y I G T E L V E A Y
501 gaagcaaggt aaggaagtca cactaatgta tggtttacca cggattttaa ataaatactt agacaaaagaa ttcactgacc ggggttgaaca agactttggtt
167 Q K Q G K E V T L I D G L P R I L N K Y L D K E F T D R V E Q D F V
601 gatcacggta tcaagatggc tttgaatcaa atgggtcaag gcttcagtga tgatggtaaa gaagttacgg tcaagactga caagggcagc tacacagccg
201 D H G I K M A L N Q M V Q G F S D D G K E V T V K T D K G S Y T A
701 acatggcgat tctttgtggt ggcttccggc caaataccgg cttactcaag ggcaaggtcg atatgaacgc taatggctcg atcaagacca atgactacat
234 D M A I L C V G F R P N T G L L K G K V D M N A N G S I K T N D Y
801 gcaacttct gatccagaca tttacggggc tgggtgactcg gttgctgttc actataacc aactaagaaa gatgcttata tcccattagc aacgaatgcg
267 M Q T S D P D I Y G A G D S V A V H Y N P T K K D A Y I P L A T N A
901 gtccgccaag gaaccttagt tggtttgaac atcttcaagc caacgoggaa gtacatgggg acacaatcaa cttctggggtt aatgttggtc ggccaaacca
301 V R Q G T L V G L N I F K P T R K Y M G T Q S T S G L M L F G Q T
1001 tcgtttcatc tgggatgacc ctgaacatg cacaggccga aatgttccg gcagccgctg tcacttttga agacaactac cggccagaat ttatgccaac
334 I V S S G M T L E H A Q A E N V P A A A V T F E D N Y R P E F M P
1101 cactaagcct gttttaatgc aattggttta caatcctgaa actcgcgaaa tcctaggtgc acaattcatg agtgaacatg atgtttcgca atcagccaat
367 T T K P V L M Q L V Y N P E T R E I L G A Q F M S E H D V S Q S A N
1201 gtgatttcag tgatgattca aaatcacaat accattgacg acttagggtt cgtagatag ttcttccaac caatttacga cgggccattt aactatttga
401 V I S V M I Q N H N T I D D L G F V D M F F Q P I Y D R P F N Y L
1301 acttacttgg toaagcagcg attgccatg cggccgaagc tgtcactgaa taa
434 N L L G Q A A I A H A A E A V T E -
```

Abb. 119: Aminosäure- und Nukleinsäuresequenz der NADH-Oxidase aus *Lactobacillus plantarum* (DSMZ-Nr.:20246).

Sequenz der Alkohol Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* (Uniprot: Q6WVP7)

Anhang

```
1 atgactgatc gtttaaaagg caaagtagca attgtaactg gcggtacctt gggaattggc ttggcaatcg ctgataagtt
1 M T D R L K G K V A I V T G G T L G I G L A I A D K

81 tgttgaagaa ggcgcaaagg ttgttattac cggccgtcac gctgatgtag gtgaaaaagc tgccaaatca atcggcggca
27 F V E E G A K V V I T G R H A D V G E K A A K S I G G

161 cagacgttat ccgttttgtc caacacgatg cttctgatga agccggctgg actaagtgtt ttgatacgac tgaagaagca
54 T D V I R F V Q H D A S D E A G W T K L F D T T E E A

241 tttggcccag ttaccacggt tgtcaacaat gccggaattg cggtcagcaa gagtggtgaa gataccacaa ctgaagaatg
81 F G P V T T V V N N A G I A V S K S V E D T T T E E

321 gcgcaagctg ctctcagtta acttggatgg tgtcttcttc ggtaccgctc ttggaatcca acgatatgaag aataaaggac
107 W R K L L S V N L D G V F F G T R L G I Q R M K N K G

401 tcggagcatc aatcatcaat atgtcatcta tcgaaggttt tgttggatgat ccaactctgg gtgcatacaa cgcttcaaaa
134 L G A S I I N M S S I E G F V G D P T L G A Y N A S K

481 ggtgctgtca gaattatgtc taaatcagct gccttggatt gcgctttgaa ggactacgat gttcgggtta acactgttca
161 G A V R I M S K S A A L D C A L K D Y D V R V N T V

561 tccaggttat atcaagacac cattggttga cgatcttgaa ggggcagaag aaatgatgtc acagcggacc aagacaccaa
187 H P G Y I K T P L V D D L E G A E E M M S Q R T K T P

641 tgggtcatat cgggtgaacct aacgatatcg cttggatctg tgtttacctg gcactctgacg aatctaaatt tgccactggt
214 M G H I G E P N D I A W I C V Y L A S D E S K F A T G

721 gcagaattcg ttgtcgatgg tggatacact gctcaataa
241 A E F V V D G G Y T A Q -
```

Abb. 120: Aminosäure- und Nukleinsäuresequenz der Alkohol Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir*.

19. Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen, Darstellungen und Hilfsmittel benutzt wurden. Alle Textstellen, die sinngemäß anderen Werken oder sonstigen Quellen entnommen worden sind, sind jeweils unter genauer Angabe der Quelle als Entlehnung gekennzeichnet. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Karl Daniel Bakonyi