

„Weiße Biotechnologie: Designer Drogen aus Bakterien - Biokatalytische Herstellung von Corticosteroiden“

Madline Götz, Michelle Richter und Henner Zirpel

Bei den Olympischen Spielen 1988 in Seoul sorgte der Leichtathlet Ben Johnson für einen der größten Dopingkandale in der Olympia-Geschichte. Durch die Einnahme von muskelbildenden Steroiden gelang es ihm, eine neue Weltrekordzeit im 100-Meter Lauf aufzustellen. Um ihre Leistungen zu steigern, werden Sportler immer häufiger zu der verbotenen Einnahme von Dopingmitteln verführt, und Steroide, wie Stanazolol und Testosteron, kommen häufig zum Einsatz. Steroide sind jedoch durch ihre vielfältigen Wirkungen auf den Menschen nicht nur von Interesse der Sport-Industrie, sondern bieten unermesslich viele Möglichkeiten. Als hochkomplizierte Medikamente sind Steroide aus der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken. Ihre unterschiedliche Wirkung beruht häufig auf kleinen Veränderungen ihres Grundgerüsts. Dieses besteht aus einem Ringsystem, dem sogenannten Steran, welches in Abbildung 1 A dargestellt ist. Die Funktion der Steroide wird durch die Art, die Anzahl und die Position funktioneller Gruppen sowie die Konfiguration, also die Anordnung dieser Gruppen, am Steran-Gerüst bestimmt (Abb.1 B/C).

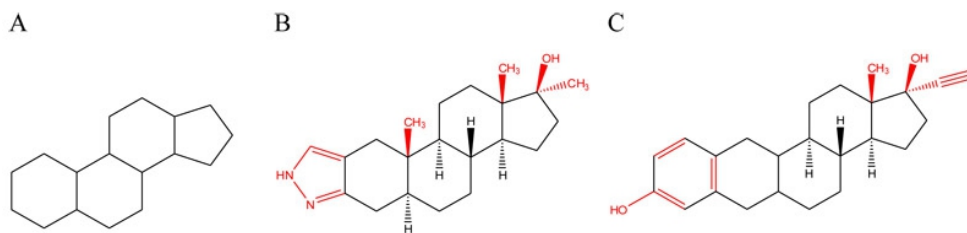


Abbildung 1: Darstellung des Steroidgrundgerüsts - Steran (A) und Beispiele von funktionellen Steroidderivaten: Stanazolol (B) und [Ethinylestradiol](#) (C).

Steroide kommen in Menschen, Tieren, Pflanzen und Pilzen vor. Im Menschen werden Sexualhormone in den Keimdrüsen gebildet und Steroide mit Hormonfunktion, sogenannte Corticosteroide, in der Nebennierenrinde. Naturidentische, aber auch maßgeschneiderte Steroidhormone kommen aufgrund ihrer vielfältigen Wirkungen und Verwendungsmöglichkeiten häufig als Pharmazeutika zum Einsatz. Die Schwierigkeit ihrer chemischen Synthese liegt darin, dass das Grundgerüst je nach Steroid an bestimmten Positionen modifiziert ist, wie u.a. beim Ethinylöstradiol durch Einführung von OH-Gruppen an den Positionen C₃ und C₁₇ (Abb. 1C). Die regioselektive Einführung solcher Gruppen am Steroidgerüst an einer ausgewählten Position ist mit klassischen Methoden der Organischen Chemie ausgesprochen schwierig zu bewerkstelligen. Ein weiteres Problem ist die Stereoselektivität. Bei einer Reaktion wie z.B. der Hydroxylierung können zwei Moleküle entstehen, welche die gleichen funktionellen Gruppen an jeweils der gleichen Position besitzen, jedoch in unterschiedlicher räumlicher Orientierung. Dies wirkt sich auch auf ihre biologische Aktivität aus. Diese Problematik der Organischen Chemie könnte durch die Verwendung von Biokatalysatoren (Enzymen) gelöst werden. Natürliche Enzyme sind häufig regio- und stereoselektiv und führen bei ihrem Einsatz als

Reaktionsbeschleuniger häufig zu einheitlichen Reaktionsprodukten. Solche natürliche Biokatalysatoren zu identifizieren, oder durch Modifizierung bekannter Biokatalysatoren maßgeschneiderte Varianten zu entwickeln, die für solche anspruchsvollen Transformationen eingesetzt werden können, ist eine besondere Herausforderung für die Weiße Biotechnologie (Urlacher *et al.* 2006).

Die Arbeitsgruppe um Manfred Reetz, MPI für Kohlenforschung Mülheim, hat kürzlich in einem eleganten Ansatz gezeigt, wie dieses Problem experimentell angegangen und gelöst werden kann (Reetz *et al.* 2007). Ausgangspunkt war ein Enzym, welches in der Lage ist, Hydroxylgruppen in verschiedene Grundgerüste einzuführen, die Cytochrom P450 Monooxygenase. Dieses Enzym katalysiert in verschiedenen Organismen eine Hydroxylierung von komplexen Komponenten wie Terpenen und Alkoholen, als auch von Steroiden mit hoher Selektivität. Häufig kommt für Biotransformationen eine bakterielle Monooxygenase zum Einsatz, das Enzym P450 BM3 aus dem Bakterium *Bacillus megaterium* (Abb. 2). Dieses Enzym besteht aus 416 Aminosäurebausteinen und trägt drei unterschiedliche Funktionalitäten in seiner Peptidkette (Urlacher *et al.* 2012). Bei der Bindung eines Substrats an das aktive Zentrum des Enzyms wird zunächst Wasser als sechster Ligand des Häm b-Eisens verdrängt, wodurch das aktive Zentrum reduziert wird. Durch die Übertragung eines Reduktionsäquivalentes von NADPH über die Flavoproteine FAD und FMN der Reduktase bildet sich ein Eisen(II)-Komplex, an welchen molekularer Sauerstoff angelagert werden kann. Es folgt eine weitere Übertragung eines Reduktionsäquivalentes von NADPH, wodurch mit Hilfe zweier Protonen die Disproportionierung des Sauerstoffs ausgelöst wird. Eines der Sauerstoffatome wird auf das Substrat übertragen, während das andere als Wassermolekül abgegeben wird. Bei der Übertragung der Reduktionsäquivalente nimmt ebenfalls ein Eisen-Schwefel-Protein teil.

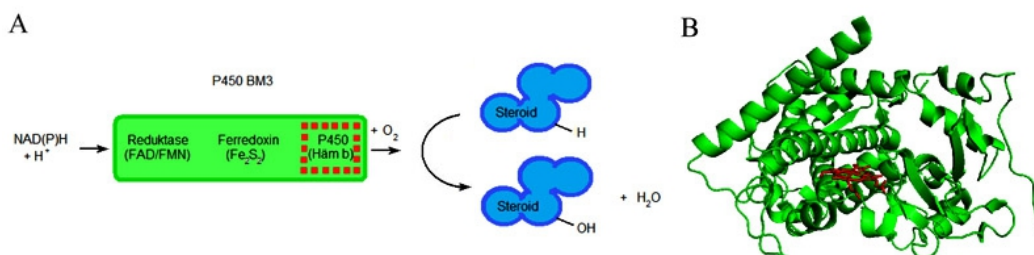


Abbildung 2: Funktionelle Untereinheiten und Reaktionsablauf der bakteriellen P450 BM3 Cytochrom P450 Monooxygenase (A) und deren Struktur (B). Die rot gefärbte Struktur entspricht Häm b.

Das natürliche Enzym weist keine hohe Regio- und Stereoselektivität auf und akzeptiert viele Steroide wie zum Beispiel das Sexualhormon Testosteron nicht als Substrat. Von großem Nutzen wären allerdings gerade solche Enzyme, die die Einführung einer OH-Gruppe an genau vorgegebener Stelle ermöglichen und wo nur eines der beiden möglichen Stereoisomere entsteht. Damit eine Oxidation mit hoher Regio- und Stereoselektivität an nicht-aktivierten Kohlenstoff-Wasserstoffbindungen möglich wird, muss das aktive Zentrum des Proteins modifiziert werden. Hierfür kann nach verschiedenen Methoden vorgegangen werden. Eine Möglichkeit nennt sich Rationales Design, wobei computergestützte Verfahren verwendet werden. Das Ziel ist es, Enzymvarianten so entwerfen, die einen oder mehrere Austausch ihrer Abfolge der Aminosäuren aufweisen, die eine Änderung der enzymatischen Eigenschaften bewirken. Eine schnellere und einfachere, allerdings auch unpräzisere Möglichkeit ist die gerichtete Evolution. Bei der gerichteten Evolution werden Bakterien verwendet, die das gewünschte Enzym herstellen und somit die kodierende Information für das Enzym in Form eines Gens

besitzen. Nach Isolation des Gens wird zufallsgemäß die Basenabfolge verändert, wodurch verschiedene Enzymvarianten entstehen, die sich von dem Ausgangsprotein in einer oder mehreren Aminosäurepositionen unterscheiden. Diese verschiedenen Varianten können wiederum in Bakterien produziert werden, sodass im Idealfall jedes Bakterium einer Zellpopulation ein etwas anderes Enzym herstellt. Nach der Vereinzelung der Bakterienklone wird die Aktivität des gewünschten Enzyms untersucht. Wenn ein Klon identifiziert ist, der die gewünschte verbesserte Enzymeigenschaft besitzt, wird dessen Gen isoliert und die Abfolge der Nukleinsäurebausteine bestimmt. Damit ist auch bekannt, welche Aminosäureaustausche auf Proteinebene zu der gewünschten Eigenschaft geführt haben. Dieses Verfahren wurde bei P450 BM3 erfolgreich eingesetzt, und es wurde eine Variante erhalten, die Testosteron als Substrat akzeptiert und bei der an Position 87 ein Phenylalaninrest gegen ein Alanin (F87A) ausgetauscht war (Kille *et al.* 2011). Das Problem dabei war jedoch, dass diese Reaktion nicht selektiv war und zu einem Gemisch von 51:46 an 2 β - und 15 β -Hydroxytestosteron führte. Ein weiteres Etappenziel war nun, Mutanten mit einer Regioselektivität von <95 % herzustellen, zum einen für das 2 β -Hydroxytestosteron und eine zweite Mutante für das 15 β -Hydroxytestosteron.

Um die gewünschten Mutanten herzustellen, bediente man sich einer Kombination von rationalem Design und gerichteter Evolution (CASTing). CAST ist die Kurzform für *Combinatorial Active-Site-Saturation-Test* und ermöglicht, Proteine mit gewünschten Eigenschaften herzustellen. Bei dieser Methode werden eine oder mehrere Aminosäuren im Bereich des aktiven Zentrums des Enzyms ausgewählt, die in unmittelbarer Nähe zum Substrat positioniert sind. Es ist plausibel anzunehmen, dass ein Austausch dieser Reste besonders große Auswirkungen auf die Selektivität und Aktivität des Enzyms hat. Auf DNA Ebene wird dann durch Anwendung spezieller molekularbiologischer Methoden ein Satz von Genen erzeugt, die sich voneinander in der Kodierung für Substrat-nah angeordnete Aminosäuren unterscheiden. Diese Genvarianten werden dann jede für sich in *E. coli* Bakterien eingebracht, so dass jede Zelle, die ein variantes Gen aufgenommen hat, eine andere Enzymvariante herstellt. Die Bakterienklone werden einzeln vermehrt und dann auf Selektivität und Aktivität getestet. Im Falle von P450 BM3 (F87A) wurden 20 Aminosäurepositionen im Bereich der Bindungstasche für die Mutagenese identifiziert (Abb. 3). Durch die Gruppierung der Aminosäure-Reste - in der Regel liegen diese in der Struktur unmittelbar benachbart und kontaktieren einander - wurden die 20 Reste in neun Untergruppen zusammengefasst: A (Arg47, Thr49, Tyr51), B (Val78, Ala82), C (Met185, Leu188), D (Ser72, Ala74, Leu75), E (Leu181Ala184), F (Thr260, Ile263), G (Ala328, Ala330), H (Leu437, Thr438) und I (Val26, Leu29).

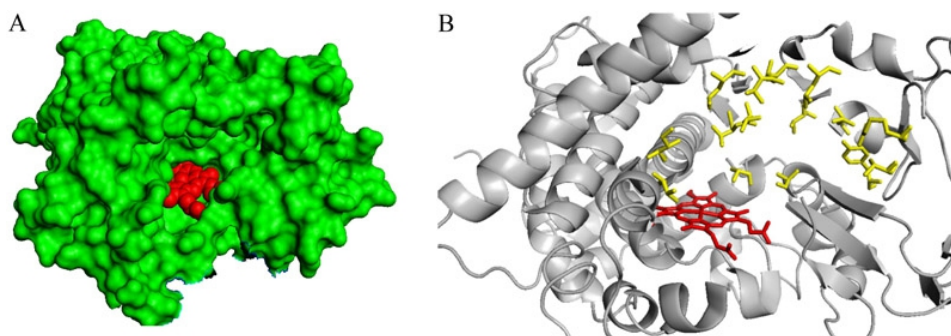


Abbildung 3: 3D-Struktur der bakteriellen P450 BM3 Cytochrom P450 Monooxygenase (A) Sekundärstruktur von P450 BM3, in gelb sind Aminosäuren angefarbt, welche durch Mutationen zu einer 2 β -Hydroxytestosteron selektiven Mutante geführt haben (B).

Zunächst wurden nur die Reste der Untergruppen A, B und C sowie die Aminosäuren Ser72, Ala328, Ala330 zufallsmäßig ausgetauscht. Dabei wurde bei A und C ein reduzierter genetischer Code eingesetzt, der nur für 12 der 20 natürlichen Aminosäuren kodiert. Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Ser, Cys, Tyr, His, Asp, Asn und Arg sind ein ausbalancierter Mix von polaren und unpolaren, geladenen und ungeladenen, aromatischen und nicht aromatischen Resten. Durch Verwendung des reduzierten Aminosäure-Alphabets erniedrigt sich die Anzahl theoretischer Aminosäurekombinationen erheblich. Damit wird die Anzahl der Kandidaten, die auf der Suche nach Varianten mit den gewünschten Eigenschaften durchmustert werden müssen, erheblich reduziert. Die Bakterienklone, die ein Enzym herstellen, welches andere Aminosäuren als das Ausgangsenzym an diesen Stellen trägt, wurden einzeln vermehrt. Nach der Isolation des Enzyms wurde es auf seine Fähigkeit zur Selektivhydroxylierung von Testosteron in einem automatisierten Testverfahren durch HPLC (High Performance Liquid Chromatography) untersucht. Insgesamt haben 8700 Mutanten das Testverfahren durchlaufen. Es wurden verschiedene Mutanten erhalten, welche eine Regioselektivität bei der Hydroxylierung von über 90 % für jeweils eines der beiden Isomere (2 β - oder 15 β -Hydroxytestosteron, Abb. 4) lieferten.

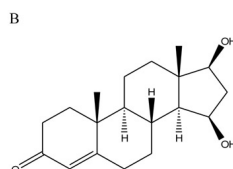
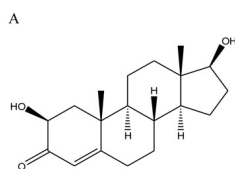


Abbildung 4: Strukturen von 2 β -Hydroxytestosteron (A) und 15 β -Hydroxytestosteron (B).




Der generelle Trend dabei war, dass 2 β -Hydroxytestosteron selektive Mutanten aus der A Bibliothek stammten und Mutanten, die 15 β -Hydroxytestosteron selektiv waren, hauptsächlich aus der B Bibliothek. Die meisten Mutanten der C Bibliothek waren selektiv für das 15 β -Isomer, aber nur mit moderater Regioselektivität. Generell waren die Mutanten mit der höchsten Regioselektivität zugleich auch die aktivsten Mutanten. Es fiel ebenfalls auf, dass die höchste

Regioselektivität für das 2 β -Isomer aus Bibliothek A bei 94 % lag, die des 15 β -Isomers aus Bibliothek B jedoch nur bei 91 %. Aus diesem Grund wurde versucht, die Selektivität für das 15 β -Isomer weiter zu optimieren. Dazu wurde eine Mutante der A Bibliothek, welche die höchste 15 β -Isomer Selektivität aufwies, als Vorlage für die Randomisierung in der B Seite verwendet. Die anschließende Durchmusterung zeigte, dass die Optimierung erfolgreich war und es nun einige Mutanten gab, welche eine Regioselektivität für das 15 β -Hydroxytestosteron von 96 % aufwiesen. Kernresonanzspektroskopische Analysen brachten eine plausible Erklärung für diesen Befund: Wahrscheinlich passt das Substrat bei den regioselektiven Varianten nur in einer ganz bestimmten Positionierung in die Bindungstasche des Enzyms, so dass die Hydroxylgruppe bevorzugt an einer bestimmten Stelle eingeführt wird.

Zusammenfassung und Ausblick:

Mit Hilfe von speziellen Mutantenbibliotheken, die durch Randomisierung von ausgewählten Aminosäure-Paaren um die Bindungstasche des Enzyms hergestellt werden, können hoch-aktive Mutanten für die katalytische und regioselektive Umsetzung bzw. Hydroxylierung von komplexen Verbindungen gewonnen werden. Durch die Verwendung der CASTing-Methode kommen deutlich kleinere Mutantenbibliotheken zum Einsatz, wodurch sich der Aufwand drastisch minimiert. So kann durch einen verhältnismäßig relativ geringen Aufwand ein bis heute nur unbefriedigend gelöstes Problem der Organischen Chemie gelöst werden. Durch geringfügige Veränderungen des Enzyms P450 BM3 ist es nun möglich, komplexe Verbindungen wie Testosteron regioselektiv zu hydroxylieren. Analog kann nun auch für andere dem Testosteron ähnliche Verbindungen vorgegangen werden, um ebenfalls die Regioselektivität der Hydroxylierung

zu kontrollieren. Dies wird künftig wahrscheinlich für eine Vielzahl von Anwendung nützlich sein, wie zum Beispiel für die Produktion von Feinchemikalien oder pharmazeutischen Grundstoffen. Dieses Beispiel zeigt einmal mehr eindrucksvoll, dass Enzyme ideale Katalysatoren für maßgeschneiderte Transformationen sein können und sich durch ihren Einsatz neue Wege für die chemische Synthese komplexer Verbindungen eröffnen.

Kontakt:	Schlauer Fuchs
 <p>Der Artikel wurde im Rahmen des Studienprojektes HighChem des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt verfasst (s. Woche 2). Die Autoren, Madline Götz, Michelle Richter und Henner Zirpel, sind Studierende des Fachs Biomolecular Engineering bzw. Chemie an der TU Darmstadt</p> <p>(E-Mails: lini22000@yahoo.de, richter.michelle68@googlemail.com, henner-444@gmx.net).</p> <p>Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Harald Kolmar (E-Mail: kolmar@biochemie.tu-darmstadt.de).</p>  	<p>Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:</p> <p>Was bedeutet in diesem Beitrag CASTing?</p>

Literatur:

- [1] Kille, S., F. E. Zilly, *et al.* (2011). "Regio- and stereoselectivity of P450-catalysed hydroxylation of steroids controlled by laboratory evolution." *Nat Chem* 3(9): 738-743.
- [2] Reetz, M. T. and J. D. Carballeira (2007). "Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes." *Nat Protoc* 2(4): 891-903.
- [3] Urlacher, V. B. and S. Eiben (2006). "Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application." *Trends Biotechnol* 24(7): 324-330.
- [4] Urlacher, V. B. and M. Girhard (2012). "Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application." *Trends Biotechnol* 30(1): 26-36.