

Abschlussbericht

Antragstitel	Effiziente Produktion von Cortisol sowie von Isotopenmarkierten P450-Metaboliten
Aktenzeichen	AZ 13220
Laufzeit	36 Monate
Projektbeginn	1. Juli 2008
Zwischenbericht	13. September 2009
Abschlussbericht:	September 2011
Projektende	30.06.2011

Kooperationspartner

Prof. Dr. Rita Bernhardt (UdS), Lehrstuhl für Biochemie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken. Langjährige (seit 1977) und international anerkannte Forschungstätigkeit auf dem Gebiet der Cytochrome P450-Enzyme.

PD Dr. Matthias Bureik (PBT), PomBioTech GmbH, Saarbrücken. Mehr als fünfzehnjährige Tätigkeit auf dem Gebiet der Molekularbiologie der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* sowie mehr als zehnjährige Tätigkeit auf dem Gebiet der Cytochrom P450-Enzyme. Die PomBioTech GmbH wurde im April 2006 von dem Biochemiker Dr. Matthias Bureik und dem Unternehmensberater Dr. Armin Laux als *spin-off* des Lehrstuhls für Biochemie der Universität des Saarlandes gegründet. Das Geschäftsfeld der PomBioTech GmbH ist die Entwicklung und Anwendung von Verfahren zur Biotransformation auf Basis von rekombinanten Spaltheffen.

Dr. Stephan Lütz (IBT2), Forschungszentrum Jülich GmbH. Bis 2008 Abteilungsleiter der Gruppe „Technische Biokatalyse“ am Institut für Biotechnologie 2 (IBT2, Prof. Dr. C. Wandrey), seit 2009 Head of Bioreactions, Novartis Pharma AG. Forschungsgebiete sind die Reaktionstechnik und Prozessentwicklung biokatalytischer Reaktionen.

Prof. Dr. Christine Lang (OB), ORGANOBALANCE GmbH, Berlin. Langjährige Erfahrung mit dem Organismus Hefe in dem Bereich des „Metabolic Engineerings“. Aus der Situation der Leitung von Forschungsprojekten und der Lehrtätigkeit an der Technischen Universität gründete Prof. Dr. Christine Lang im Jahr 2001 die Firma ORGANOBALANCE GmbH.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	3
2. Anlass und Zielsetzung	4
3. Ergebnisse	7
3.1 Molekularbiologische CYP-Optimierung und Etablierung eines Roboter- gesteuerten Screenings	7
3.2 Produktion nicht-markierter Metabolite und Erweiterung des CYP-Spektrums.....	21
3.3 Produktion eines CYP-Metaboliten im 5 g-Massstab	23
3.4 Produktion eines CYP-Metaboliten mit stabiler Isotopenmarkierung	25
3.5 Design of Experiment (DoE) für Ganzzell-Biotransformation mit dem Stamm <i>CAD67</i>	26
3.6 Produktion von Sorafenib N-Oxid.....	31
3.7 Aktivitätssteigerung von humanen CYP3A-Enzymen durch die Kombination aktivierter polymorpher Varianten.....	32
3.8 Produktion von 3-Hydroxyibuprofen	35
3.9 Prozessoptimierung der Kultivierung des Stammes <i>Schizosaccharomycespombe</i>	39
3.9.1 Untersuchung der Homogenität des SZ1 Stammes	39
3.9.2 Optimierung der Nährstoffversorgung.....	41
3.9.3 Einfluss von Ethanol auf das Wachstum.....	42
3.10 Etablierung und Optimierung der Metabolitanalytik.....	43
3.11 Prozessoptimierung der Biotransformation von 11-Deoxycortisol mit <i>S. pombe</i>	44
3.11.1 Substratmenge und Biomasse im Assay	44
3.11.2 Extraktions-pH-Wert.....	46
3.11.3 Glucosekonzentration im Assay.....	47
3.11.4 Variation der C-Quelle im Assay	48
3.11.5 Detergenzien im Assay	49
3.11.6 Zellzustand für die Biotransformation	51
3.11.7 Exkretion und Verteilung des Cortisols	52
3.11.8 Betrachtung der spezifischen Bildungsrate.....	53
4. Ökoeffizienzanalyse	54
4.1. Ökologische Bewertung – Herstellung von 6 β -Hydroxytestosteron	54
4.2. Ökologische Bewertung – Herstellung von Cortisol aus 11-Deoxycortisol	56
4.3. Ökologische Bewertung – Methode.....	60
4.4. Fazit aus der ökologischen Bewertung	61
5. Patente	65
6. Veröffentlichungen	65
7. Präsentationen	66
8. Literaturverzeichnis	67

1. Zusammenfassung

Es sollte ein innovatives biotechnologisches Verfahren etabliert werden, das für die Produktion von Isotopen-markierten Metaboliten-Referenzstandards geeignet ist, welches auf einer Cytochrom P450-abhängigen Biotransformation beruht. Als Mikroorganismus für diese Biotransformation wurden rekombinante Spalthefern (*Schizosaccharomyces pombe*) eingesetzt, welche die relevanten humanen Cytochrom P450-Enzyme (und ihre Hilfsproteine) exprimieren. Außerdem sollte die Biotransformation von 11-Desoxycortisol in diesem Wirtsorganismus optimiert werden. Eine optimierte Verfahrensführung soll im Vergleich zu den bisher eingesetzten chemischen Herstellungsverfahren umweltgerechtere, Ressourcen-schonendere und rentablere Prozesse erlauben.

Der Projektaustritt des Projektpartners IBT2 zum 14.6.2009 forderte einen neuen Projektpartner. Die ORGANOBALANCE GmbH konnte für dieses Projekt gewonnen werden, wodurch ein adäquater Ersatz für die Forschungsarbeit der Prozessoptimierung gefunden werden konnte. Daher konnte das Projekt insgesamt sehr erfolgreich bearbeitet werden und es wurde eine Reihe interessanter Ergebnisse erhalten, die auch Eingang in Publikationen, Vorträge, Dissertationen und Diplomarbeiten fanden.

Um eine effiziente und umweltgerechte Herstellung von Metaboliten zu erreichen, wurden im Rahmen des Projekts drei Cytochrom P450-Enzyme molekularbiologisch optimiert und untersucht. Dazu wurde erfolgreich ein Roboter-unterstütztes Durchmusterungsverfahren für die molekularbiologische Optimierung von Cytochrom P450 Enzymen in Hefen entwickelt und verwendet. Eine solche Durchmusterung im Ganzzell-Hefesystem ist sehr anspruchsvoll und konnte bislang international nur in wenigen Fällen demonstriert werden. Desweiteren wurde ein neues Verfahren für die Plasmidisolierung aus Spalthefern entwickelt und erfolgreich genutzt. Ca. 3000 Hefe Klone wurden mit Hilfe der HPLC analysiert. Dabei konnten zwei CYP3A7- und drei CYP11B2-Mutanten mit gesteigerten Enzymaktivitäten identifiziert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte weiterhin ein Roboter-unterstütztes Durchmusterungsverfahren für die Untersuchung der Wechselwirkung von Fremdstoffen mit dem Leber Cytochrom CYP3A4 entwickelt und erfolgreich eingesetzt werden.

Aufbauend u.a. auf diesen Ergebnissen konnte die Produktion einer ganzen Reihe von P450-Metaboliten (wie z.B. 6 β -Hydroxytestosteron, Sorafenib *N*-Oxid und 3-Hydroxyibuprofen) gezeigt werden, und zwar sowohl von unmarkierten Metaboliten als auch von solchen, die mit stabilen Isotopen markiert sind. Der Produktionsmaßstab reichte hierbei bis zur Größenordnung von 5 g, was in Anbetracht der hochpreisigen Verbindungen als durchaus nennenswert zu bezeichnen ist. Zur Optimierung der Ganzzell-Biotransformation

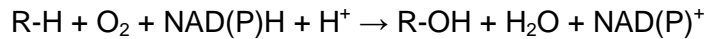
wurde unter anderem das sog. *Design of Experiment* (DoE) eingesetzt. Weiterhin erfolgte eine Erweiterung des zur Verfügung stehenden Spektrums an CYP-Enzymen; neben der Expression zusätzlicher humaner CYP-Isoenzyme konnten zudem durch die Kombination aktivierter polymorpher Varianten bei den Vertretern der CYP3A-Familie zum Teil erhebliche Umsatzsteigerungen erreicht werden. Alle diese positiven Resultate ermöglichen jetzt eine effiziente und umweltgerechte Herstellung ausgewählter Isotopen-markierten Metaboliten-Referenzstandards.

Was die Optimierung des Prozesses der Cortisolherstellung aus 11-Deoxycortisol mittels Ganzzell-Biotransformation angeht, so lässt sich festhalten, dass eine signifikante Steigerung der Cortisolbildungsrate erreicht werden konnte. Stellt man einen Vergleich zwischen den Cortisolkonzentrationen im nicht optimierten Prozess und im optimierten Prozess an, so konnte der Prozess nur mit der Optimierung der Biomasse und Substratmenge im Biotransformationsansatz um den Faktor 13 verbessert werden. Bei der Zusammenführung aller einzelnen Optimierungsergebnisse (z.B. der Einsatz von 2 % (v/v) Saccharose im Assay und 0,1 % (v/v) Tween80 vor und während der Biotransformation, die Verwendung von Zellen aus der stationären Wachstumsphase) ist zu erwarten, dass eine noch höhere Steigerung der Ausbeute zu erzielen ist. Der Prozess der Biotransformation mithilfe des *S. pombe* Stammes SZ1 von 11-Deoxycortisol zu Cortisol konnte somit stark verbessert werden, wodurch die Wirtschaftlichkeit und Ökoeffizienz des gesamten Prozesses gesteigert wird. Wie die durchgeführte Ökoeffizienzanalyse ergab, konnte durch die Prozessoptimierung bei der Cortisolproduktion aus ökologischer Sicht eine klare Verbesserung um einen Faktor von ca. 40 erreicht werden. Jedoch ist beim bisher erreichten Entwicklungsstand die Produktqualität (bedingt durch den geringen Umsatz und die schwierige Abtrennung des chemisch ähnlichen Edukts) noch nicht ausreichend, so dass hier weitere Arbeiten erforderlich sind, um den Prozess konkurrenzfähig zu gestalten. Aus den bisherigen Arbeiten ergeben sich dafür zahlreiche Ansatzpunkte.

2. Anlass und Zielsetzung

Die Cytochrom P450-Enzyme (Bernhardt, 2005) sind eine große Gruppe von Hämoproteinen, deren Name von ihrer charakteristischen Absorption bei der Wellenlänge von 450 nm (im reduzierten Zustand und im Komplex mit Kohlenmonoxid) abgeleitet ist. Diese Enzymgruppe umfasst inzwischen mehr als 18000 bekannte, die in allen Organismengruppen vertreten sind. Die große Zahl an P450-Enzymen machte die Einführung einer systematischen Nomenklatur notwendig, die wie folgt aufgebaut ist: Die

Abkürzung CYP steht für Cytochrom P450, eine erste arabische Ziffer definiert die Genfamilie, ein darauf folgender Buchstabe die Unterfamilie und die zweite arabische Zahl das Enzym selbst (z.B. CYP3A4 oder CYP11B2). Allgemein katalysieren Cytochrome P450 Hydroxylierungsreaktionen nach folgendem Schema:



Hierbei bezeichnet R-H das organische Substrat (z.B. Steroide, Fettsäuren, Terpene, Prostaglandine, Xenobiotika) und R-OH steht für das Produkt. Der Mensch besitzt 57 verschiedene P450-Enzyme, deren Aufgaben u.a. die Steroidproduktion, die Produktion von Gallensubstanzen, Fettsäuren und Vitaminen sind. Zu den Steroidhydroxylasen des Menschen gehört das Enzym CYP11B1 (syn. P45011 β , Steroid-11 β -Hydroxylase), welches in der Nebenniere die 11 β -Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol zu Cortisol katalysiert.

Bei der technischen Synthese von **Cortisol** ist diese Umwandlung von 11-Desoxycortisol in Cortisol ein entscheidender, weil sehr aufwendiger Schritt. Bei rein chemischer Durchführung dieser Reaktion sind eine Reihe von Einzelschritten notwendig, deshalb wird großtechnisch bei der Bayer Schering AG gegenwärtig ein filamentöser Pilz für die 11 β -Hydroxylierung eingesetzt. Dieser Prozess wurde bereits 1955 eingeführt und ist in bezug auf Selektionierung geeigneter Stämme, Veränderungen der Wachstumsbedingungen und Variation der Substratderivate umfassend getestet worden. Von Optimierungsansätzen, die nicht auf gentechnischen Methoden beruhen, sind daher keine wesentlichen Verbesserungen zu erwarten. Im Rahmen eines vorangegangenen BMBF-geförderten Verbundprojektes mit den Projektpartnern Rita Bernhardt, Matthias Bureik, Rolf D. Schmid und der Schering AG (2001-2005) wurde erstmals ein Verfahren entwickelt, bei dem die genannte 11 β -Hydroxylierung von 11-Deoxycortisol durch eine Ganzzell-Biotransformation mit rekombinanten Spalthefen erfolgte (Dragan et al, 2005). Dieses Projekt ist im Labormaßstab sehr erfolgreich verlaufen, jedoch reicht die Produktivität im Fermentationsmaßstab gegenwärtig noch nicht für eine technische Anwendung. Im vorliegenden Projekt sollte daher eine weiterführende Optimierung dieses Prozesses durch prozesstechnische Methoden durchgeführt werden.

Xenobiotika sind Substanzen, die auf unterschiedlichen Wege in unseren Körper gelangen (z.B. über die Nahrung, die Haut oder die Atemwege) und mit keinem anderen Stoff unseres eigenen Stoffwechsels identisch sind. Die aus Xenobiotika durch die Aktivität von Cytochrom P450-Enzymen hervorgehenden neuen chemischen Verbindungen werden als P450-Metabolite bezeichnet. Durch die Herstellung dieser **Metabolite** fällt den P450-Enzymen die wichtige Aufgabe zu, die erste chemische Verteidigungsstufe unseres Körpers zu bilden. Entsprechend zeichnen sich viele dieser P450-Enzyme durch die Fähigkeit aus, eine

Vielzahl von Substraten umsetzen zu können. Die in der menschlichen Leber exprimierten CYPs unterscheiden sich erheblich in ihrer Substratspezifität, und dementsprechend ist der Anteil der verschiedenen CYPs am Fremdstoffmetabolismus sehr unterschiedlich. Nach dem jetzigen Stand des Wissens wird die überwältigende Mehrzahl an Fremdstoffen von einer Gruppe von fünf P450-Enzymen umgesetzt, die die Bezeichnungen CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 tragen.

Die PomBioTech GmbH hat zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hans H. Maurer (Experimentelle und Klinische Toxikologie, Uniklinikum Homburg/Saar) vor kurzem einen Satz an Spalthefestämmen entwickelt, die diese fünf Enzyme exprimieren. Die effiziente Produktion von P450-Metaboliten durch diese Stämme wurde anhand von literaturbekannten Standardsubstraten demonstriert und das Verfahren daraufhin zum Patent angemeldet. Mehrere Publikationen hierzu sind bereits veröffentlicht (Peters et al, 2007a; Peters et al, 2007b; Peters et al, 2007c).

Die forschende Pharmaindustrie muss ihre Wirkstoffkandidaten auf die Entstehung von P450-Metaboliten hin untersuchen. In dem (häufigen) Fall der Metabolisierung der neuen Substanzen durch Cytochrom P450-Enzyme wird eine ausreichende Menge an P450-Metaboliten benötigt, um die gesetzlich vorgeschriebenen Toxizitätsuntersuchungen u.ä. durchführen zu können. Aufgrund der extrem hohen Kosten der Medikamentenentwicklung ist die präklinische Forschung der Pharmaindustrie einem sehr erheblichen Zeitdruck ausgesetzt. Daher ist eine verlässliche und zeitnahe Metabolitproduktion von großem Interesse. Die PomBioTech GmbH bietet eine derartige Produktion von Metaboliten im Kundenauftrag an, wobei die entsprechenden Substrate für die Metabolitproduktion (d.h. die Wirkstoffkandidaten) jeweils vom Pharmakunden zur Verfügung gestellt werden.

Aufgrund der Fortschritte auf dem Gebiet der LC-MS Analytik, die sich mittlerweile als Standardverfahren zur Analyse von Probengemischen etabliert hat, ist die Pharmaindustrie sehr daran interessiert, nicht-radioaktiv mit stabilen Isotopen (z.B. mit ^2D , ^{13}C oder ^{15}N) markierte P450-Metabolite zu erhalten. Aufgrund der grundsätzlichen Bedeutung dieser Produkte, deren Einsatz in der gesamten Industrie notwendig und nicht auf spezielle Forschungsprojekte begrenzt ist, ist davon auszugehen, dass sowohl die Menge als auch die Anzahl der benötigten Isotopen-markierten Referenzsubstrate stetig wachsen wird. Daher sollten im vorliegenden Projekt **nicht-radioaktive Isotopen-markierte P450-Metabolite** durch rekombinante Spalthefen produziert werden.

anschließend in das *S. pombe*-Expressionsplasmid pREP kloniert, das von der PomBioTech GmbH zur Verfügung gestellt wurde. Dadurch ist es möglich, die Aktivität der Mutanten in voneinander unabhängigen auf *S. pombe* basierenden Screening-Systemen zu untersuchen. Des Weiteren können dadurch selektierte Varianten ohne weitere Zwischenschritte (z.B. Umklonierung, vorherige Sequenzierung) direkt in Form neuer *S. pombe*-Stämme an die Kooperationspartner weitergegeben werden.

Für die Untersuchung der Mutantenbanken wurden Roboter-unterstützte *S. pombe* Durchmusterungs-Verfahren entwickelt. Die Verwendung rekombinanter Hefen im Screening-Verfahren ist nicht trivial, da unter anderem niedrigere Expressionsraten und längere Reproduktionszeiten als in Bakterien beobachtet werden. Dennoch sollte durch die Verwendung von *S. pombe* nicht nur der oben genannte Vorteil der „schnellen Weitergabe“ genutzt, sondern auch das Problem der Reproduzierbarkeit gelöst werden. Dieses Problem tritt auf, wenn das Screening eines Enzyms in einem anderen Organismus (z.B. *E. coli*) erfolgt als die sich daran anschließende Anwendung des mutierten Enzyms (hier in *S. pombe*). Ausgehend von dieser Überlegung wurden zwei Screening-Methoden, die *S. pombe* nutzen, etabliert und evaluiert (Abb. 2, 3). Basierend auf Vorarbeiten der PomBioTech GmbH wurde zunächst mit Hilfe des „P450-Glo™ Assays“ der Firma Promega (Abb. 2, rechts) das erste *in vivo* Ganzzell-Hochdurchsatz-Screening-Verfahren für die Detektion einer gesteigerten P450-Aktivität in *S. pombe* entwickelt. Abbildung 2 dokumentiert die einzelnen Schritte dieser auf Lumineszenz-Messung beruhenden Methode und verdeutlicht die während des Projektverlaufs durchgeführten Optimierungsschritte gegenüber dem Ausgangsprotokoll. Durch die Optimierung ist es möglich, dass von der Inokulation der Kulturen bis zur Lumineszenzmessung der gesamte Ablauf in Mikrotiterplatten durchgeführt werden kann, wobei ein Roboter (mit Ausnahme der Substratzugabe, aufgrund des geringen Volumens) alle Pipettierschritte durchführen kann. Einzige Voraussetzung ist die Abdunklung des Roboters aufgrund der lichtempfindlichen Reagenzien. Die Optimierung des Systems führte dabei nicht nur zu einer **Steigerung der Durchmusterungseffizienz um ca. 500%** (u.a. durch Verringerung der Arbeitsschritte), sondern auch zu einer deutlichen Senkung der Kosten durch Reduzierung der benötigten Kulturvolumina (um 99% gesenkt) und des benötigten Substrats (um 40% gesenkt). Gleichzeitig konnten dadurch auch die Abfallmengen und die damit verbundenen Kosten für die Entsorgung bzw. Reinigung vermindert werden. Mit diesem System wurden ca. 1500 *S. pombe* Kolonien untersucht, wobei ein Stamm identifiziert werden konnte (D7), der gegenüber dem mit pREP-CYP3A7-T409R transformierten Stamm (INA1; PomBioTech GmbH), eine doppelt so hohe Umsatzrate des Lumineszenz-Substrats aufweist (Abb. 5). Auch beim zweiten Durchmusterungs-System handelt es sich um ein Ganzzell-Verfahren, mit dem gesteigerte Enzymaktivitäten in *S. pombe* mit Hilfe der HPLC identifiziert und analysiert werden können.

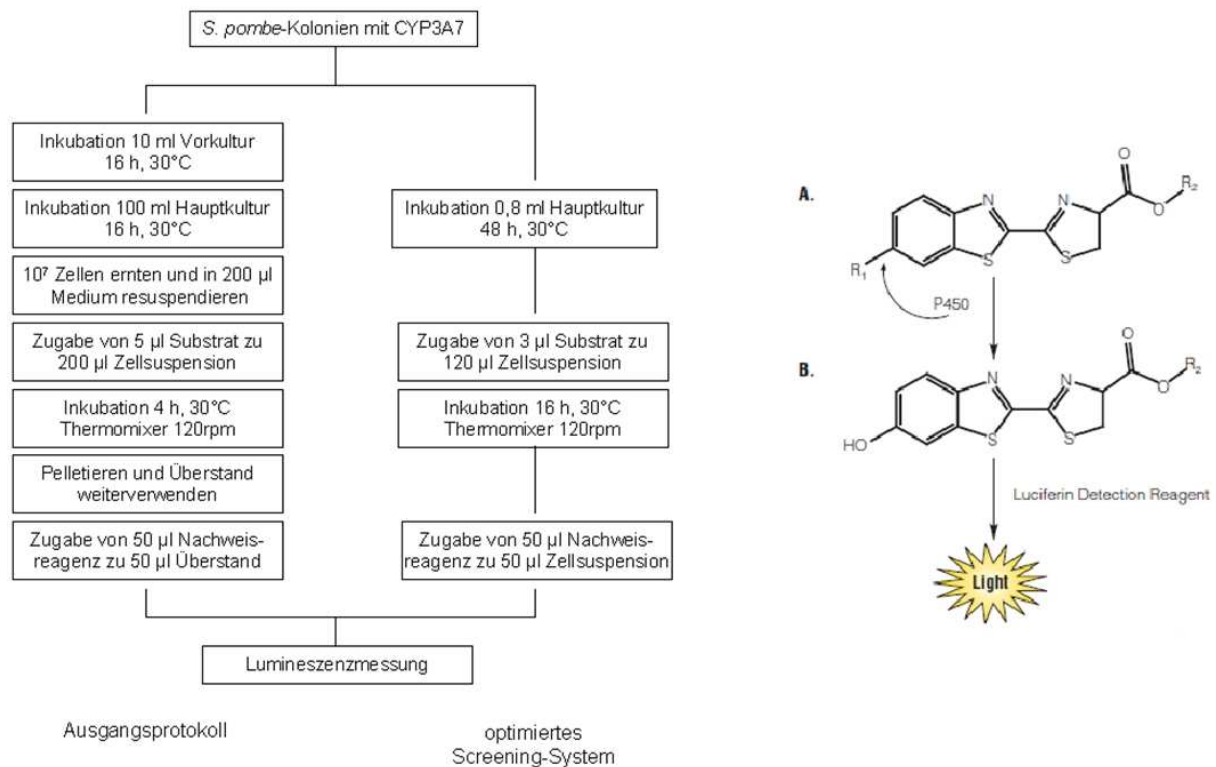


Abb. 2: Roboter-unterstütztes *in vivo*-Lumineszenz-Screening und Vergleich von Ausgangsprotokoll und optimiertem Protokoll. Der rechte Teil der Abbildung zeigt das Schema der Umsetzung.

Im Gegensatz zum Lumineszenz-Assay ist hier zwar der Durchsatz geringer, dafür besitzt dieses Verfahren zwei wesentliche Vorteile gegenüber der vorher beschriebenen Methode. Zum einen können verschiedene Substrate auf eine gesteigerte Umsatzrate hin getestet werden, was den Arbeitsaufwand reduziert, da die bestehenden CYP3A7-Mutantenbanken für das Screening der unterschiedlichen Substrate verwendet werden können. Zum anderen kann eine genaue Analyse des erhaltenen Produktspektrums durchgeführt werden. Dadurch ist es möglich, auch neue Produkte zu identifizieren, die unter Umständen einen höheren kommerziellen Wert als das ursprüngliche Produkt aufweisen können. Auch dieses in Abb. 3 dargestellte System ist Roboter-basiert und ermöglicht die Testung der Mutanten im Mikrotiterplatten-Format. Mit diesem Screening-Verfahren wurden 300 *S. pombe* Kolonien, transformiert mit den CYP3A7-Mutantenbanken, auf einen erhöhten Testosteronumsatz hin getestet. Dabei wurde ein Stamm detektiert (TH52), welcher den **Testosteronumsatz gegenüber INA1 (enthält CYP3A7-T409R) um 400% steigern** konnte (Abb. 4, 5). Diese CYP3A7-Mutante stellt die bisher aktivste beschriebene Variante dieses Cytochroms P450 dar und erfüllt damit bereits die im Projekt gestellten Anforderungen für einen Einsatz zur effizienteren Produktion von Metaboliten dieses P450.

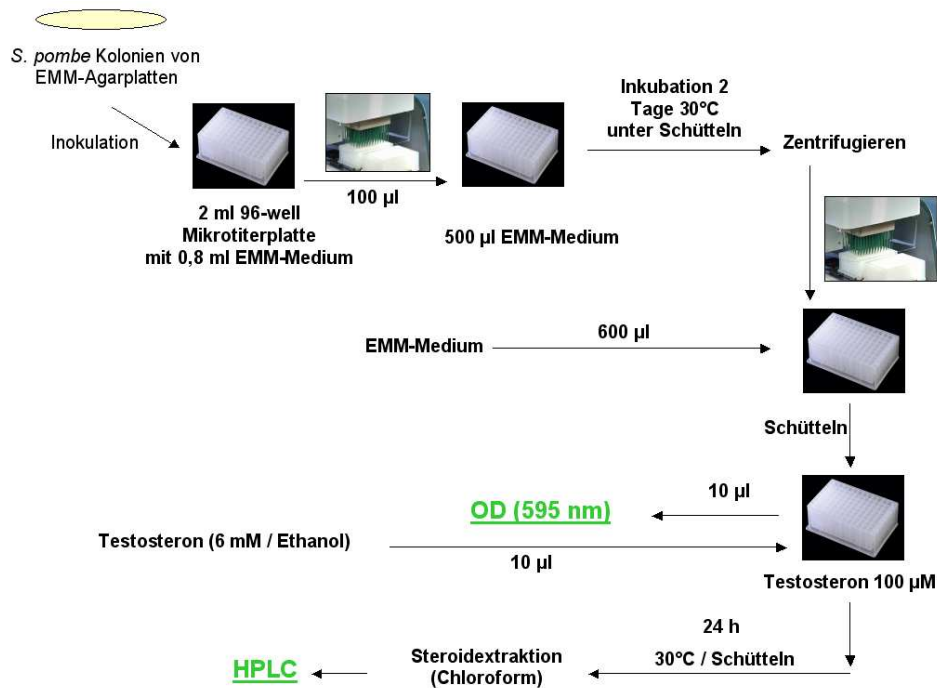


Abb. 3: Schematische Darstellung des Roboter-unterstützten *S. pombe* HPLC-Screening-Systems. Gezeigt sind die Schritte von der Zellanzucht bis zur HPLC-Analyse.

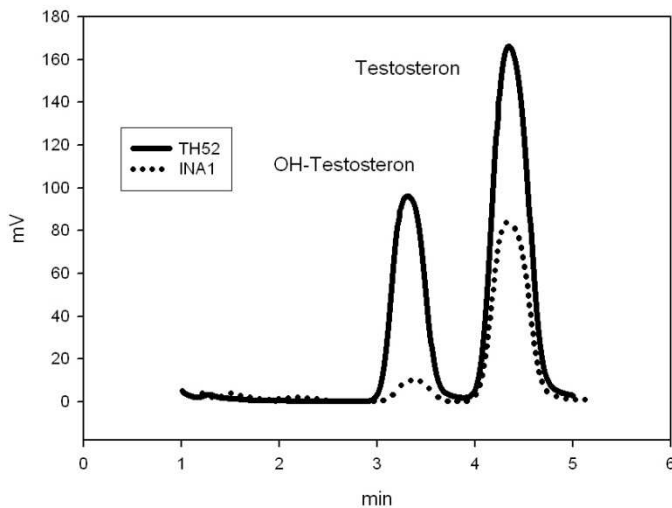


Abb. 4: HPLC-Diagramm des Testosteronumsatzes von TH52 im Vergleich zum Ausgangsstamm INA1 (enthält CYP3A7-T409R).

Interessanterweise zeigten die selektierten CYP3A7-Mutanten (Abb. 5) nur in jeweils einem der beiden Screening-Verfahren eine signifikante Steigerung der Produktionsrate. Das bedeutet, dass die Steigerung der Aktivität gegenüber einem Substrat, wie auch bereits in anderen Fällen in unserem Labor beobachtet, nicht automatisch eine Steigerung der Aktivität gegenüber einem anderen Substrat bewirkt.

Die beiden Stämme wurden dem Partner PomBioTech GmbH übergeben und stehen bei Kundennachfrage für den Einsatz zur Produktion ausgewählter Metabolite zur Verfügung.

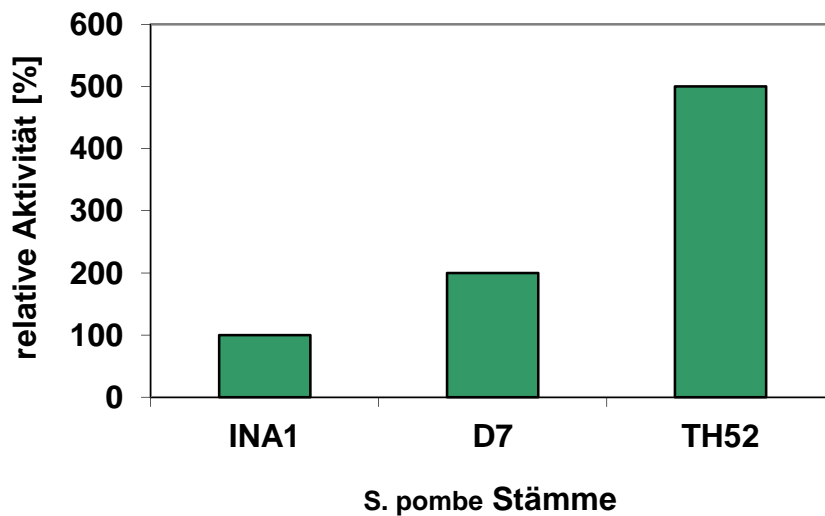


Abb. 5: Übersicht über die Aktivitätssteigerungen der CYP3A7 Stämme D7 und TH52 im Vergleich zum Ausgangsstamm INA1.

Die weitere Untersuchung des Stammes TH52 zeigte eine zeitabhängige Abnahme des Produktes des Testosteronumsatzes, welches in der HPLC eine Retentionszeit von 3 min aufwies (Abb.4). Daher wurden die HPLC-Bedingungen optimiert und eine längere Laufzeit benutzt, um den Produkt Peak (3 min) besser identifizieren zu können.

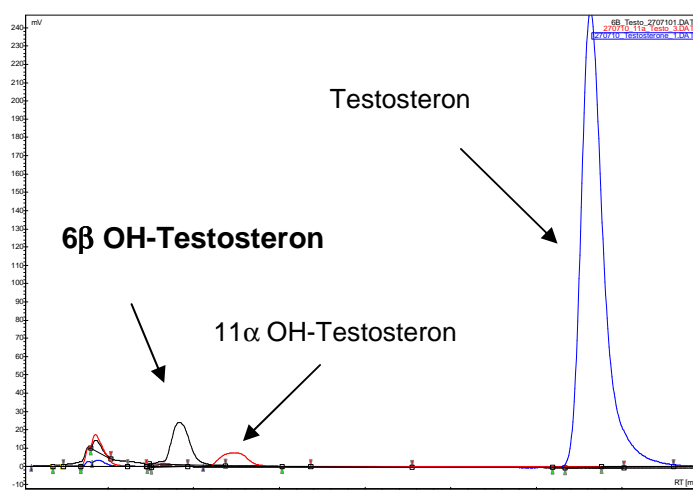


Abb. 6: HPLC Chromatogramm von 11α OH-Testosteron (rot), 6 β OH-Testosteron (schwarz) und Testosteron (blau).

Weiterhin wurden die bekannten Testosteron Produkte 6 β -OH- und 11 α -OH-Testosteron, die nach einem Umsatz mit CYP3A7 zu erwarten sind, auf der HPLC gemessen. Abb. 6 zeigt die HPLC Trennungen von 6 β -OH-Testosteron und 11 α -OH-Testosteron, wobei deutlich zu erkennen ist, dass es sich bei dem Produkt in Abb. 4 (bei 3 min) um ein anderes Testosteron Produkt als 6 β -OH-oder 11 α -OH-Testosteron handelt. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob hier ein Abbauprodukt oder ein anderer interessanter Metabolit gebildet wurde. Da das naheliegende Ziel die Herstellung von 6 β -OH-Testosteron oder 11 α -OH-Testosteron war, die beiden CYP3A7 Stämme aber keine effiziente Produktion dieser Metabolite zeigten, wurden sie nicht mehr für weitere Untersuchungen herangezogen. Gleichzeitig gelang der PomBioTech GmbH die Klonierung von CYP3A4 in das *S. pombe*-Expressionsplasmid pRE. Der *S. pombe* Stamm INA67 (enthält CYP3A4) zeigte einen besseren Testosteronumsatz im Vergleich mit den CYP3A7 Stämmen und wurde deshalb in den weiteren Untersuchungen benutzt, um CYP3A4 Mutantenbanken zur effizienten Produktion von P450-Metaboliten zu erstellen.

Für die Optimierung von CYP3A4 wurde die gerichtete Evolution durch Zufallsmutagenese angewandt. Zu diesem Zweck wurden durch error-prone PCR 3 Mutantenbanken mit geringen Mutationsraten (0-4,5 Mutanten/Kb), basierend auf dem CYP3A4-Wildtypprotein, erstellt. Die so erzeugten Mutanten wurden anschließend in das *S. pombe*-Expressionsplasmid pREP kloniert, das von der PomBioTech GmbH zur Verfügung gestellt wurde. Für die Untersuchung der CYP3A4 Mutantenbanken wurde das Roboter-unterstützte *S. pombe* HPLC-Screening-System, das zuvor in diesem Projekt entwickelt wurde, optimiert und angewendet (Abb. 3).

Gegenüber den vielen Vorteilen der Spaltheife als Expressionssystem für CYP3A4, stellt das langsamere Wachstum gegenüber Bakterien, die im allgemeinen für Screening-Verfahren verwendet werden, einen der wichtigen Nachteile dar. Um dieses Problem zu lösen, wurden die Klone nach der Transformation auf neuen Agarplatten ausplattiert und bei 30 °C 2-3 Tage lang inkubiert, so dass die Zellmasse pro Kolonie stieg, woraufhin die 96-Well-Platten mit einer höheren Zelldichte angeimpft werden konnten (Abb. 7). Diese Optimierung des Systems führte dabei zu einer deutlichen Senkung der Kosten durch Reduzierung der benötigten Inkubations- und Schüttel-Zeit (um 50% gesunken). Mit diesem System wurden ca. 600 *S. pombe* Kolonien untersucht, wobei 30 Stämme identifiziert werden konnten, die gegenüber dem mit pREP-CYP3A4 transformierten Stamm (INA67; PomBioTech GmbH), einen gesteigerten Testosteronumsatz (um 138-171%) aufweisen (Abb. 8).

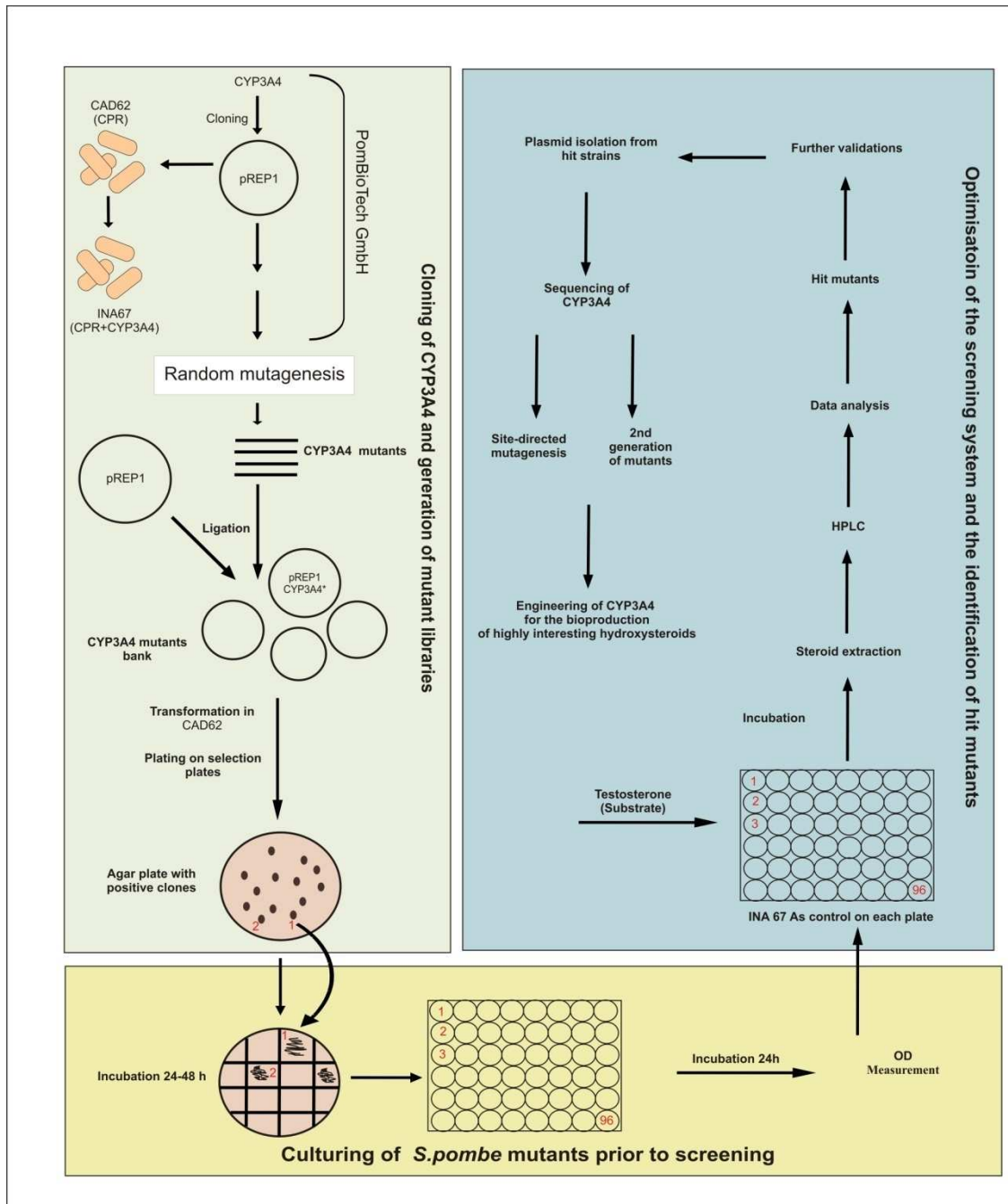


Abb.7: Schematische Darstellung des Roboter-unterstützten *S. pombe* HPLC Screening-Systems. Gezeigt sind die Schritte von der Zellanzucht bis zur HPLC-Analyse.

Die 30 Stämme wurden dann in einem zweiten Verfahren weiter getestet. Dabei wurden 5 Stämme (m18, m25, m26, m27, m29) identifiziert, die gegenüber INA67 einen um >120% gesteigerten Testosteronumsatz aufweisen (Abb. 9, 10).

	A	B	C	D	E	F
1		Area/6B_OH_Te	Area/11aI	Area/test	Ratio 6B_C	Comp/IN67
2	hakkil\2010-05\060510_3a4_mutants_Bank_230410_Mutant_290.DATA	51.6	2.8	105.4	0.32866242	1.358109175
3	hakkil\2010-05\060510_3a4_mutants_Bank_230410_Mutant_286.DATA	51.9	2.8	101.7	0.33789063	1.396242252
4	hakkil\2010-05\060510_3a4_mutants_Bank_230410_Mutant_299.DATA	53.5	2.9	100.8	0.34672715	1.432756838
5	hakkil\2010-05\060510_3a4_mutants_Bank_230410_Mutant_231.DATA	47.4	7.3	87.4	0.35163205	1.45302499
6	hakkil\2010-05\060510_3a4_mutants_Bank_230410_Mutant_265.DATA	39.9	2.2	72.1	0.35625	1.472107438
7	hakkil\2010-05\060510_3a4_mutants_Bank_230410_Mutant_295.DATA	63	3.3	112.5	0.35897436	1.48336512
8	hakkil\2010-05\060510_3a4_mutants_Bank_230410_Mutant_310.DATA	53.3	2.8	95.1	0.35916442	1.484150498
9	hakkil\2010-05\060510_3a4_mutants_Bank_230410_Mutant_240.DATA	32.6	1.6	57.8	0.36061947	1.490163095
10	hakkil\2010-05\060510_3a4_mutants_Bank_230410_Mutant_224.DATA	55.9	2.9	97.8	0.36369551	1.502874011
11	hakkil\2010-05\070510_3a4_screening_230410_363.DATA	62.4	6.3	55.4	0.52971138	1.557974633
12	hakkil\2010-05\070510_3a4_screening_230410_373.DATA	68.2	6.7	60.4	0.53032659	1.5597841
13	hakkil\2010-05\070510_3a4_screening_230410_344.DATA	68.3	6	60	0.53234606	1.565723717
14	hakkil\2010-05\070510_3a4_screening_230410_360.DATA	67	6.5	58.5	0.53386454	1.570189829
15	hakkil\2010-05\070510_3a4_screening_230410_353.DATA	67.7	6.7	58.6	0.53602534	1.576545107
16	hakkil\2010-05\100510_3a4_Mutant_431.DATA	65.5	3.3	88.3	0.42587776	1.595047803
17	hakkil\2010-05\070510_3a4_screening_230410_367.DATA	65.5	5.9	55	0.54356846	1.598730779
18	hakkil\2010-05\070510_3a4_screening_230410_343.DATA	56.5	5.6	47.3	0.54431599	1.600929389
19	hakkil\2010-05\060510_3a4_mutants_Bank_230410_Mutant_233.DATA	45.8	2.2	71.8	0.38945578	1.609321415
20	hakkil\2010-05\070510_3a4_screening_230410_374.DATA	69	6.6	57	0.54761905	1.610644258
21	hakkil\2010-05\070510_3a4_screening_230410_368.DATA	59.4	6	48.3	0.55153203	1.622153039
22	hakkil\2010-05\100510_3a4_Mutant_413.DATA	66.3	3.6	86.6	0.43361674	1.624032745
23	hakkil\2010-05\100510_3a4_Mutant_436.DATA	71.2	3.6	92.9	0.43388178	1.625025391
24	hakkil\2010-05\100510_3a4_Mutant_411.DATA	66.1	3.5	86.2	0.43401182	1.62551243
25	hakkil\2010-05\100510_3a4_Mutant_451.DATA	70.2	7.5	87.9	0.44402277	1.663006631
26	hakkil\2010-05\070510_3a4_screening_230410_333.DATA	71.4	7.2	54.8	0.56576862	1.664025357
27	hakkil\2010-05\100510_3a4_Mutant_438.DATA	67.8	3.4	84.4	0.44546649	1.668413826
28	hakkil\2010-05\100510_3a4_Mutant_465.DATA	67.5	3.5	81.8	0.45210985	1.693295303
29	hakkil\2010-05\100510_3a4_Mutant_470.DATA	69.3	3.4	83.7	0.45294118	1.696408901
30	hakkil\2010-05\100510_3a4_Mutant_441.DATA	73.2	3.8	87.6	0.45522388	1.704958354
31	hakkil\2010-05\100510_3a4_Mutant_430.DATA	71.7	7.3	84.8	0.45814696	1.715906235

Abb. 8: Die besten 30 Stämme mit (um 138-171%) gesteigertem Testosteronumsatz (Erster Screeninglauf)

	A	B	C	D	E	F	G	H
1		6B_T	11a_T	T	Ratio 6B	Ratio 11a	Comp 6B	Comp 11
3	2010-07\280710_3A4_29	43.4	4.2	42.6	0.504651	0.08974359	150.08213	186.1514
5	2010-07\280710_3A4_27	38.4	3.8	54.1	0.415135	0.0656304	123.460263	136.1344
6	2010-07\280710_3A4_26	43.9	4.3	56.1	0.439	0.07119205	130.557621	147.6707
7	2010-07\280710_3A4_25	37.4	3.8	48.8	0.433875	0.07224335	129.033371	149.8514
14	2010-07\280710_3A4_18	27.1	2.7	39.5	0.406907	0.06398104	121.013207	132.7132

Abb. 9: Die besten 5 Stämme mit (>120%) gesteigertem Testosteronumsatz (Zweiter Screeninglauf)

Um die Plasmidisolierung aus Spalthefern zu realisieren, was relativ schwierig und nicht immer erfolgreich ist, wurde eine Methode, die für *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben ist (Singh M. V. and Weil P. M., 2002), an die Spalthefer angepasst und optimiert (Abb. 11). Die Sequenzierungsergebnisse sollen dann als Grundlage für die Generierung der zweiten Generation einer CYP Mutantenbank dienen.

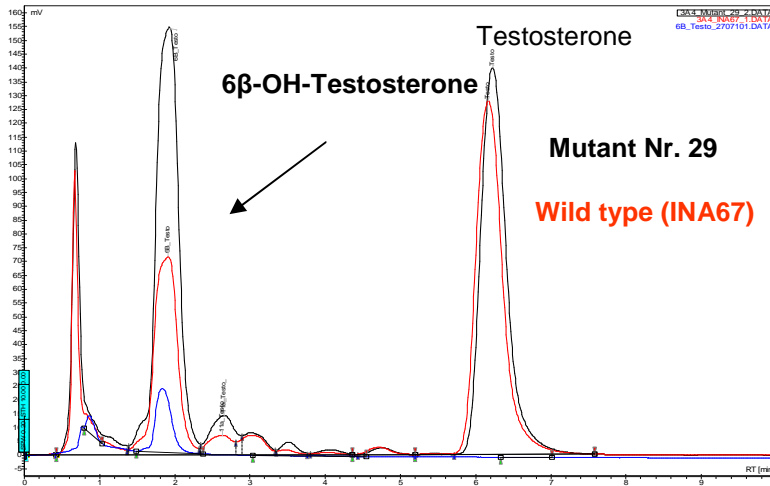


Abb. 10: HPLC Chromatogramm von dem Wildtypstamm INA67 (rot) und der neuen Mutante m29 (schwarz).

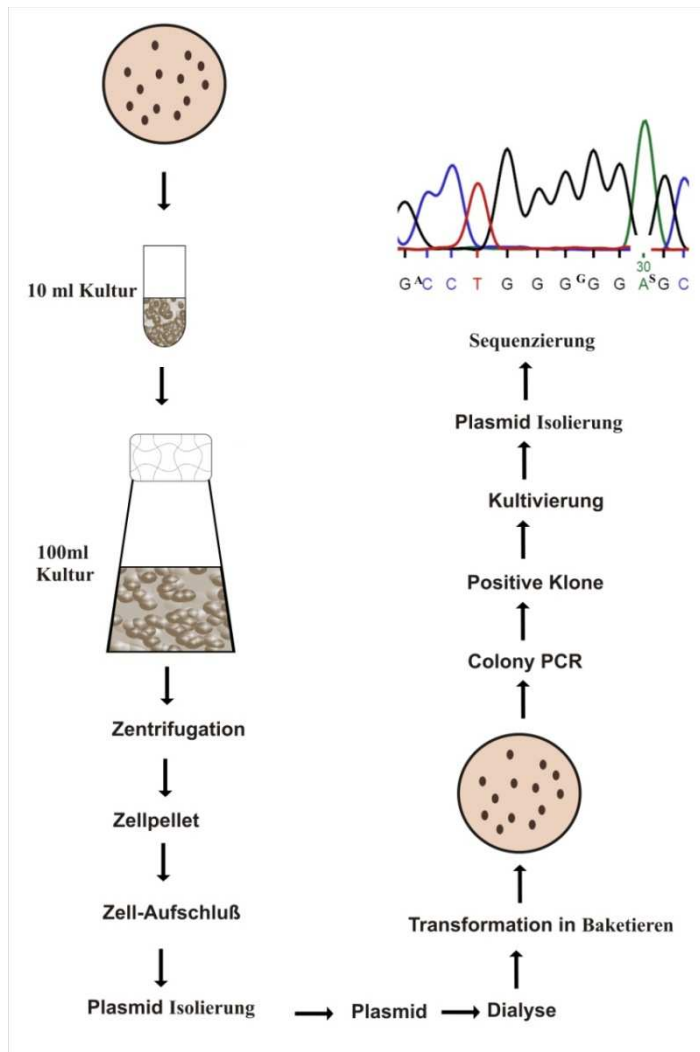


Abb. 11: Schematische Darstellung der Plasmidisolierungsmethode.

Überraschenderweise zeigte die Sequenzierung, dass alle fünf CYP3A4 Stämme keine Mutationen im Vergleich mit dem CYP3A4 Wildtyp aufweisen, sich also als falsch-positiv erwiesen. Die Ursache für die mehrfach beobachtete deutliche Steigerung der Aktivität ist momentan noch unklar. Deshalb wurde eine neue CYP3A4 Mutantenbank mit höheren Mutationsraten erzeugt und anschließend in *S. pombe* untersucht. Ca. 700 *S. pombe* Kolonien wurden danach genauer analysiert. Die Mutantenbank mit Mutationsraten von 4,5-9 Mutationen/Kb zeigten jedoch keine gesteigerten Testosteronumsätze im Vergleich mit dem CYP3A4 Wildtyp (INA67).

Da im Verlaufe der bisherigen Arbeiten noch keine Mutanten gefunden werden konnten, die eine deutliche Steigerung der Aktivität aufweisen, müssen offenbar weitere Durchmusterungen mit den CYP3A4-Mutanten erfolgen, um mit diesem Enzym erfolgreich zu sein. Dennoch kann festgestellt werden, dass es gelungen ist, das erste Roboterunterstützte Durchmusterungsverfahren für die gerichtete Evolution in *S. pombe* zu etablieren. Es wurde weiterhin in diesem Projekt eindeutig gezeigt, dass es mit Hilfe der hierbei etablierten Verfahren möglich ist, Mutanten von membranständigen Cytochromen P450 mit erhöhter Aktivität zu erzeugen und im Screening-Verfahren zu detektieren (siehe Abb. 4,5). Wir konnten desweiteren zeigen, dass es durch die molekulare Optimierung von CYP11B2 (Aldosteronsynthase), einem weiteren Cytochrom P450-Isoenzym, möglich ist, Mutanten herzustellen, die eine effiziente Produktion von Metaboliten zeigen. Wie oben beschrieben, wurde eine Mutantenbank von CYP11B2 mit Hilfe des *GeneMorph II Random Mutagenesis Kits* generiert. Die Mutanten wurden in den Vektor pCAD1 einkloniert und nach dem oben etablierten Verfahren zum Screening eingesetzt. Die enzymatische Aktivität wurde durch den Umsatz des Substrats DOC zu Corticosteron mittels HPLC gemessen. Es wurden ca. 900 *S. pombe* Kolonien untersucht. Hierbei konnten wir 3 Mutanten isolieren, die einen um 800% höheren Umsatz von 11-Desoxycorticosteron (DOC) zu Corticosteron (B) im Vergleich zum Wildtyp zeigten (Abb. 12, Tab 1). Nach der Plasmidisolierung und Sequenzierung konnten auch die Änderungen in der cDNA, die zur Aktivitätsänderungen führen bzw. beitragen, eindeutig identifiziert werden. Diese CYP11B2-Mutanten stellen die bisher aktivsten beschriebenen Varianten dieses Cytochroms P450 dar.

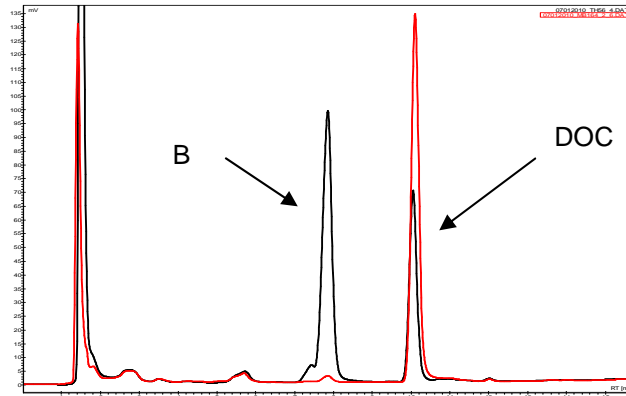


Abb. 12: HPLC Chromatogramm des Wildtypstammes MB164 (rot) und der neuen Mutante TH33 (schwarz).

CYP	Kolonien untersucht	Enzymaktivitäten	Substrat	Mutante	Enzymaktivitäten gegenüber Wildtyps	Sequenzierung
3A4	700	6 β Hydroxylierung	Testosteron	m18	121%	Keine Mutation
				m25	129%	Keine Mutation
				m26	130%	Keine Mutation
				m27	123%	Keine Mutation
				m29	150%	Keine Mutation
11B2	900	11 β Hydroxylierung	11-Desoxycorticosteron	TH36	500%	R20G & G288S
				TH84	520%	Q52E & Q148A & K173R&Q276H & E386A
				TH33	800%	K28R & D162E & G288S

Tabelle 1: Molekularbiologische Optimierung der Cytochrom P450-Enzyme CYP3A4 und CYP11B2

Obwohl nicht im Arbeitsprogramm vorgesehen, ermöglichten uns die Verfügbarkeit des *S. pombe* Stammes INA67 (enthält CYP3A4) und die Entwicklung des Screening-Systems zusätzlich zu den vorgesehenen Arbeiten, ein neues Testverfahren zu entwickeln, um die Untersuchung von Medikamenten oder natürlichen vorkommenden Verbindungen zu realisieren (Abb.13). Da das Cytochrom CYP3A4 das hauptverantwortliche Enzym für die

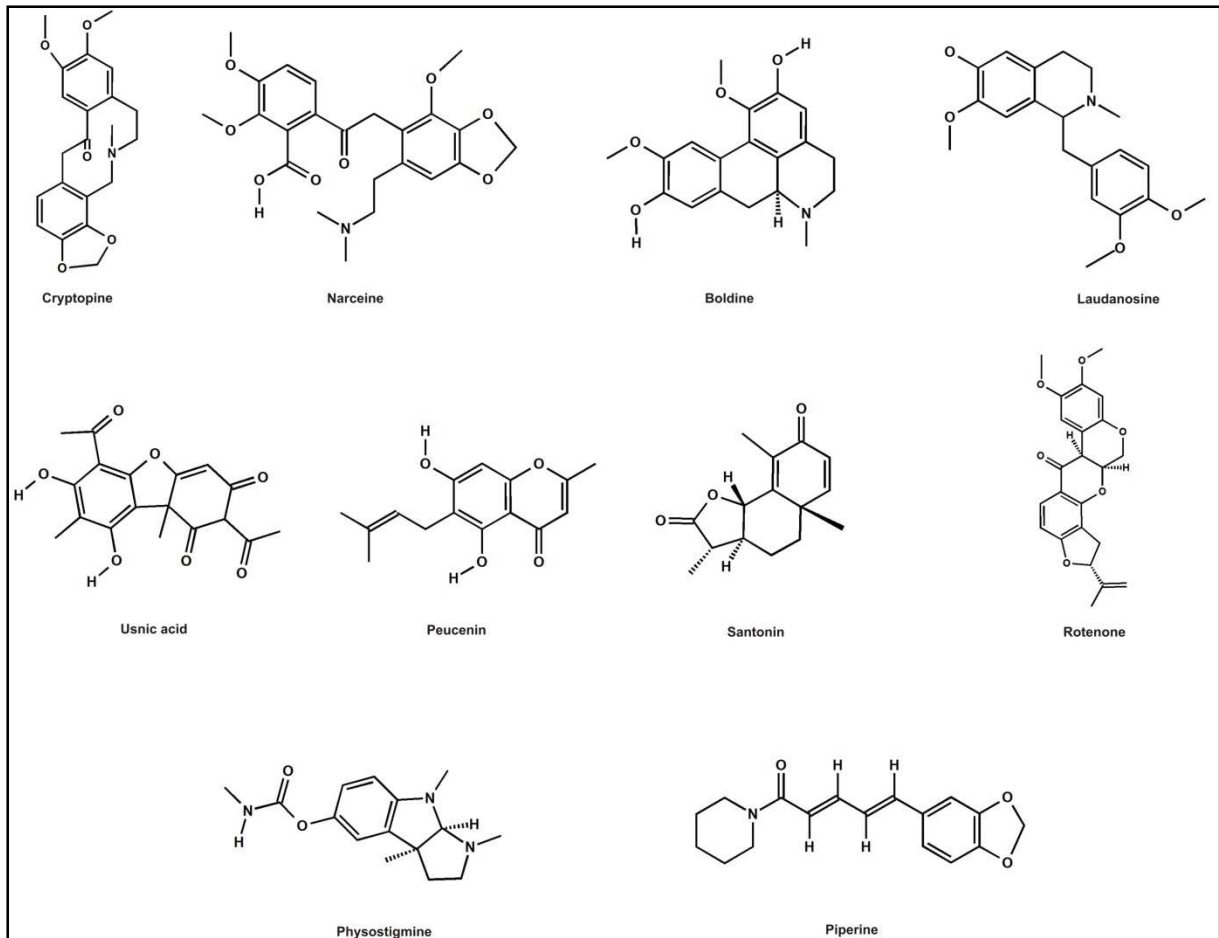


Abb. 14: Naturstoffverbindungen, die mit dem neuen CYP3A4 Screening-Verfahren getestet wurden

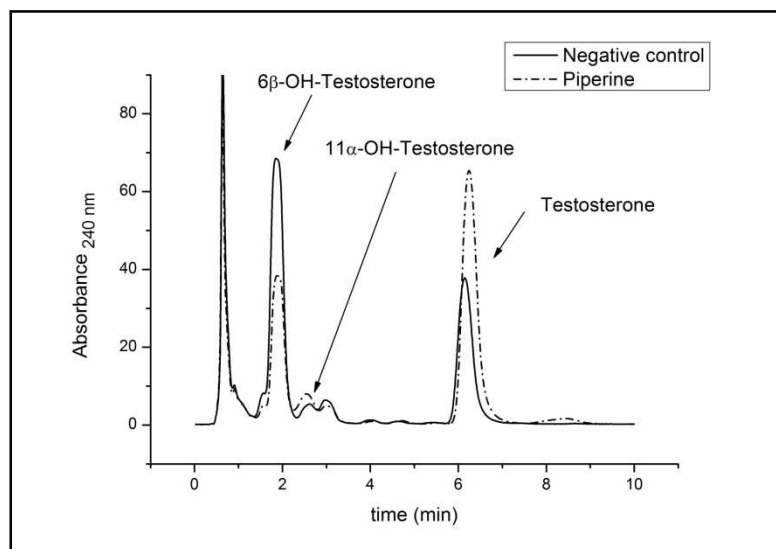


Abb. 15: HPLC Chromatogramm des *in vivo* Umsatzes von Testosteron mit INA67 (CYP3A4 Wildtyp). Die Zugabe von Piperin hemmt den Testosteronumsatz.

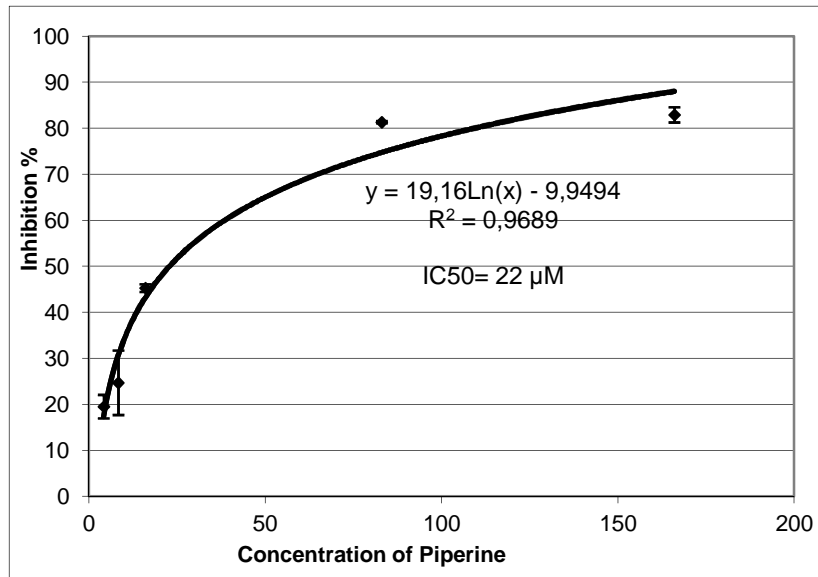


Abb.16: Bestimmung der inhibitorischen Effizienz von Piperidin (IC_{50} -Wert)

Obwohl Volka *et al.* bereits berichteten, dass Piperin ein CYP3A4-Hemmer ist (Volka *et al.*, 2008), verwendet die dort eingesetzte Technik humane Lebermikrosomen, was die Anwendbarkeit sehr limitiert, da in der Leber eine Vielzahl von P450-Isoformen exprimiert ist und daher eine genaue Zuordnung der Inhibierung zu einem Isoenzym praktisch unmöglich ist. Deshalb stellt das in diesem Projekt neu entwickelte *S. pombe* Testverfahren eine effektive Alternative zum Testsystem mit humanen Lebermikrosomen dar.

3.2 Produktion nicht-markierter Metabolite und Erweiterung des CYP-Spektrums

Antragsgemäß wurde zunächst mit der Etablierung der Biotransformationsverfahren und der jeweils notwendigen Analytik für die verschiedenen CYP-Metabolite begonnen, wobei aus Kostengründen mit nicht-markierten Substraten gearbeitet wurde. Für acht CYP-Metabolite (4-Hydroxy-Debrisoquin, Dextrophan, 4-Hydroxy-Diclofenac, 4-Hydroxytolbutamid, Hydroxyibuprofen, Fexofenadin, Hydroxybupropion und Hydroxyomeprazol) konnte die Analytik etabliert werden und für zwei Reaktionen wurden im Schüttelkolben die Umsatzraten bestimmt. Hierbei handelt es sich um die von CAD64 (CYP2D6) katalysierte Umsetzung von Dextrometorphan zu Dextrophan mit einer Rate von $131 \pm 9 \mu\text{M/d}$ sowie um die von CAD68 (CYP2C9) katalysierte Biotransformation von Diclofenac zu 4-Hydroxy-Diclofenac mit einer Rate von $156 \pm 9 \mu\text{M/d}$.

Die human CYP3A-Unterfamilie besteht aus vier Enzymen (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43) die in hohem Masse in ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen. Neben dem in Spaltheften bereits exprimierten CYP3A4, welches unter allen humanen CYPs nach heutigem Wissen die grösste Bedeutung für den Fremdstoff-Metabolismus hat, ist CYP3A7 aus zwei Gründen in biotechnologischer Hinsicht ebenfalls ein interessantes Enzym: Erstens katalysiert es viele zu CYP3A4 identische Reaktionen, wobei es manche Substrate schneller umsetzt (Marill et al, 2000), und zweites ist unter seinen polymorphen Formen eine aktivierte Mutante (CYP3A7*2) gefunden worden (Rodriguez-Antona *et al.*, 2005), was für ein humanes CYP eine Seltenheit ist. Es wurde daher eine funktionale Expression von CYP3A7 und CYP3A7*2 durchgeführt, um hierdurch das vorhandene Spektrum an Fremdstoff-metabolisierenden CYPs zu erweitern und zudem ein effizienteres Produktionssystem für manche CYP3A4-Metabolite zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Expressionskonstrukte kloniert (nicht gezeigt) und mit diesen entsprechend dem folgenden Schema die beiden Spaltheftstämme INA1 und INA2 erzeugt, die zur rekombinanten CYP3A7-Expression befähigt sind (Abb. 17).

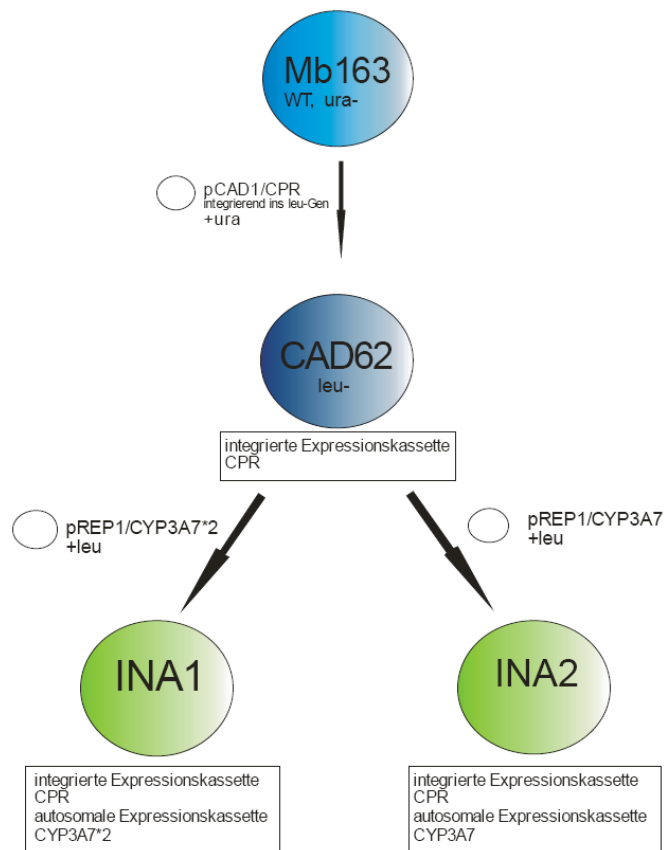


Abb. 17: Stammbaum der Spalthefestämme INA1 und INA2.

Nach der Beschreibung der Wachstumseigenschaften und einem immunologischen Nachweis der humanen CYPs (nicht gezeigt) wurden die Biotransformationseigenschaften der neuen Stämme im Vergleich zum bereits vorhandenen CAD67 (exprimiert CYP3A4) im MTP-Format untersucht. Hierbei war der Umsatz von Testosteron zu 6 β -OH-Testosteron wie erwartet mit 35 $\mu\text{mol/g}\cdot\text{d}$ bei CAD67 am höchsten (Umsatzrate normiert auf die Biotrockenmasse TBM). Bei INA1 konnte ein Umsatz von 220 $\text{nmol/g}\cdot\text{d}$ und damit etwas mehr als beim Stamm mit dem Wildtyp-Enzym INA2, welcher 180 $\text{nmol/g}\cdot\text{d}$ 6 β -OH-Testosteron produzierte, detektiert werden. Da die Standardabweichungen jedoch überlappen ist dieser Unterschied nicht signifikant. Beim Umsatz von 250 μM DHEA zu 16 α -OH-DHEA zeigte INA1 mit 5,8 $\mu\text{mol/g}\cdot\text{d}$ eine signifikant höhere Aktivität als INA2 mit 3,7 $\mu\text{mol/g}\cdot\text{d}$. Beim Test mit dem Stamm CAD67 konnte eine Umsatzrate von 4,3 $\mu\text{mol/g}\cdot\text{d}$ ermittelt werden, welche zwischen den Werten für INA1 und INA2 liegt, sich jedoch von keinem der beiden anderen Umsatzraten signifikant unterscheidet. Die hohe Aktivität von CYP3A4 in diesem Experiment war nach der Literatur nicht zu erwarten (Ohmori et al, 1998). Weiterhin wurden Umsatzmessungen mit Luciferin-PFBE (Luciferin-6`-pentafluorobenzyl ether) durchgeführt, einem Substrat für CYP3A Enzyme, welches durch die Reaktion mit

dem Cytochrom in Luciferin und PFBE gespalten wird. Hierbei zeigte sich eine erheblich höhere Aktivität der beiden CYP3A7-Isoformen gegenüber CYP3A4:

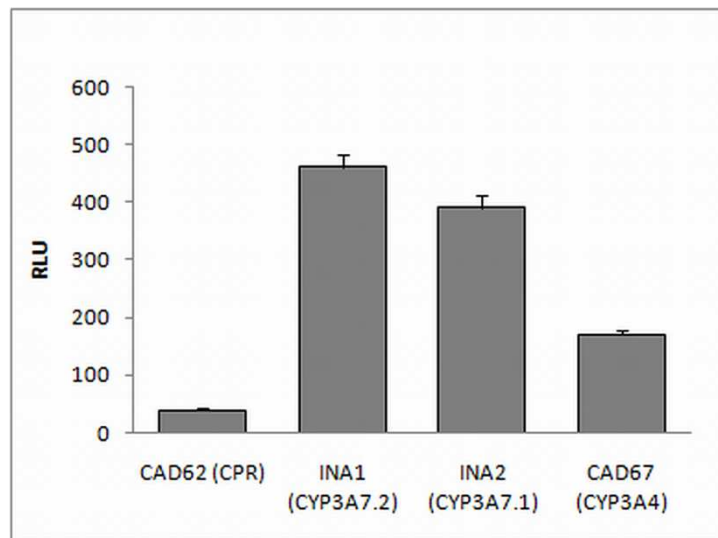


Abb. 18: Ganzzell-Biotransformation von Luciferin-PFBE mit den Stämmen CAD67, INA1 und INA2 sowie dem Elternstamm CAD62 zum Vergleich.

Somit konnte also die angestrebte Erweiterung des vorhandenen CYP-Repertoires durch CYP3A7 und CYP3A7*2 erreicht werden. Weiterhin bieten die hier erhaltenen Ergebnisse eine gute Grundlage für eine darauf aufbauende molekularbiologische Enzymoptimierung, um schlussendlich die Produktion des Metaboliten 16-Hydroxy-DHEA in Angriff zu nehmen.

3.3 Produktion eines CYP-Metaboliten im 5 g-Massstab

Ein Meilenstein des Projektes bestand in der Produktion von 5 g 6 β -Hydroxytestosteron zum Zeitpunkt des Statusseminars, um die Leistungsfähigkeit der hier entwickelten Systeme zur Metabolitensynthese exemplarisch zu etablieren. Zu diesem Zweck wurde die Optimierung der Testosteron-Umsetzung beim Projektpartner IBT2 begonnen konnte bis zu einer Umsatzrate von 1 mM/d voran gebracht werden, wie Abb. 19 zeigt.

Durch das Ausscheiden des Projektpartners IBT2 im Juni 2009 konnte die Produktion von 5 g 6 β -Hydroxy-Testosteron nicht mehr realisiert werden. Der Projektpartner PBT übernahm die Produktion eines anderen CYP-Metaboliten, 4-Hydroxy-Diclofenac, in diesem Massstab. Hierfür konnten im Schüttelkolben Umsatzraten von bis zu 515 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{d}$ erreicht werden. Weiterhin wurde ein vollständiges Downstream Processing für die Aufreinigung aus der Hefekultur etabliert (Abb. 20).

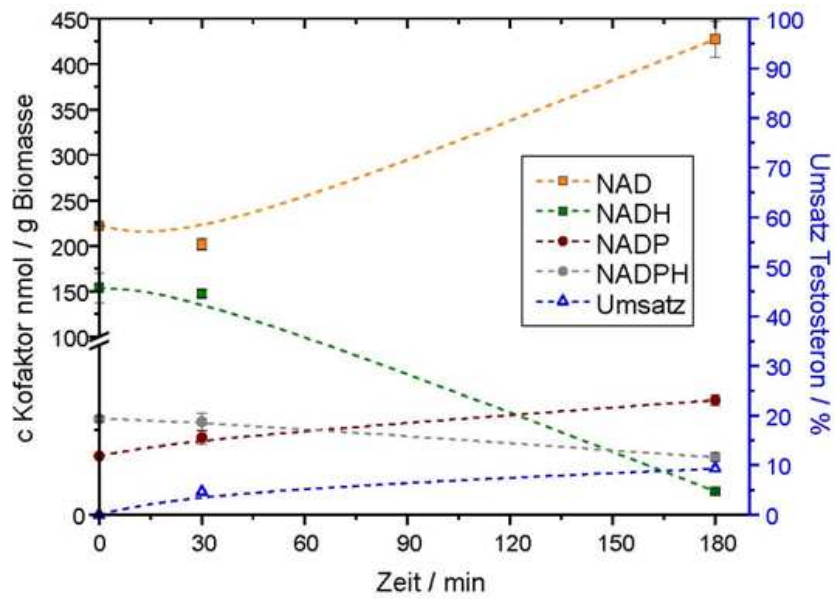


Abb. 19: Produktion von 6 β -Hydroxy-Testosteron mit CAD67 im 250 mL Schüttelkolben.

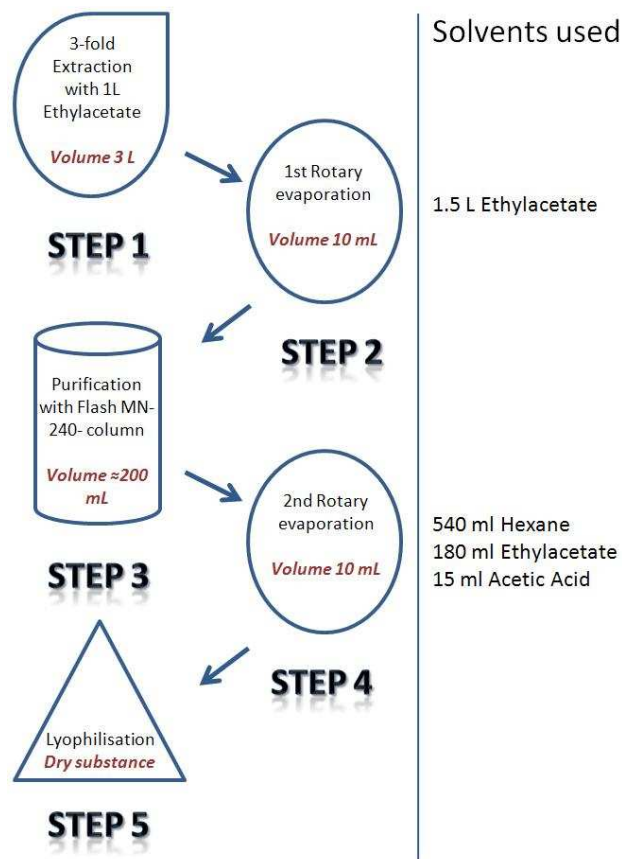


Abb. 20: Schema des Downstream Processings für die Aufreinigung von 4-Hydroxy-Diclofenac aus der Hefekultur.

Damit wurde der Nachweis erbracht, dass mit der vorhandenen Technologie eine Metabolitenproduktion bis zum 5 g-Massstab realisierbar ist.

3.4 Produktion eines CYP-Metaboliten mit stabiler Isotopenmarkierung

Ein Hauptziel des Projektes ist die effiziente Produktion von CYP-Metaboliten mit stabiler Isotopenmarkierung. Hierfür war zunächst in einer exemplarischen Reaktion die Machbarkeit zu zeigen. Zu diesem Zweck wurde die von CYP3A4 im Stamm CAD67 katalysierte 6 β -Hydroxylierung von Testosteron gewählt. Als Substrat wurde Testosteron-d₄ eingesetzt, welches von der Toroma GmbH (Saarbrücken) als Auftragssynthese hergestellt wurde. Die folgende Abbildung zeigt die erhaltenen Ergebnisse:

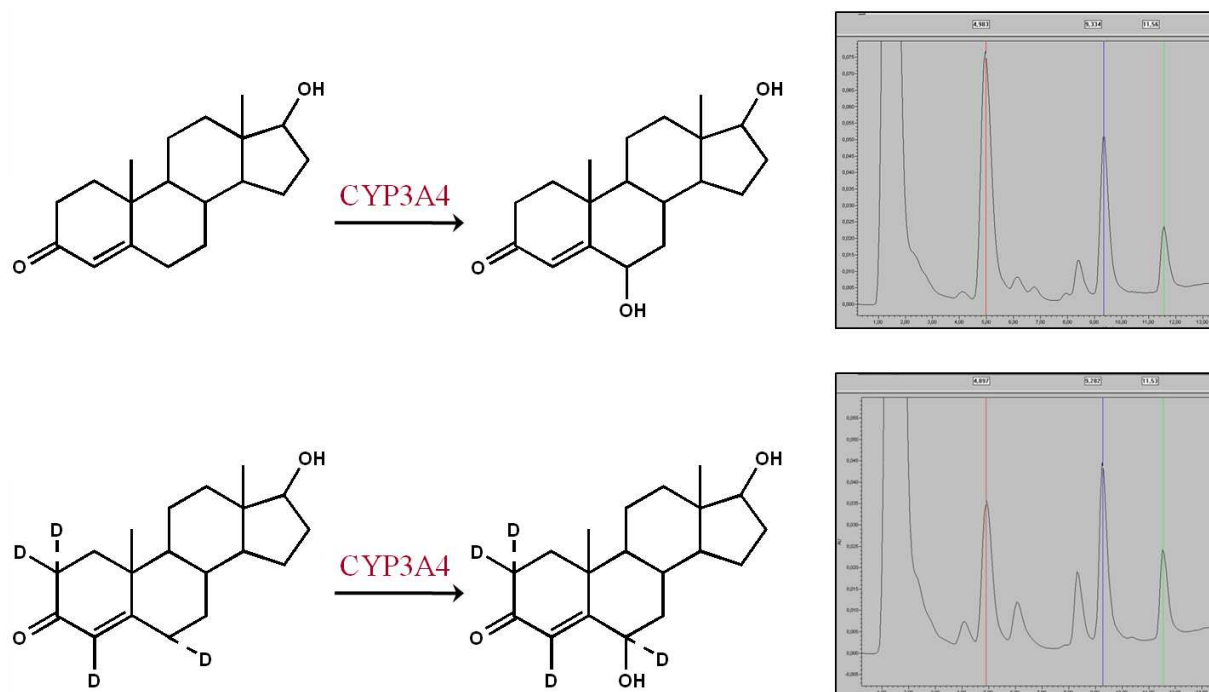


Abb. 21: Vergleich der CYP3A4-katalysierten Ganzzell-Biotransformation von Testosteron (oben) bzw. Testosteron-d₄ (unten). Links: Reaktionsschema; Rechts; HPLC-Analyse. Markiert sind das Produkt (rot, 1. Peak), das Substrat (blau, 2. Peak) und der interne Standard (grün, 3. Peak).

Ein Vergleich der HPLC-Chromatogramme zeigt neben der erfolgreichen Produktion von 6 β -Hydroxytestosteron-d₄ einen nach der Position der Deuterium-Atome zu erwartenden Isotopeneffekt. Die Ausbeute des Hauptproduktes ist etwas niedriger als beim unmarkierten Substrat, und gleichzeitig zeigt sich eine etwas vermehrte Bildung von Nebenmetaboliten (kleine Peaks rechts und links neben dem Produktpeak). Eine von Frau Andrea Schwaninger aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hans H. Maurer (Experimentelle und Klinische Toxikologie,

Uniklinikum Homburg/Saar) durchgeführte LC-MS-Analyse bestätigt die Identität der Produkte (nicht gezeigt).

3.5 Design of Experiment (DoE) für Ganzzell-Biotransformation mit dem Stamm CAD67

In Ganzzell-Biotransformationsexperimenten wird eine Vielzahl von Informationen erzeugt. Es gibt Parameter (*inputs*), die variiert werden, und Ergebnisse (*outputs*), die beobachtet werden. Bei der hier betrachteten Ganzzell-Biotransformation sind *input*-Faktoren wie Glukosekonzentration [g/L] des Mediums, Temperatur [°C], Schüttelfrequenz [rpm] und Zell-Aufkonzentrierungsfaktor zu nennen. Als *output* wird die Umsatzrate in [µM/d], [µM] oder [µmol/g] als Maß für den Erfolg einer Biotransformation herangezogen.

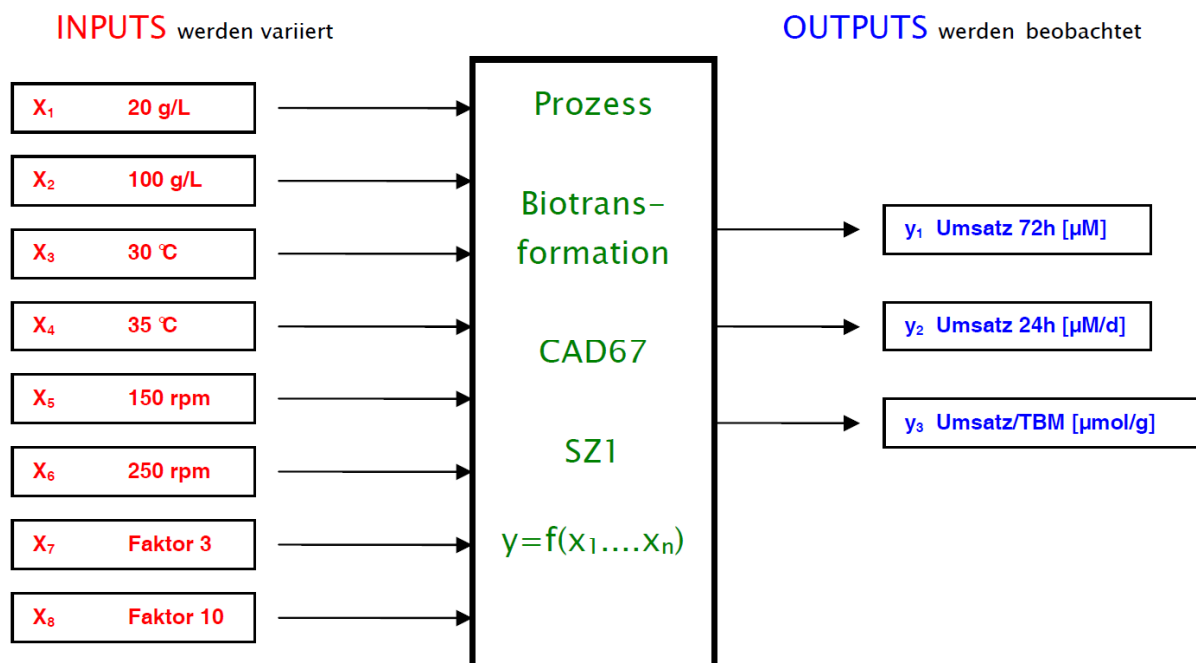


Abb.22: Technische Beschreibung des Ganzzell-Biotransformationssystems.

Design of Experiment (DoE) ist eine Methode zur Planung und statistischen Auswertung von Versuchen. Ziel von DoE für Ganzzell-Biotransformation ist es, mit möglichst wenig Versuchsaufwand möglichst viel über die Zusammenhänge von Einflussvariablen und Umsatzraten zu erfahren. Die gewonnenen Informationen über die Zusammenhänge wurden mit Hilfe des Programms JMP (SAS Institute Inc.; Programmversion 8.0.1) statistisch abgesichert, die Effekte der Einflussvariablen und ihrer Wechselwirkung auf die Umsatzraten sind somit quantifizierbar. Auf diese Weise wurden verschiedene Parameter der CYP3A4-abhängigen Ganzzell-Biotransformation (wie Glukosekonzentration des Mediums,

Temperatur, Schüttelfrequenz und Zell-Aufkonzentrierung) im Labormaßstab ausführlich untersucht. Die relevanten Parameter und die optimalen Bedingungen sollten für den Testosteronumsatz zu 6 β -OH-Testosteron durch rekombinante Spaltheferen ermittelt werden. Zur Quantifizierung der Produkte aus der Biotransformation wurde Flüssig-Flüssig-Extraktion mit anschließender HPLC-Analytik durchgeführt. Es folgte dann eine Anwendung von *Design of Experiment* (DoE) für Ganzzell- Biotransformation, mit Hilfe des Software-Programms JMP (Version 8.0.1), um die Ergebnisse statistisch abzusichern und die Einflusseffekte auf den Umsatzraten zu quantifizieren. Darüber hinaus wurden die Zusammenhänge zwischen den Parametern analysiert. Durch Kleinst-Quadrate-Approximation wurden Modelle gebildet, die möglichst viele Erkenntnisse über den Umsatz liefern. Die auf ‚Maximieren‘ gesetzten Zielgrößen waren Umsatz pro Tag [μ M/d], Umsatz nach 72 h [μ M] und Umsatz pro Trockenbiomasse [μ mol/g].

Die Modelle für alle drei Zielgrößen ergaben eine signifikante Anpassung, ausgedrückt durch das Bestimmtheitsmaß R^2 und die mittlere quadratische Abweichung, auch bekannt als die Standardabweichung RMSE (*root mean squared error*). Das Bestimmtheitsmaß ist als ein Korrelationskoeffizient zwischen den beobachteten und den vorhergesagten Zielgrößen zu verstehen. Die Bestimmtheitsmaße R^2 der drei Modelle (ein Modell für jede Zielgröße) vom Stamm CAD67 lagen zwischen 0,49 und 0,88 mit einer Standardabweichung zwischen 2 % und 16 %. Je nach Zielgröße gibt es einen Parameter, der mit einem, zwei, oder mit gar keinem weiteren Parameter zusammenhängt. Die Parameterabhängigkeit bei CAD67-Umsatz ist in Tabelle 2 dargestellt. In der Tabelle werden ein- bis vierfache Wechselwirkungen zwischen den Parametern beim Umsatz mit CAD67 gezeigt. Die vierfache Wechselwirkung scheint in keinem der Modelle relevant zu sein. In der Spalte von Raum-Zeit-Ausbeute [μ M/d] sind ein-, zwei- und dreifache Wechselwirkungen zu erkennen. In dieser Spalte waren Glukosekonzentration, Zell-Aufkonzentrierungsfaktor und Schüttelfrequenz relevant. Es zeigte sich einen Zusammenhang zwischen der Glukosekonzentration und der Temperatur. Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen Zell- Aufkonzentrierungsfaktor und Schüttelfrequenz gefunden. Die dreifachen Wechselwirkungen bei Raum-Zeit-Ausbeute [μ M/d] waren identisch mit denen der 72 h-Umsatz [μ M]. Beim 72 h-Umsatz konnte ein- und dreifache Wechselwirkung festgestellt werden. Aus vier möglichen dreifachen Wechselwirkungen ist nur eine nicht relevant. So hängen in diesem Fall Glukosekonzentration mit Zell- Aufkonzentrierungsfaktor und Schüttelfrequenz nicht zusammen. In der Spalte [μ mol/g] konnten nur ein- und zweifache Wechselwirkungen festgestellt werden. Hier waren Temperatur und Zell-Aufkonzentrierungsfaktor relevant. Aus sechs möglichen wurden nur vier zweifache Wechselwirkungen gefunden. Es gibt beim Umsatz pro g Trockenbiomasse keinen

Zusammenhang zwischen Glukosekonzentration und Schüttelfrequenz oder zwischen Schüttelfrequenz und Temperatur.

Parameter (Abk.)	Umsatzrate		
	24 h [$\mu\text{M}/\text{d}$]	72 h [μM]	pro g [$\mu\text{mol}/\text{g}$]
G	+	+	-
T	-	-	+
A	+	+	+
S	+	+	-
G*T	+	-	+
G*A	-	-	+
G*S	-	-	-
A*S	+	-	+
A*T	-	-	+
S*T	-	-	-
G*A*S	-	-	-
G*A*T	+	+	-
G*S*T	+	+	-
A*S*T	+	+	-
G*A*S*T	-	-	-

Tabelle 2: Darstellung der mittels JMP ermittelten Parameterabhängigkeiten für CAD67. Grau: Relevante & signifikante Wechselwirkung. n=3. G: Glukosekonzentration, T: Temperatur, A: Zell-Aufkonzentrierungsfaktor, S: Schüttelfrequenz.

Es folgte eine Vorhersageanalyse, bei der die optimalen Parameter aufgrund der maximalen Wichtigkeit (*desirability*) ermittelt wurden. Oft gibt es mehrere gemessene Zielgrößen und die Wichtigkeit des Ergebnisses hängt von allen oder mehreren dieser Zielgrößen ab. Beispielsweise kann die erste Zielgröße maximiert, die zweite minimiert, und die dritte nah zu einem bestimmten Wert gehalten werden. In dieser Arbeit wurde bei allen drei Zielgrößen die maximale Wichtigkeit eingestellt, da stets die maximale Umsatzrate gesucht wurde. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Abk.	Parameter	Einheit	Umsatzrate		
			24 h	72 h	pro g
			[$\mu\text{M}/\text{d}$]	[μM]	[$\mu\text{mol}/\text{g}$]
G	Glukosekonzentration	[g/L]	100	100	-
T	Temperatur	[$^{\circ}\text{C}$]	-	-	30
A	Zell-Aufkonzentrierung	Faktor	10	10	10
S	Schüttelfrequenz	[rpm]	250	250	-
	Theoretische Umsatzrate		45 ± 5	134 ± 16	19 ± 2
	Experimentelle Umsatzrate		44 ± 3	130 ± 10	14 ± 2

Tabelle 3: Darstellung der mittels JMP ermittelten optimalen Parameter für CAD67. Grau: Relevante & signifikante Wechselwirkung. n=3. G: Glukosekonzentration, T: Temperatur, A: Zell-Aufkonzentrierungsfaktor, S: Schüttelfrequenz.

Die Ergebnisse zeigen, dass Faktoren wie Glukosekonzentration, Zell-Aufkonzentrierungsfaktor und Schüttelfrequenz sowohl für die Raum-Zeit-Ausbeute [$\mu\text{M}/\text{d}$] als auch für die 72 h-Umsatzrate [μM] relevant sind. Die optimalen Ergebnisse 74 Parameter waren 100 g/L Glukosekonzentration, Zell-Aufkonzentrierungsfaktor 10 und 250 rpm Schüttelfrequenz. Die theoretisch erreichbare maximale Umsatzrate von CAD67 unter diesen Bedingungen stimmten sehr gut mit den experimentell ermittelten Umsatzraten überein.

Bei der Betrachtung der Umsatzrate pro g Trockenbiomasse ergab sich ein anderes Bild. Das Programm hat gezeigt, dass die signifikanten Parameter nur die Temperatur und die Zell-Aufkonzentrierungsfaktor waren. Die optimale Temperatur war bei 30 $^{\circ}\text{C}$ und der Zell-Aufkonzentrierungsfaktor mußte 10 betragen. Theoretisch sollte unter diesen Bedingungen eine Umsatzrate von $19 \pm 2 \mu\text{mol}/\text{g}$ erreicht werden, im Experiment stellte sie sich jedoch mit $14 \pm 2 \mu\text{mol}/\text{g}$ als niedriger heraus. Unter Kombination der so ermittelten optimalen Parametern erfolgten erneut Ganzzell-Biotransformationen von CAD67 mit verschiedenen Substratkonzentrationen (siehe Abbildungen 23 und 24). Die Diagramme stellen drei verschiedene Zeitpunkte der Probenahme (nach 24 h, 48 h und 72 h) dar. Es ist deutlich zu sehen, dass der Testosteron-Umsatz nach 24 Stunden stagnierte. Die höchste Konzentration des Produkts 6 β -OH-Testosteron betrug $118 \pm 11 \mu\text{M}$. Die Berechnung der Raum-Zeit-Ausbeute [$\mu\text{M}/\text{d}$] zeigt dementsprechend, dass der höchste Umsatz von Testosteron zu 6 β -OH-Testosteron schon nach 24 Stunden erreicht wurde, z. B. $107 \pm 9 \mu\text{M}/\text{d}$ bei 1 mM Testosteron. Nach 48 h konnte bei einer anfänglichen Substratkonzentration von 1 mM Testosteron nur $54 \pm 4 \mu\text{M}/\text{d}$ und nach 72 h nur $39 \pm 4 \mu\text{M}/\text{d}$ umgesetzt werden. Weder eine höhere Substratkonzentration (2,5 mM) noch eine Verlängerung des Biotransformationszeitraums führten zu einer Umsatzsteigerung.

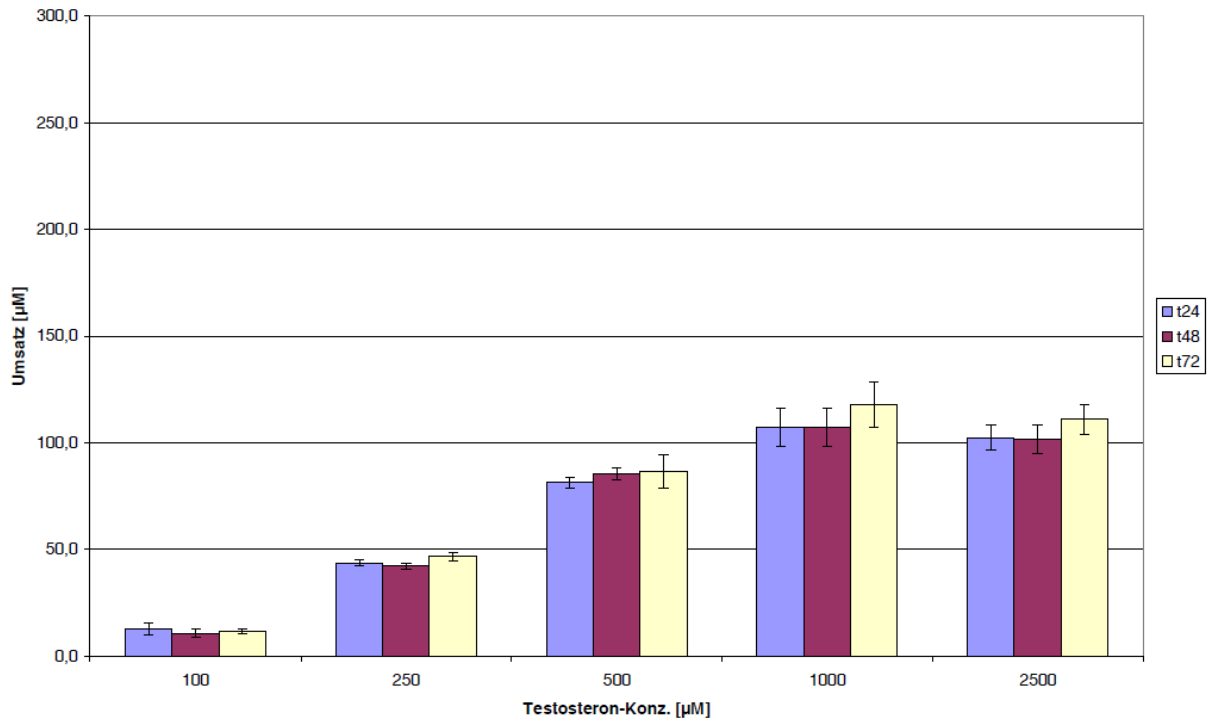


Abb.23: Ganzzell-Biotransformation mit CAD67. Dargestellt ist die Produktkonzentration in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration an Testosteron. Blau=24 h. Rot=48 h. Gelb=72 h. n=3.

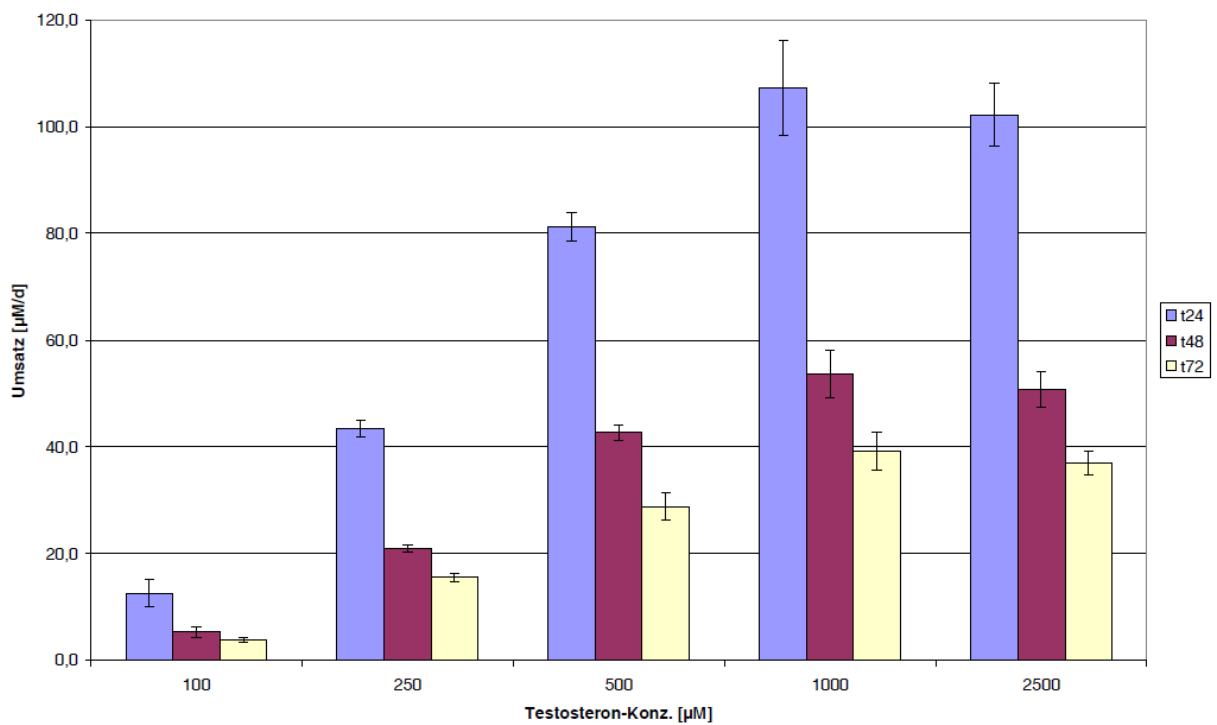


Abb. 24: Ganzzell-Biotransformation mit CAD67. Dargestellt ist die Gesamtumsatzrate in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration an Testosteron. Blau=24 h. Rot=48 h. Gelb=72 h. n=3.

3.6 Produktion von Sorafenib N-Oxid

Zur weiteren Erforschung der Einsatzmöglichkeiten für CYP3A4 und CYP3A7 wurde die Metabolisierung des Antikrebsmittels Sorafenib untersucht. Aus der Literatur war bekannt, daß diese Substanz durch CYP3A4 in ihr *N*-Oxid überführt wird (Lathia et al, 2006). Es sollte nun geklärt werden, ob CYP3A7 diese Reaktion ebenfalls katalysieren kann. Zu diesem Zweck wurden Ganzzell-Biotransformationen mit den oben beschriebenen Stämmen INA1, INA2 und CAD67 durchgeführt. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

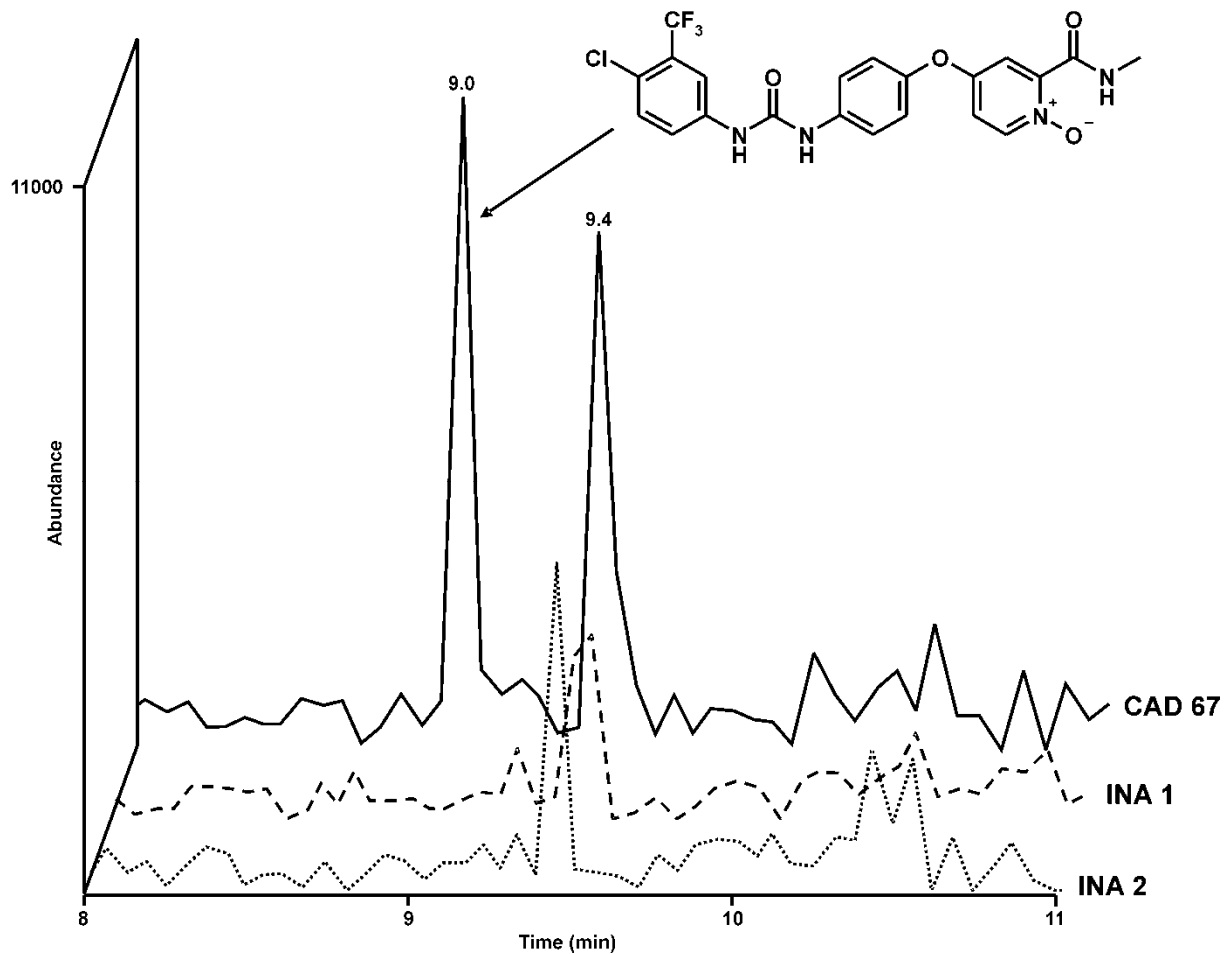
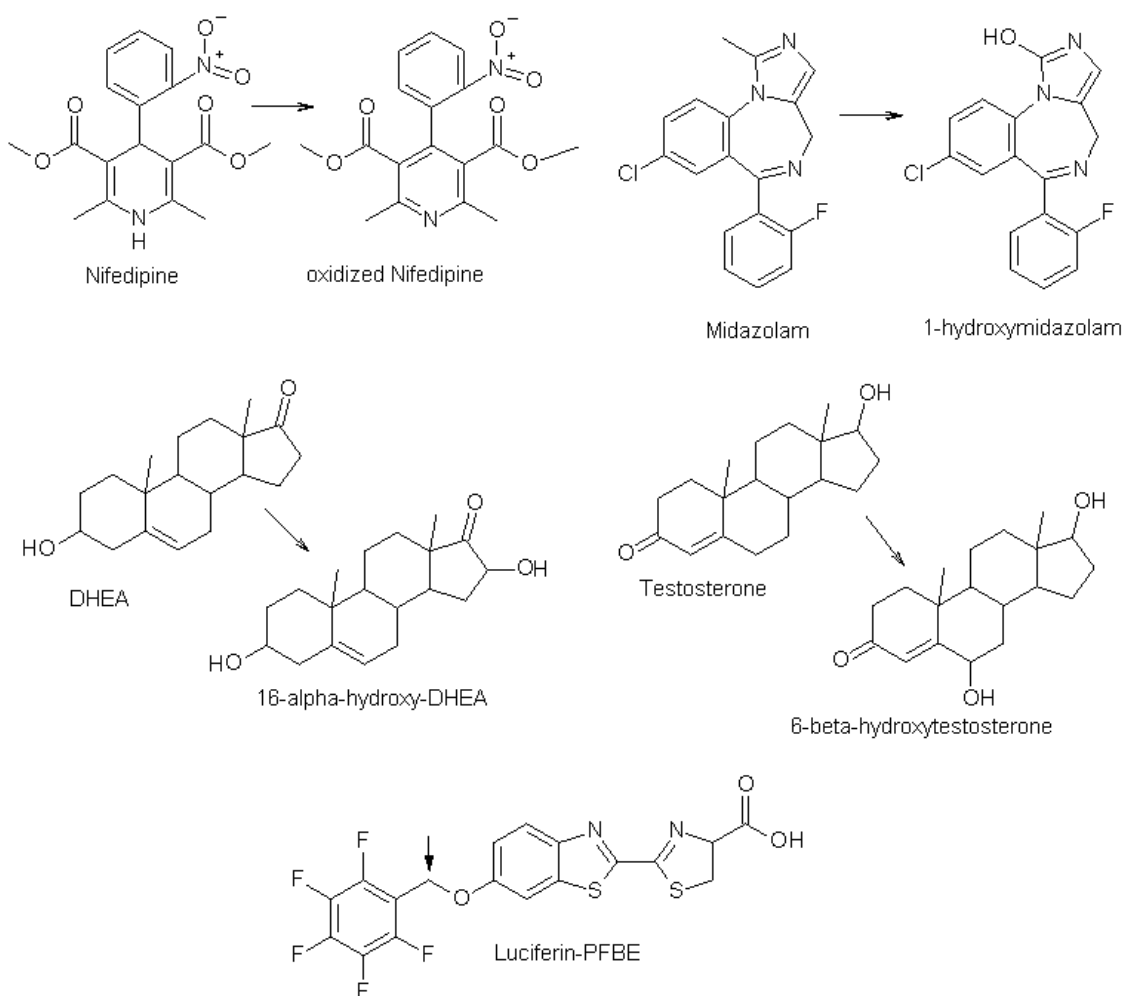


Abb.25: LC-MS-Chromatogramm der Ganzzell-Biotransformation von Sorafenib mit humanem CYP3A4 (CAD67), CYP3A7.1 (INA2) und CYP3A7.2 (INA1). Das *N*-Oxid von Sorafenib (m/z 481; siehe Formel) konnte nach einer Retentionszeit von 9,0 min detektiert werden, während das Substrat (m/z 465) eine Retentionszeit von 9,4 min aufwies. $n=3 * 3$.

Wie erwartet konnte CYP3A4 diese Reaktion innerhalb von wenigen Stunden effizient katalysieren. Demgegenüber zeigten beide polymorphe Varianten des CYP3A7 keinen Umsatz mit diesem Substrat. Dieses unerwartete Ergebnis ist der erste Nachweis von signifikanten katalytischen Unterschieden der beiden nahverwandten CYP3A-Enzyme bezüglich der Umsetzung eines Krebsmedikaments.

3.7 Aktivitätssteigerung von humanen CYP3A-Enzymen durch die Kombination aktivierter polymorpher Varianten

In Ergänzung zum Mutanten-Screening beim Projektpartner UdS wurde bei der PBT versucht, durch die Kombination von literaturbekannten aktivierenden polymorphen Varianten der CYP3A-Enzyme zu Aktivitätssteigerungen bei der Metabolitenproduktion zu kommen. Ausgangspunkt waren die beiden Mutanten CYP3A4*18 mit der Punktmutation L293P (Dai et al, 2001) und CYP3A7*2 mit der Punktmutation T409R (Rodriguez-Antona et al, 2005). Diese beiden Mutationen wurden durch ortsgerichtete Mutagenese einzeln und kombiniert in die drei Enzyme CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 eingeführt. Dann wurden vergleichende Ganzzell-Biotransformationen mit jeweils mehreren verschiedenen Substraten durchgeführt, und zwar Testosteron, DHEA und Luciferin-PFBE für alle drei Enzyme sowie Nifedipin für CYP3A4 und CYP3A5 und Midazolam für CYP3A7. Die verschiedenen Reaktionen zeigt das folgende Schema:



Die Ergebnisse der Versuche sind in den folgenden drei Abbildungen dargestellt.

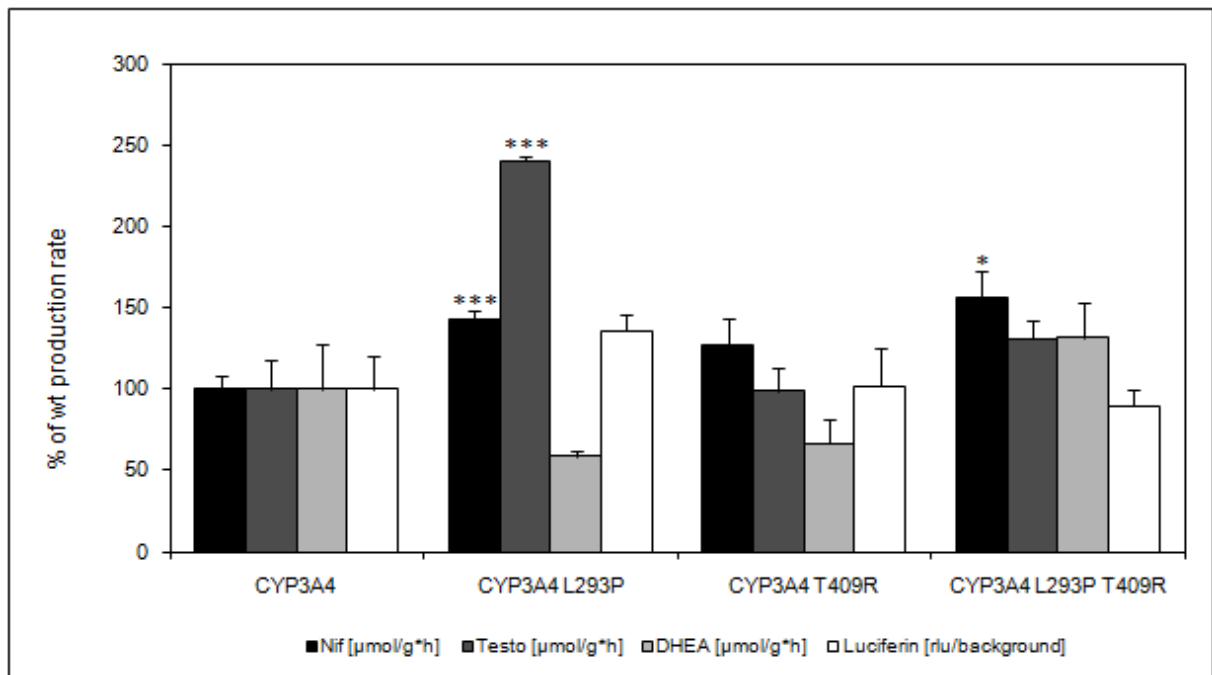


Abb.26: Ganzzell-Biotransformation von Luciferin-PFBE mit CYP3A4 und den drei CYP3A4-Mutanten. Nif: Nifedipin. Testo: Testosteron. DHEA: Dehydroepiandrosteron. Luciferin: Luciferin-PFBE. n ≥ 3. *** p < 0.005, * p < 0.05 im Vergleich zum Wildtyp.

Wie erwartet zeigt die bekannte polymorphe Variante CYP3A4-L293P einen deutlich erhöhten Testosteron-Umsatz mit einer Aktivitätssteigerung um 150%. Interessanterweise ist die Aktivitätserhöhung aber nur für dieses Substrat zu beobachten. Beim Nifedipin-Umsatz ist die Erhöhung zwar noch statistisch signifikant, aber deutlich schwächer, während für die Umsetzung der beiden anderen Substrate keine signifikante Veränderung mehr feststellbar ist und im Fall von DHEA der Umsatz tendenziell sogar schwächer. Die Mutante CYP3A4-T409R zeigt mit keinem Substrat eine signifikante Aktivitätsänderung und die Doppelmutante CYP3A4-L293PT409R nur gegenüber Nifedipin. Der in der Einzelmutante CYP3A4-L293P beobachtete Aktivitätsgewinn gegenüber Testosteron geht also überraschenderweise bei der Doppelmutante wieder verloren. Die Mutante CYP3A5-L293P zeigt ein sehr interessantes Verhalten: Gegenüber Testosterone und DHEA weist sie eine bis zu vierfach erhöhte Aktivität auf, gegenüber den anderen beiden Substrate dagegen findet sich gar keine Aktivierung. In dieser Hinsicht ist die andere Einzelmutante CYP3A5-T409R noch Substratspezifischer, da sie nur mit DHEA eine deutliche Aktivierung zeigt. Die Doppelmutante zeigt (außer bei Testosteron) eine gleichförmigere Aktivitätssteigerung auf etwa das Doppelte gegenüber dem Wildtyp.

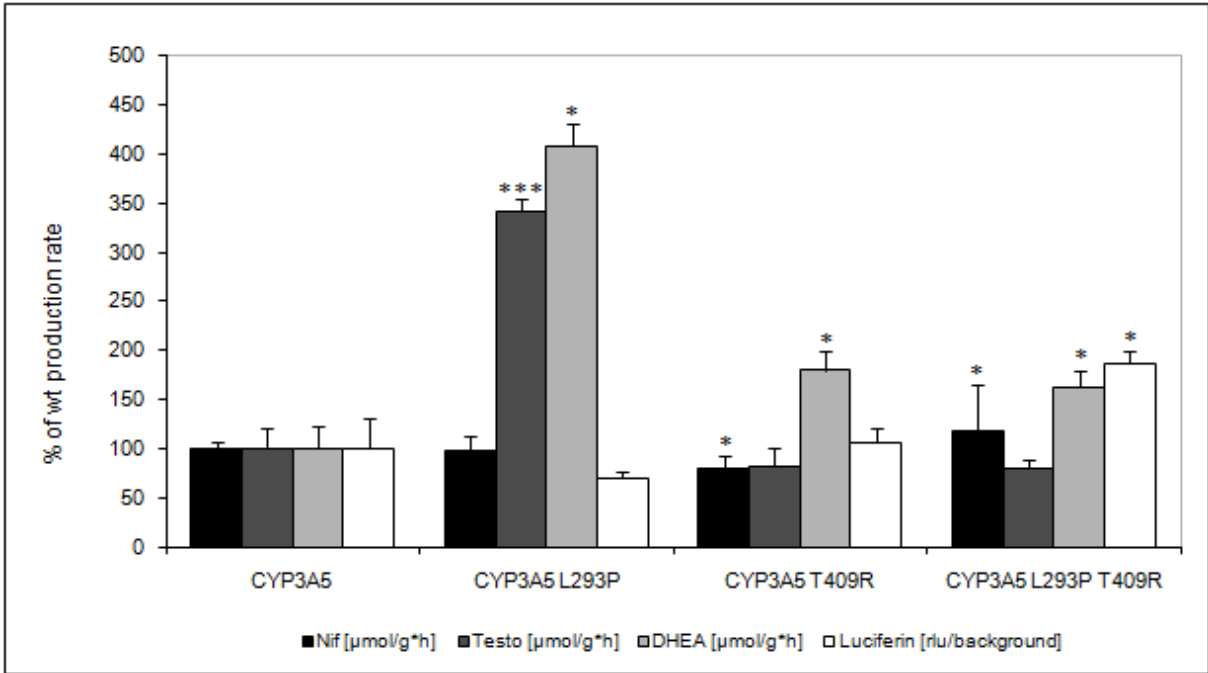


Abb. 27: Ganzzell-Biotransformation von Luciferin-PFBE mit CYP3A5 und den drei CYP3A5-Mutanten. Nif: Nifedipin. Testo: Testosteron. DHEA: Dehydroepiandrosteron. Luciferin: Luciferin-PFBE. $n \geq 3$. *** $p < 0.005$, * $p < 0.05$ im Vergleich zum Wildtyp.

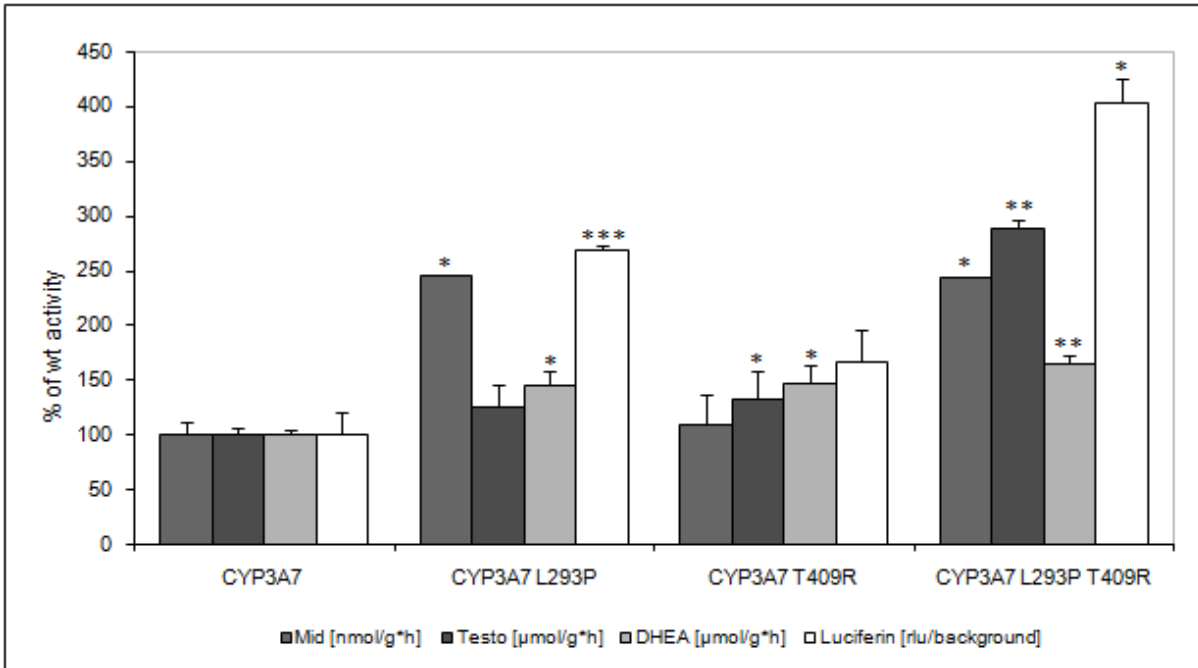


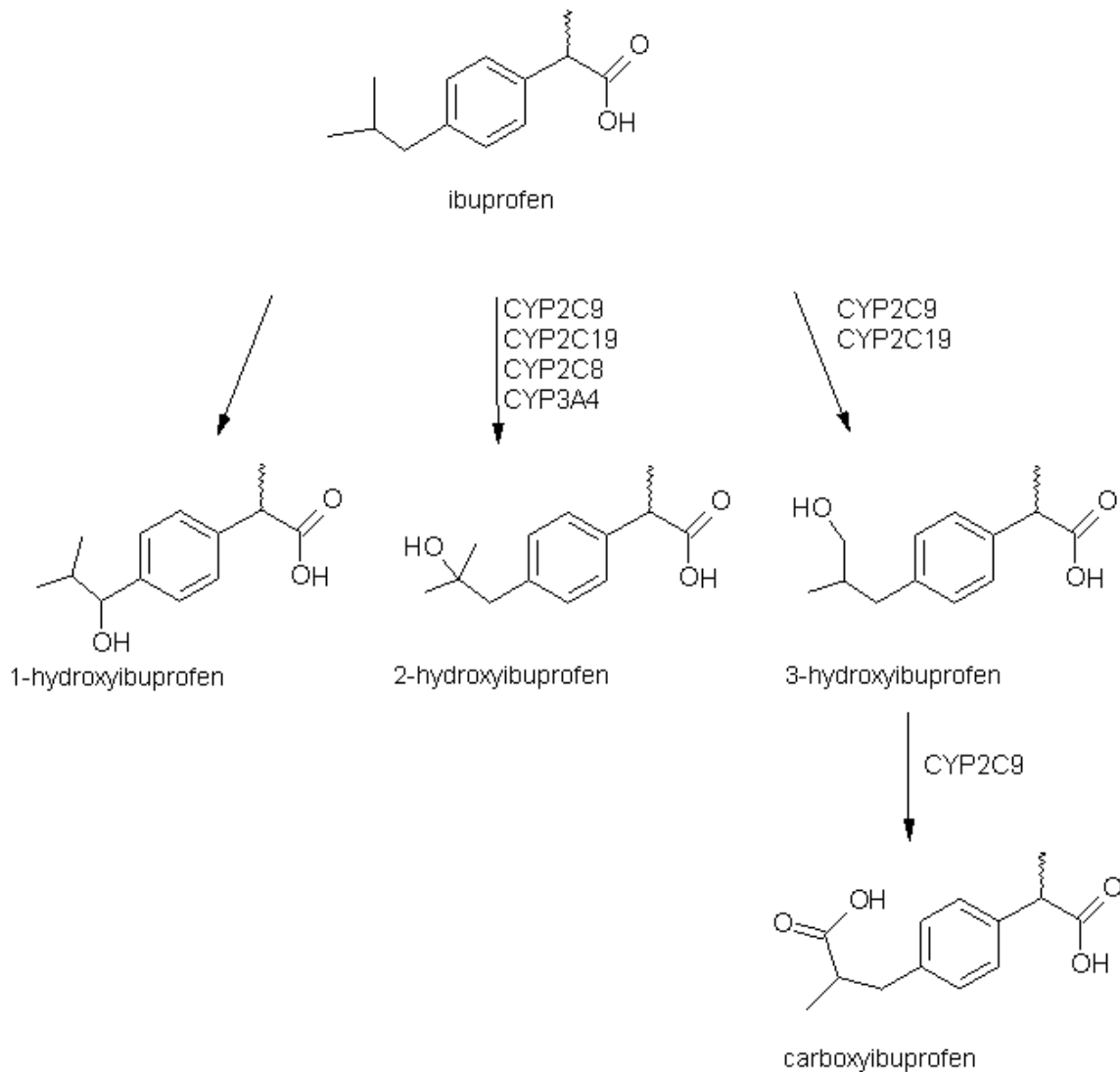
Abb.28: Ganzzell-Biotransformation von Luciferin-PFBE mit CYP3A7 und den drei CYP3A7-Mutanten. Mid: Midazolam. Testo: Testosteron. DHEA: Dehydroepiandrosteron. Luciferin: Luciferin-PFBE. $n \geq 3$. *** $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ im Vergleich zum Wildtyp.

Wie erwartet zeigt die bekannte polymorphe Variante CYP3A7-T409R einen etwas erhöhten DHEA-Umsatz, der sich auch beim Substrat Testosteron beobachten läßt, aber nicht bei Midazolam und Luciferin-PFBE. Die andere (nicht-physiologische) Einzelmutante zeigt sehr schöne Aktivitätssteigerungen bei genau diesen beiden Substraten, aber nicht bei den beiden Steroiden. Interessanterweise ist die Kombination der Einzelmutanten bei allen Substraten entweder deutlich vorteilhaft (Testosteron, Luciferin-PFBE) oder zumindest nicht nachteilig gegenüber der jeweils besseren Einzelmutante (Midazolam, DHEA).

Insgesamt gesehen zeigen diese Experimente, daß die pauschale Bezeichnung „aktivierte Mutante“ für CYP3A-Enzyme offenbar kaum angewendet werden kann, da eine Aktivitätssteigerung fast aller hier untersuchten Mutanten (außer der CYP3A7-Doppelmutante) immer nur für bestimmte Substrate zu beobachten war. Die rationale Strategie der Mutantenkonstruktion kann jedoch als voller Erfolg bezeichnet werden, den von den neun generierten Mutanten zeigten acht (alle außer CYP3A4-T409R) zumindest gegenüber manchen Substrate eine Aktivitätsverbesserung. Darüberhinaus gelang es, für jede einzelne der betrachteten Biotransformationen eine nennenswerte Umsatzsteigerung zu erzielen, und zwar in der Reihenfolge DHEA (+ 300%) \approx Luciferin-PFBE (+ 300%) < Testosteron (+ 250%) < Midazolam (+ 200%) < Nifedipin (+ 50%). Für eine Aktivitätsverbesserung humaner CYP-Enzyme sind diese Ergebnisse durchaus sehenswert. Die neu klonierten Spalthestämme können somit für die effiziente Produktion der jeweiligen Metabolite genutzt werden.

3.8 Produktion von 3-Hydroxyibuprofen

Der humane Metabolismus des bekannten Wirkstoffes Ibuprofen zeichnet sich durch einen Komplex an Phase I- und Phase II-Reaktionen aus. Das folgende Schema zeigt die bekannten P450-abhängigen Reaktionen sowie die identifizierten Isoenzyme:



Der physiologisch wichtige Metabolit 3-Hydroxyibuprofen ist als einziger der bekannten P450-Metabolite des Ibuprofens durch chemische Synthese nicht zugänglich. Es bot sich daher an, im Rahmen des Projektes die biotechnologische Produktion dieses Metaboliten zu versuchen. Hierfür wurde der Stamm CAD68 (coexprimiert CYP2C9 und humane CPR) eingesetzt. Wie Abbildung 29 zeigt wurde unter diesen Bedingungen eine deutlich höhere 3-Hydroxylierung von Ibuprofen beobachtet als die entsprechende 2-Hydroxylierung. Die gemittelte Raum-Zeit-Ausbeute von mehreren Experimenten belief sich auf $125 \pm 34 \mu\text{mol/L}\cdot\text{d}$ (3-OH-Ibu) bzw. $44 \pm 10 \mu\text{mol/L}\cdot\text{d}$ (2-OH-Ibu). Normiert auf die Trockenbiomasse ergaben sich $5.4 \pm 0.8 \mu\text{mol/g}\cdot\text{d}$ (3-OH-Ibu) bzw. $1.9 \pm 0.3 \mu\text{mol/g}\cdot\text{d}$ (2-OH-Ibu). Für die Aufreinigung wurden zunächst eine Flüssig-Flüssig-Extraktion des Kulturüberstandes mit Ethylacetat und eine präparative Dünnschicht-Chromatographie der organischen Phase durchgeführt. Die Entwicklung einer geeigneten HPLC-Methode erlaubte dann im Anschluß die chromatographische Trennung der beiden Hydroxy-Metabolite (Abb. 30).

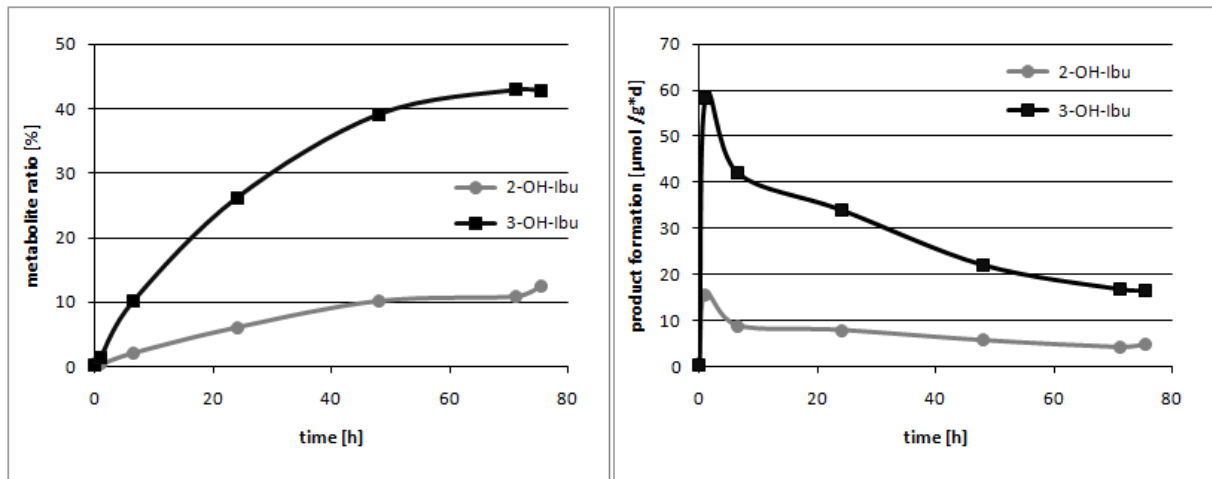


Abb. 29: Beispielhafte Darstellung einer Ganzzell-Biotransformation im 1 L-Maßstab (Schüttelkolben) mit dem Stamm CAD68 und einer Substrat-Anfangskonzentration von 1 mM.

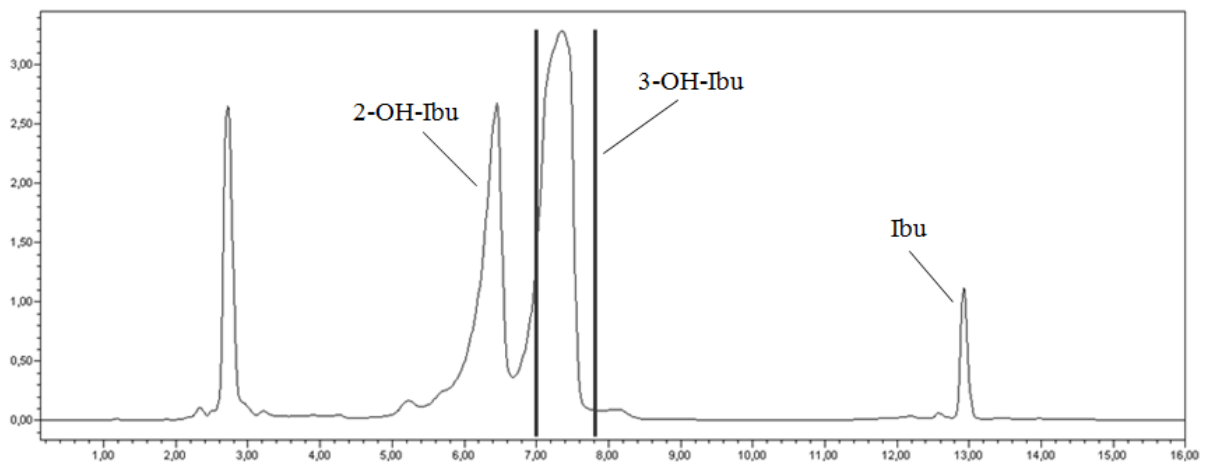


Abb. 30: Chromatographische Produktabtrennung nach Biotransformation von Ibuprofen mit CAD68 und vorheriger LLE und präparativer DC. Die Fraktionen im Retentionszeitbereich von 7,0 bis 7,9 min wurden für die Aufreinigung von 3-Hydroxyibuprofen abgetrennt.

Die massenspektrometrische Untersuchung der beiden Hydroxymetabolite zeigte deutliche Unterschiede zwischen ihnen:

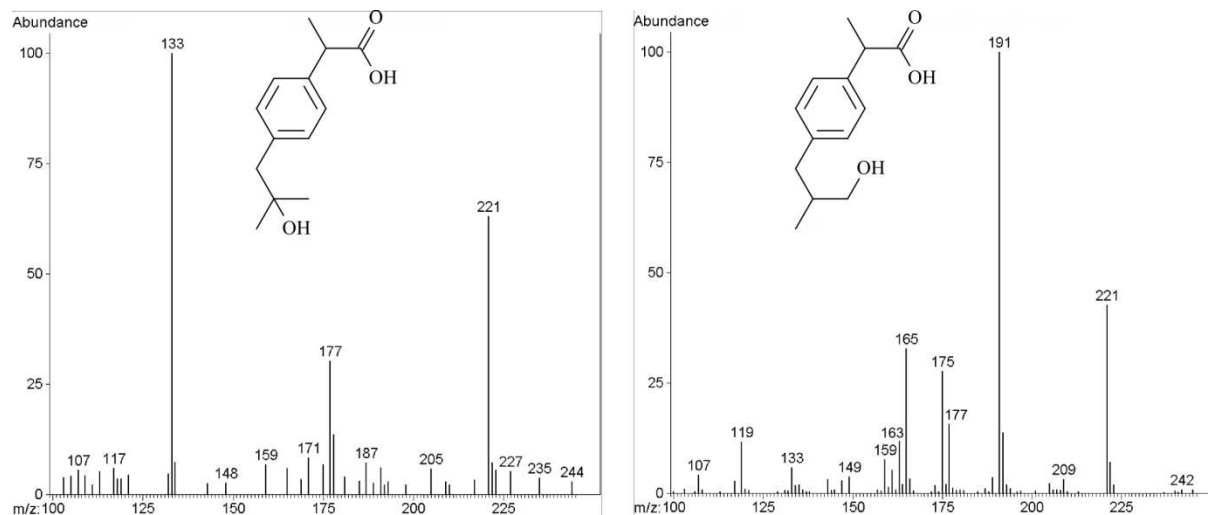


Abb. 31: MSD-Spektren (negative ion mode) der beiden Metabolite 2-OH-Ibu (links) und 3-OH-Ibu (rechts).

Durch die Aufarbeitung von vier 1 L-Biotransformationsansätzen konnten insgesamt 44 mg an 3-Hydroxyibuprofen in hoher Reinheit (98% gemäß HPLC) gewonnen werden. Herr Dr. Josef Zapp (Pharmazeutische Biologie, Universität des Saarlandes) konnte die Struktur des Metaboliten durch NMR-Analyse endgültig bestätigen (Daten nicht gezeigt). Dies war insofern notwendig, da in der Literatur widersprüchliche NMR-Daten für diese Verbindung veröffentlicht worden waren. Die hier von Herrn Zapp erhaltenen Daten decken sich mit denen aus der Gruppe von Rodrigues (Chang et al, 2008) und widersprechen denen der Gruppe Hansen (Kepp et al, 1997). Die Verfügbarkeit dieses Metaboliten erlaubt nun seinen Einsatz für medizinische Fragestellungen, beispielsweise zur Identifikation von möglichen CYP2C9-Polymorphismen bei Patienten.

3.9 Prozessoptimierung der Kultivierung des Stammes *Schizosaccharomyces pombe*

Die ORGANOBALANCE hat die Arbeiten des ausgetretenen Projektpartners Jülich GmbH übernommen und führte unter Verwendung des Hefestammes, der vom Projektpartner PomBioTech zur Verfügung gestellt wurde, eine umfassende Prozessentwicklung der vorhandenen Verfahren zur Cortisol-Produktion durch. Mithilfe der Daten der erzielten Optimierung konnte die Datenerhebung für die Ökoeffizienzanalyse erfolgen.

Aus dem resultierenden Verfahren erfolgt die Entwicklung eines effizienten *Downstream Processing* zur ökologisch sinnvollen, effizienten und kostengünstigen Gewinnung der Zielsubstanzen.

3.9.1 Untersuchung der Homogenität des SZ1 Stammes

Für die Gewährleistung eines ökologischen und wirtschaftlichen Prozesses muss sichergestellt sein, dass im Prozess ein stabiler Stamm eingesetzt wird. Die Produktivität, in diesem Prozess gemessen an der Ganzzell - Biotransformation von 11-Desoxycortisol zu Cortisol, sollte im Prozess reproduzierbar und gleichbleibend sein.

Um diese Stabilität für diesen Prozess sicherzustellen, wurde im Folgenden eine Populationsanalyse mit der verwendeten rekombinanten Spalthefe der Art *Schizosaccharomyces pombe*. Der Stamm SZ1 wurde in allen folgenden Versuchen verwendet.

Der von PomBioTech zur Verfügung gestellte SZ1 Stamm wurde dafür auf EMM-Agar ausplattiert und inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden 20 Kolonien von dieser Platte auf Wachstum untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle Kolonien des Stammes im Wachstumsverhalten, gemessen an der optischen Dichte, gleich sind. Mit einem Variationskoeffizienten von 6 % wurde eine optische Dichte von 16 bei allen Stämmen gemessen (Daten nicht gezeigt).

Nachfolgend wurden acht Kolonien des SZ1 Stammes auf ihre Cortisolbildung untersucht. An jeweils drei verschiedenen Zeitpunkten in der Biotransformation wurde die Cortisolbildung analysiert.

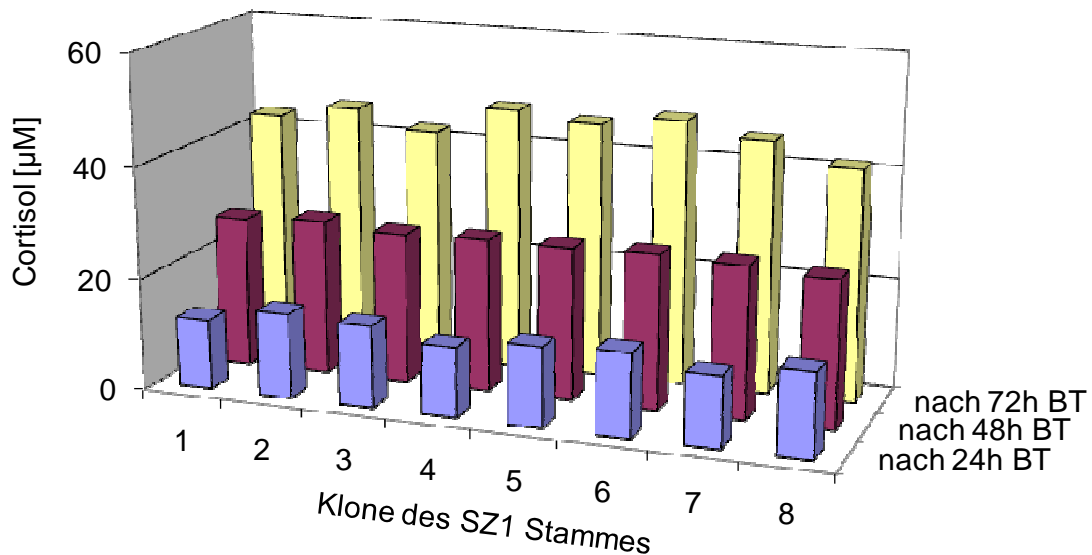


Abb. 32: Cortisolkonzentration von acht Kolonien des SZ1 Stammes jeweils analysiert an drei verschiedenen Zeitpunkten in der Biotransformation (BT)

Mit einem maximalen Variationskoeffizienten von 8 % liegt die Cortisolbildungsrate bei den drei Zeitpunkten bei allen Kolonien gleich (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Es kann somit im Folgenden eine Prozessoptimierung auf Basis eines in seiner Population stabilen Stammes durchgeführt werden.

3.9.2 Optimierung der Nährstoffversorgung

Für die Effizienz des Gesamtprozesses ist das Wachstum des verwendeten, von PomBiotech entwickelten und zur Verfügung gestellten Stammes SZ1 eines der ausschlaggebenden Parameter. Daher wurden – ausgehend von der durch PomBioTech zur Verfügung gestellten SOP - erste Optimierungsversuche vorgenommen, bei denen das Medium und seine Bestandteile im Focus der Betrachtung standen.

Im ersten Schritt wurde die Kultivierung, wie vom Projektpartner PomBioTech an den Partner OB übermittelt, von OB angepasst und etabliert. Im Folgenden sei kurz auf den Prozess eingegangen:

Für die Kultivierung des Stammes SZ1 wird eine Vorkultur in 20 ml Edinburgh Minimal Medium (EMM) angeimpft. Diese wird bei 30 °C schüttelnd für 24 Stunden inkubiert. Diese Vorkultur wird verwendet, um die 100 ml EMM der Hauptkultur 10 %ig (v/v) anzupfen. Diese wird wie die Vorkultur bei 30 °C schüttelnd für 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wird die gesamte Zellmasse der Hauptkultur in frischem EMM mit einem Aufkonzentrationsfaktor von 10 aufgenommen. Diese Zellsuspension wird mit 2 % (v/v) Substratlösung, der Reinstein S Substanz, versehen und stellt die Biotransformationskultur dar. Weiter sieht der bisher bestehende Prozess eine Supplementation des EMM Mediums mit Leucin in einer Konzentration von 100 µg/ml vor. Im weiteren Verlauf wird das Produkt Cortisol durch Extraktion gewonnen, worauf im Abschnitt 0 eingegangen wird.

Zur Medienoptimierung wurde das EMM gegen ein weiteres Medien in Bezug auf das Wachstum des Stammes SZ1 untersucht. EMM Medium gilt hierbei als Referenzmedium, da der schon bestehende Prozess EMM als Anzuchtmedium vorsieht. Bei dem Vergleichsmedium handelt es sich um WM8 Medium mit Glucose (WM8 Glu) (Lang und Looman (1995)). Das Ziel ist es, das Wachstum des Stammes SZ1 so zu verbessern, dass die Zelldichte in dem Vergleichsmedium höher liegt als im EMM. Der Wachstumsfortschritt der Kulturen wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) bestimmt. Im Vorfeld wurde von OB bestätigt, dass eine Zunahme der OD mit einer Zunahme der Biotrockensubstanz (BTS) und der Zellzahl korreliert.

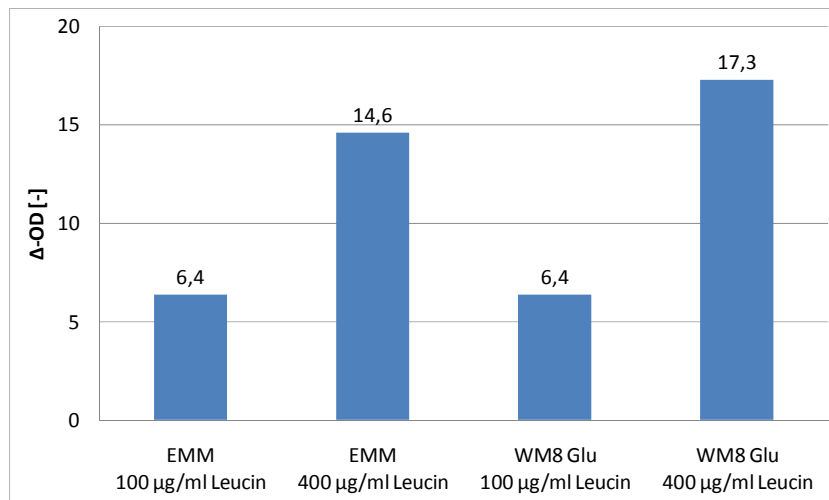


Abb. 33: Optimierung der Nährstoffversorgung. Dargestellt ist das Wachstum der Hefe *S. pombe* in Delta-OD in verschiedenen Medien und dem Supplement Leucin.

Zusätzlich zu diesem Versuch wurden weitere Experimente durchgeführt, welche den Einfluss der supplementierten Leucinmenge im Medium auf das Wachstum des Stammes zeigen sollen. Hierbei wurde die Leucinmenge von 100 µg/ml, die im bestehenden Prozess vorgesehen sind, auf 400 µg/ml erhöht.

Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, ist eine starke Änderung im Wachstumsfortschritt zu erkennen. Dabei ist festzuhalten, dass sowohl in EMM als auch in WM8 die erhöhte Konzentration an Leucin einen Wachstumsvorteil gegenüber der alten Kultivierungsmethode mit 100 µg/ml Leucin zeigt.

Durch das Medium WM8 Glu mit einer Leucinmenge von 400 µg/ml konnte der Prozess hinsichtlich des Wachstums der Hefe *S. pombe* gegenüber der alten Methode optimiert werden. Eine Wachstumssteigerung um den Faktor 2,5 konnte erreicht werden.

3.9.3 Einfluss von Ethanol auf das Wachstum

Bei dem Stamm SZ1 handelt es sich um die Hefe *Schizosaccharomyces pombe* und somit um einen Crabtree-positiven Organismus. Es kommt somit während des Wachstums auf Glucose zur Bildung von Ethanol durch den Organismus.

Zur Biotransformation wird das Substrat, 11-Deoxycortisol, in Ethanol gelöst, zu dosiert. Dabei fungiert Ethanol einerseits als Lösungsmittel des Substrates selbst und andererseits als Lösungsvermittler im Biotransformationsansatz, auch Co-Solvent genannt. Dadurch wird

zusätzlich Ethanol in den Prozess eingebracht, was inhibierend auf das Wachstum des Stammes wirken könnte. Daher wurde der Einfluss des Ethanolgehaltes auf das Wachstum untersucht, indem Ethanol zu dem Medium zu dosiert wurde.

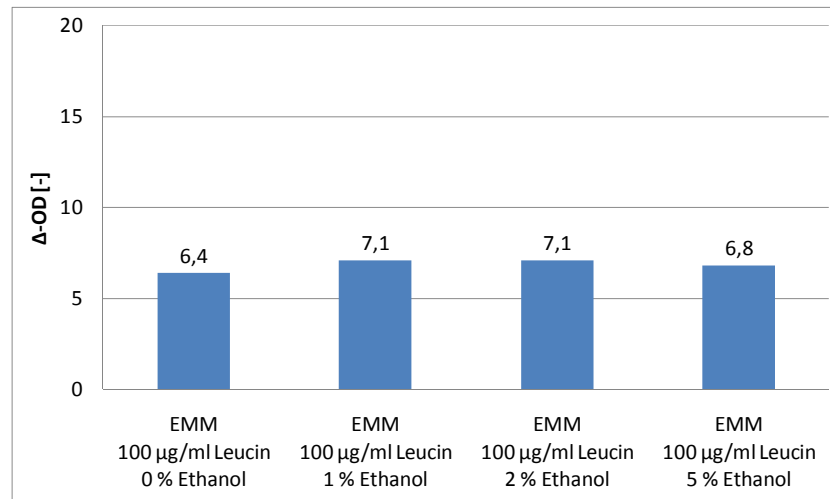


Abb. 34: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Wachstum. Dargestellt ist das Wachstum der Hefe *S. pombe* in EMM mit den Ethanolkonzentrationen 0, 1, 2 und 5 % (v/v).

Aus der Abbildung 34 ist zu erkennen, dass die Ethanolkonzentration keinen Einfluss auf das Wachstum des *Schizosaccharomyces pombe* Stammes hat. Die Hefe wird somit in ihrem Wachstum durch den zusätzlichen Ethanol nicht beeinflusst.

3.10 Etablierung und Optimierung der Metabolitanalytik

Die Metabolitanalytik wurde mithilfe von Standards in der HPLC etabliert und optimiert. Zur Anwendung der schnellen Analytik kommt eine isokratische Methode zur Anwendung, bei schlechter Auftrennung der Substanzen, bedingt durch z.B. Coelution von Störsubstanzen, wird eine Gradienten-Methode angewendet.

3.11 Prozessoptimierung der Biotransformation von 11-Deoxycortisol mit *S. pombe*

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse beruhen alle auf der Kultivierung in EMM Medium mit einer erhöhten Menge an Leucin (400 µg/ml) und einer 10 % -igen (v/v) Animpfdichte der Hauptkultur.

3.11.1 Substratmenge und Biomasse im Assay

Auch die Optimierung des Biotransformationsversuches ist ein wichtiger Teil dieses Projektes. Eine Reihe von Parametern können variiert werden, welche einen Einfluss auf die Effizienz der Biotransformation haben könnten. So wurde sowohl die Substratkonzentration als auch die eingesetzte Biomasse im Biotransformationsassay verändert.

Die Variation der Substratkonzentration geht mit einer Veränderung der zusätzlich hinzugefügten Ethanolkonzentration einher. Wie aus Abbildung 34 hervorgeht, ist eine erhöhte Ethanolkonzentration nicht nachteilig für das Wachstum des Stammes. Dennoch kann eine erhöhte Ethanolkonzentration Einfluss auf das System haben. Um die Konzentration des zusätzlich hinzugefügten Ethanols so gering wie möglich zu halten, wurde eine Stocklösung mit einer Substratkonzentration nahe der Löslichkeitsgrenze eingesetzt. Die Löslichkeitsgrenze des Substrates in Ethanol liegt bei 50 mg / ml Ethanol. Das Substrat wurde so in den Konzentrationen variiert, dass es sich immer deutlich im Überschuss im Ansatz befand, sodass eine Michaelis Menden Kinetik angenommen werden kann.

Um den Effekt der Reinstein S-Substanzkonzentration bzw. der Ethanolkonzentration in der Biotransformation zu untersuchen wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: 1 %, 2 % und 5 % (v/v). Zusätzlich zu der Veränderung der Substratkonzentration in Verbindung mit der Ethanolkonzentration wurde auch die eingesetzte Biomasse im Assay variiert. Dadurch sollte untersucht werden, ob die in der Fermentation produzierte Biomasse effektiver, durch einen verringerten Einsatz im Assay, genutzt werden kann. Der bisher angewendete Prozess sieht eine Aufkonzentrierung der Fermentationskultur um den Faktor zehn (bis auf 19 mg BTS/ml) vor. Für den Vergleich wurde eine Aufkonzentrierung um den Faktor fünf (10 mg BTS/ml) in diesem Versuch verwendet. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 35 dargestellt.

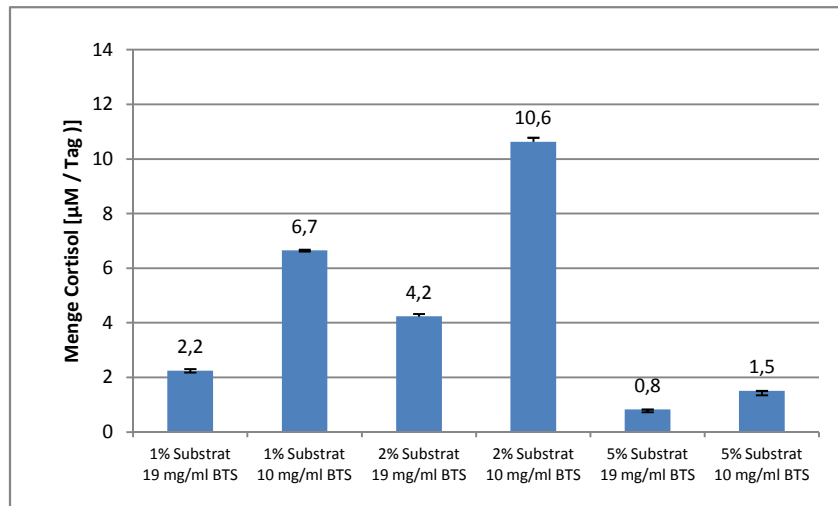


Abb. 35: Cortisolkonzentration in Abhängigkeit der Substratmenge und der Zellmasse in der Biotransformation. Dargestellt ist die produzierte Cortisolmenge in μM pro Tag in Abhängigkeit der eingesetzten Substratmenge und Zellmasse in der Biotransformation.

Sowohl die Substratkonzentration als auch die Menge der eingesetzten Biomasse beeinflussen den Umsatz des 11-Deoxycortisol zu Cortisol in der Biotransformation deutlich.

Zunächst sei auf den Einfluss der Substratkonzentration im Prozess eingegangen. Hierbei ist eine Substratkonzentration von 5 % (v/v) im Assay negativ für die Effizienz des Systems. Im Vergleich zu eingesetzten 2 % (v/v) Substrat ist eine deutliche Reduktion der Produktmenge bei eingesetzten 5 % (v/v) zu verzeichnen. So wird beispielsweise bei eingesetzten 10 mg BTS/ml und 2 % (v/v) Substrat eine Cortisolmenge von 10,6 $\mu\text{M}/\text{Tag}$ erreicht, wohingegen bei 10 mg BTS/ml und 5 % (v/v) Substrat nur eine Konzentration von 1,5 $\mu\text{M}/\text{Tag}$ erreicht wird. Bei der Einbeziehung der Ergebnisse aus dem Kapitel 0 fällt bezüglich des Einflusses des Ethanolgehaltes im Assay auf, dass keine der getesteten Ethanolkonzentrationen einen Einfluss auf das Wachstum hat, jedoch eine Reduktion der gebildeten Cortisolmenge bei einer Ethanolkonzentration von 5 % (v/v) detektiert wird. Dieses Resultat lässt die Hypothese zu, dass entweder eine zu hohe Substratkonzentration oder die hohe Ethanolkonzentration inhibierend auf das Enzymsystem wirkt.

Die eingesetzte Substratkonzentration von 2 % (v/v) ist von den hier getesteten Varianten die beste Konzentration bezogen auf die Ausbeute des Produktes.

Im Weiteren seien auf die Ergebnisse der Variation der eingesetzten Biomasse in der Biotransformation eingegangen. Die Verringerung der Biomasse in der Biotransformation führt zu deutlichen Steigerungen in der Cortisol-Ausbeute. Vergleicht man die bisherige Methode mit dem optimierten Prozess, so kann eine Steigerung von 4,2 μM Cortisol pro Tag zu einem Wert von 10,6 μM Cortisol pro Tag detektiert werden. Die durch die geringere

Zellmasse bessere Nährstoff- und Sauerstoffversorgung könnte dazu führen, dass ein besserer Stoffwechsel in den Zellen gegeben ist und dadurch eine höhere Umsatzrate des 11-Deoxycortisols zu Cortisol erreicht werden kann.

Die Ergebnisse erfordern eine weitere Untersuchung der Reduktion der Zellmasse in der Biotransformation, wodurch die Ausbeute pro Zellmasse weiter gesteigert werden könnte.

Mit dieser Optimierung konnte ein Höchstwert von 10 μM pro Tag erreicht werden.

3.11.2 Extraktions-pH-Wert

Im Allgemeinen kann die Ausbeute der Gewinnung von Steroiden durch Variation des pH-Wertes bei der Extraktion beeinflusst werden. Saure Extraktionsbedingungen führen zur Assoziation des Produktes an die Zellwand der Hefe, wohingegen bei einer basischen Extraktion das Produkt im Überstand lokalisiert ist (Fenske (1995)).

Der bisherige Prozess sieht einen neutralen pH-Wert bei der Extraktion vor. Um zu untersuchen, ob der pH-Wert einen Einfluss auf die Ausbeute bei der Extraktion hat, wurden exemplarisch zwei pH-Werte ausgewählt. Der pH-Wert 2,5 für die saure Extraktion und der pH-Wert 8,0 für die basische Extraktion.

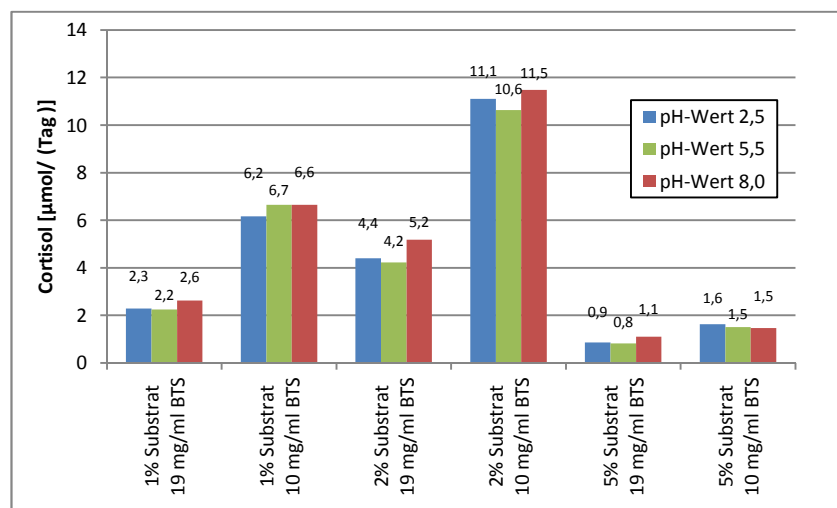


Abb. 36: Einfluss des pH-Wertes der Extraktion auf die Ausbeute. Dargestellt ist die produzierte Cortisolmenge in μM pro Tag in Abhängigkeit des bei der Extraktion eingesetzten pH-Wertes.

Aus Abbildung 36 ist zu erkennen, dass der Prozess konstante Ausbeuten bei der Variation des pH-Wertes der Extraktion zeigt. Die Extraktion wird damit wie bisher ohne pH-Wert-Korrektur bei einem pH-Wert von 5,5 durchgeführt.

3.11.3 Glucosekonzentration im Assay

Um den Prozess weiter zu optimieren und effizienter zu gestalten, wurde im folgenden Abschnitt die Glucosekonzentration im Biotransformationsassay betrachtet.

Die Biotransformation erfolgt standardmäßig in Edinburgh Minimal Medium mit einer Glucosekonzentration von 2 % (v/v). Könnte die Ausbeute der Biotransformation mithilfe einer Erhöhung der Glucosekonzentration gesteigert werden, oder könnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass eine gleichbleibende Cortisolbildungsrate bei einer niedrigeren Glucosekonzentration erreicht werden kann, so würde sich der Prozess insgesamt wirtschaftlicher gestalten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Nährstoffversorgung und im Speziellen die Glucosekonzentration einen erheblichen Einfluss auf die Cortisolbildungsrate hat. Es konnte eine Aktivität bezüglich der Biotransformation von 11-Desoxycortisol zu Cortisol, gemessen an der Cortisolkonzentration nach 48 Stunden Biotransformation, in PBS Puffer mit 2 % (v/v) Glucose detektiert werden. Allerdings bleibt hier die Cortisolkonzentration mit 8 μM nach 48 Stunden deutlich hinter der Konzentration der Biotransformation in EMM mit 2 % (v/v) mit einem Wert von 23 μM zurück (Daten nicht gezeigt).

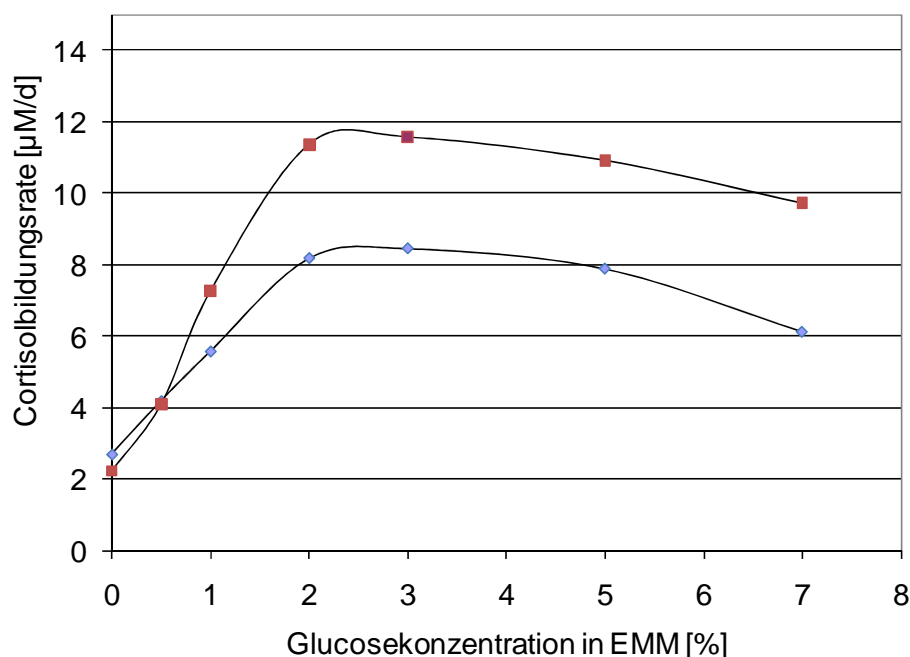


Abb. 37: Cortisolbildungsrate in Abhängigkeit von der in der Biotransformation eingesetzten Glucosekonzentration

Bei der Auswertung der Daten der Biotransformation in EMM mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen wird deutlich, dass es einen optimalen Bereich der Glucosekonzentration gibt. Liegt die Glucosekonzentration ober- oder unterhalb dieses Bereiches fällt die Bildungsrate des Cortisols deutlich ab. Die eingesetzte Glucosekonzentration im EMM sollte zwischen 2 und 4 % (v/v) liegen (siehe Abbildung 37). Ab einer Konzentration von 5 % (v/v) ist eine Reduktion der Cortisolbildung zu vermerken.

Im weiteren Verlauf der Prozessoptimierung kann somit mit der Anwendung einer Glucosekonzentration von 2 % (v/v) fortgefahren werden.

3.11.4 Variation der C-Quelle im Assay

Wie im vorhergehenden Abschnitt

3.11.3 Glucosekonzentration im Assay“ beschrieben, hat die Konzentration der C-Quelle Glucose einen erheblichen Einfluss auf die Produktivität in der Biotransformation.

Im weiteren Verlauf der Prozessoptimierung wird die C-Quelle Glucose gegen andere C-Quellen ausgetauscht. Eine bessere Verstoffwechslung einer alternativen C-Quelle, könnte zu einer Erhöhung der Aktivität in der Biotransformation führen.

Als alternative C-Quellen wurden eingesetzt: Saccharose, Glycerin und eine Gemisch aus Glycerin und Glucose. Die Mischung aus Glycerin und Glucose wurde gewählt, um den Zellen zunächst das Wachstum auf Glucose zu ermöglichen mit einer anschließenden Umstellung auf Glycerin.

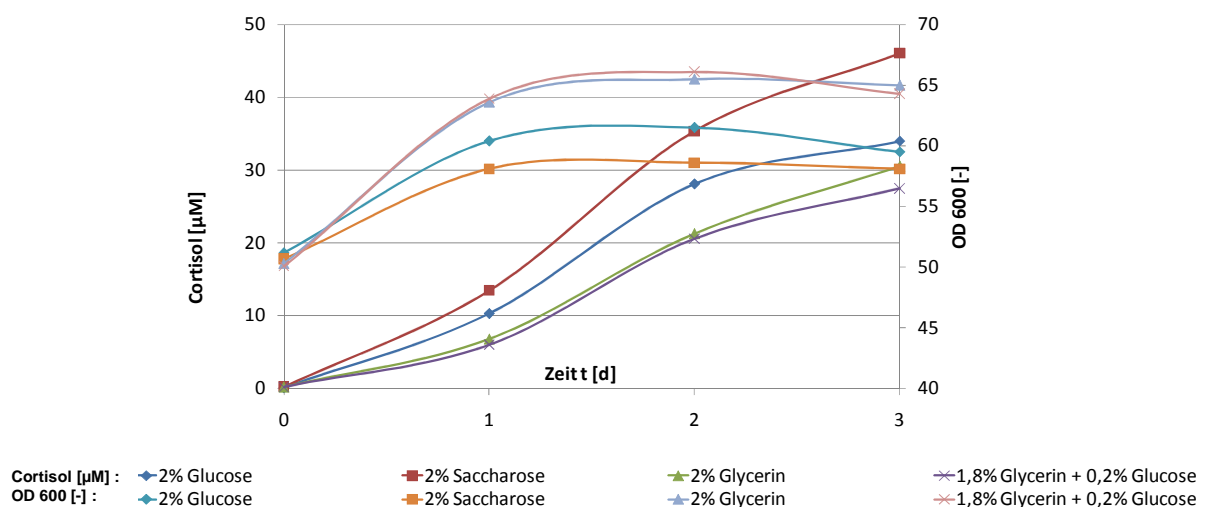


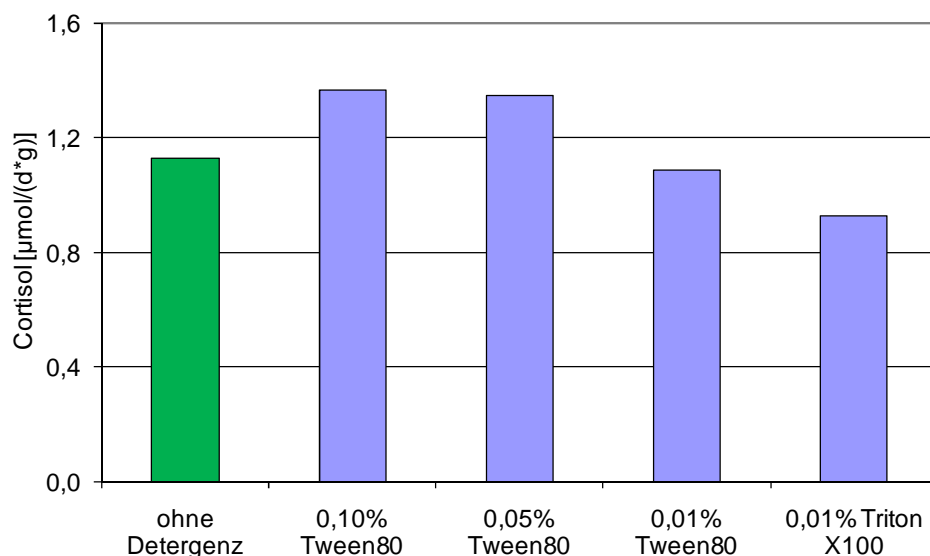
Abb. 38: Wachstum, gemessen an der OD₆₀₀ und Cortisolkonzentration des SZ1 Stammes in der Biotransformation bei dem Einsatz verschiedener C-Quellen

Wie aus Abbildung 38 ersichtlich, gibt es signifikante Unterschiede im Wachstum und der Cortisolkonzentration während der Biotransformation. So ist zu erkennen, dass das beste Wachstum, gemessen an der optischen Dichte bei 600 nm, bei dem Einsatz von 2 % (v/v) Glycerin und 1,8 % (v/v) Glycerin+ 0,2 % (v/v) Glucose erzielt wird. Die Cortisolbildung verhält sich entgegengesetzt dazu: die höchsten Cortisolkonzentrationen werden erreicht wenn 2 % (v/v) Saccharose oder 2 % (v/v) Glucose in der Biotransformation verwendet werden. Das gegenläufige Verhalten von Wachstum und Cortisolbildung lässt die Hypothese aufkommen, dass ein schlechtes Wachstum eine gute Cortisolbildung zur Folge hat. Bei der näheren Betrachtung der Cortisoldaten kann die Aussage getroffen werden, dass der bisherige Prozess, welcher den Einsatz von Glucose vorsieht, von einem Wert von 34 μM auf einen Wert von 46 μM in 72 Stunden mit dem Einsatz von Saccharose gesteigert werden kann. Dies entspricht einer Steigerung der Ausbeute um 35 %.

3.11.5 Detergenzien im Assay

Um weiterführend die Effizienz der Biotransformation zu optimieren, wurde im Folgenden Augenmerk auf die Zellmembran des *S. pombe* Stammes gelegt. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Permeabilisierung der Zellmembran zu einer Steigerung der Biotransformation führen kann (Dragan et. al.(2006)).

Der Einfluss verschiedener Detergenzien in der Biotransformation wurde getestet. Sowohl TritonX100 als auch Tween80 in verschiedenen Konzentrationen wurden ausgewählt. Dabei ist festzustellen, dass der Einsatz von TritonX100 schon bei einer eingesetzten Konzentration von 0,01 % (v/v) einen signifikanten Einfluss auf die Cortisolbildung hat. Die Cortisolbildungsrate wird bei dem Einsatz von TritonX100 um 18 % gesenkt (siehe Abbildung 39Abb).



Die Daten der Cortisolbildungsrate bei dem Einsatz von Tween80 zeigen hingegen eine andere Auswirkung. Bei einem Einsatz von 1,00 % (v/v) bzw. 0,50 % (v/v) Tween80 im Biotransformationsansatz kommt es im Ansatz zu Ausflockungen (Daten nicht gezeigt). Somit können diese Konzentrationen keine Anwendungskonzentrationen im Prozess sein. Die Konzentration 0,01 % (v/v) Tween80 hat wie TritonX100 einen negativen Einfluss auf die Cortisolbildungsrate. Bei eingesetzten 0,1 % (v/v) und 0,05 % (v/v) Tween80 zeigt sich hingegen eine Steigerung der Cortisolbildungsrate.

Mit diesen Ergebnissen, dass Tween80 in einer eingesetzten Konzentration von 0,1 % (v/v) in der Biotransformation zu einer Steigerung der Ausbeute führt, wurde weiter gearbeitet.

Nachfolgend wurde versucht, die Permeabilisierung der Zellen im Prozess noch weiter zu optimieren und die Cortisolbildungsrate zu steigern. Eine Behandlung der Zellen mit Tween80 vor der Biotransformation mit Tween80, im Folgenden Vorpermeabilisierung genannt, wurde angewendet. Bei diesem Prozessschritt wurden die Zellen, welche für die Biotransformation eingesetzt werden sollten, zunächst eine Stunde in PBS und 0,1 % Tween80 (v/v) bei 30 °C inkubiert, nachfolgend gewaschen und in der Biotransformation eingesetzt. Dieser Versuchsaufbau der Vorpermeabilisierung wird im Vergleich zu der Permeabilisierung während der Biotransformation, einer Kombination aus beiden Permeabilisierungsschritten betrachtet und dem Einsatz von keinem Detergenz.

	Cortisol [μ M]		
	Nach 24 BT	Nach 48 BT	Nach 72 BT
ohne Detergenz	13	25	35
BT 0,1 % Tween80	14	30	40
VP 0,1 % Tween80	14	31	44
VP 0,1 % Tween80 + BT 0,1 % Tween80	14	37	47

Tabelle 4: Einfluss von Tween80 als Permeabilisierungssubstanz vor und während der Biotransformation auf die Cortisolbildungsrate

Nach einer Biotransformationsdauer von 24 Stunden lassen sich noch keine signifikanten Unterschiede in der Cortisolkonzentration feststellen (siehe Tabelle 4). Betrachtet man aber die Daten nach 48 bzw. 72 Stunden so lässt sich erkennen, dass eine maßgebliche Erhöhung der Cortisolkonzentration durch den Einsatz von Tween80 in einer Konzentration von 0,1 % (v/v) erreicht werden kann. Der Einsatz des Detergenz während der Biotransformation führt zu einer Steigerung um 14 % im Vergleich zu dem Ansatz ohne Detergenz. Mit dem Einsatz der Vorpermeabilisierung kann die Cortisolkonzentration noch weiter gesteigert werden. Ein Zugewinn von 26 % lässt sich dadurch erzielen. Mithilfe der

Kombination aus beiden Prozessschritten, Vorpermeabilisierung und Permeabilisierung während der Biotransformation, lässt sich jedoch die höchste Steigerung der Cortisolkonzentration erzielen. Eine Zunahme um 34 % im Vergleich mit dem Assay ohne Detergenz lassen sich mit dieser Methode erreichen.

3.11.6 Zellzustand für die Biotransformation

Auch der Zustand der Zellen kann einen erheblichen Einfluss auf die Aktivität in der Biotransformation haben. Daher wurden Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen geerntet und jeweils in der Biotransformation eingesetzt. Um den Assay vergleichbar zu halten, wurde in jedem Ansatz jeweils die gleiche Menge an Biomasse eingesetzt.

Die Analyse der Cortisolkonzentration nach 72 Stunden Biotransformation zeigt deutlich, dass signifikante Unterschiede zwischen der Produktivität der Zellen aus den unterschiedlichen Phasen bestehen.

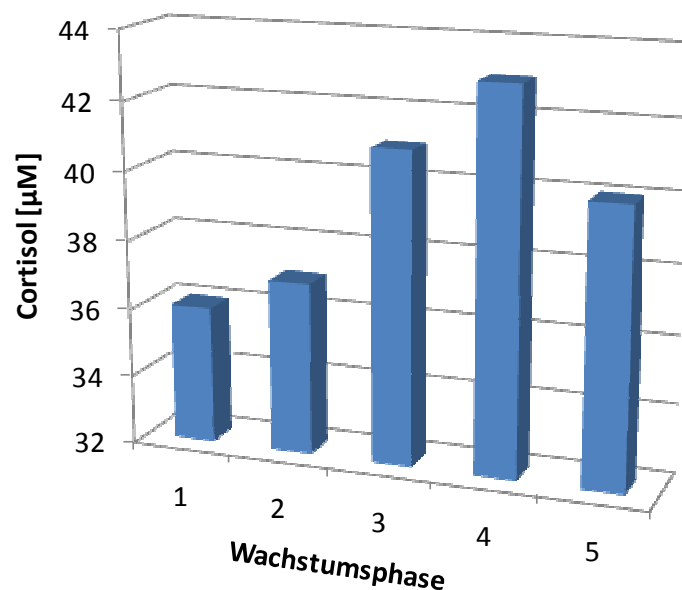


Abb. 40 Einfluss der Wachstumsphase der Zellen für die Biotransformation

1: exponentielle Phase 2: spät exponentielle Phase 3: frühe stationäre Phase 4: stationäre Phase
5: spät stationäre Phase

Es lässt sich feststellen, dass Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase eine deutlich schlechtere Cortisolbildungsrate aufweisen als Zellen aus der stationären Phase (siehe Abbildung 40Abb). Innerhalb der stationären Phase lassen sich auch deutliche Unterschiede

detektieren. Zellen aus der späten stationären Phase haben im Vergleich zu Zellen aus der mittleren stationären Phase eine abnehmende Aktivität bezüglich des Umsatzes des 11-Deoxycortisol zu Cortisol. Der Erntezeitpunkt ist somit wichtig und ausschlaggebend für die Cortisolbildungsrate und die Ernte sollte stets in der stationäre Wachstumsphase des SZ1 Stammes erfolgen.

3.11.7 Exkretion und Verteilung des Cortisols

Für die Steigerung der Ausbeute des Prozesses und damit der Ökonomie des Prozesses ist es wichtig zu wissen, in welchen Kompartimenten der Extraktionsprobe sich wie viel Produkt befindet. Die Teile extrazelluläres Produkt, intrazelluläres Produkt und zellassoziertes Produkt werden im Folgenden unterschieden.

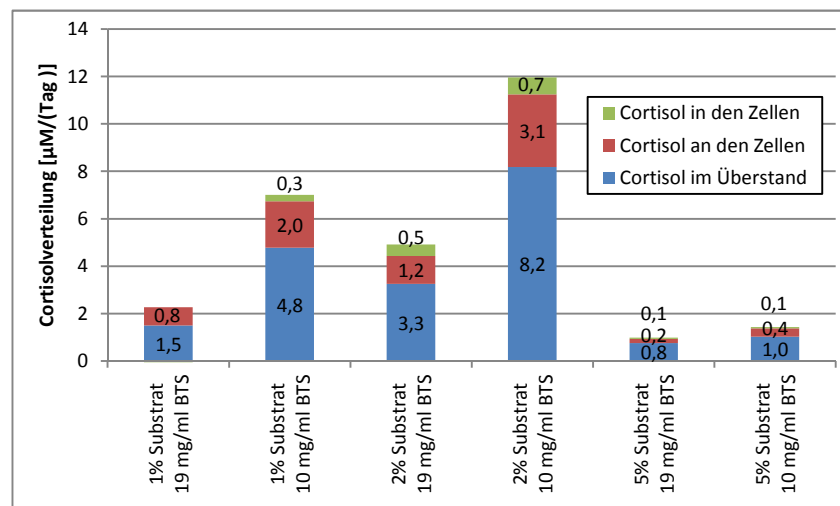


Abb. 41: Verteilung des Cortisol. Dargestellt ist die Verteilung des produzierten Cortisol in die Segmente: intrazelluläres Cortisol, extrazelluläres Cortisol und zellassoziertes Cortisol. Die produzierte Menge Cortisol wird in μM pro Tag in Abhängigkeit der eingesetzten Substratmenge und Zellmasse in der Biotransformation angegeben.

Die Ergebnisse, die in Abbildung 41 Abbdargestellt sind, zeigen, dass die Hauptmenge des Produktes in dem Überstand der Extraktionsprobe vorhanden ist. Der Downstream Process sieht derzeit eine Extraktion der Biotransformationskultur ohne Aufschluss oder Permeabilisieren der Zellen vor. Es wird davon ausgegangen, dass während der Extraktion die Zellen nicht lysieren und somit nur das zellassozierte und extrazelluläre Cortisol gewonnen werden kann.

Circa 95 % des Cortisol wird durch diese Methode aus dem Prozess gewonnen. Ein Zellaufschluss zeigt, dass sich nur circa 5 % des gesamten Cortisols noch in der Zelle

befinden. Somit kann der Prozess der Exkretion des Cortisols als ausgeprägt und für den Prozess optimal angesehen werden.

Unter Verwendung der zuvor gewonnenen Erkenntnisse ist aus ökonomischer Sicht eine Erhöhung der Durchlässigkeit der Membran durch Permeabilisieren oder ein Zellaufschluss aufgrund des geringen Zugewinns von 5 % Cortisol für die Gewinnung nicht nötig.

3.11.8 Betrachtung der spezifischen Bildungsrate

Wichtig für die Effizienz, die Wirtschaftlichkeit und auch die Ökoeffizienz ist die Betrachtung der spezifischen Bildungsrate des SZ1 Stammes.

In der folgenden Untersuchung wurde unterschiedlich viel Biomasse in den Biotransformationsansatz gegeben. Die Analyse der Cortisolkonzentration nach 72 Stunden zeigt, dass die absolute Menge des Cortisol mit steigender Biomasse im Assay steigt (Daten nicht gezeigt). Bei der weiteren Verarbeitung der Daten wird jedoch deutlich, dass die spezifische Cortisolbildungsrate mit zunehmender Biomasse deutlich sinkt (siehe Tabelle 5).

Cortisol [$\mu\text{mol}/(\text{d}\cdot\text{g})$]	6,2	4,8	3,6	2,9	2,2	2,1	1,8	1,6	1,4
OD₆₀₀ im BT-Ansatz	4	8	15	22	30	35	42	48	63

Tabelle 5: Spezifische Cortisolbildungsrate bei dem Einsatz unterschiedlicher Mengen an Biomasse im Assay

Bei einer Produktion von Cortisol im größeren Maßstab sollten diese Ergebnisse noch einmal herangezogen werden, um einen wirtschaftlichen Prozess durchzuführen.

4. Ökoeffizienzanalyse

Die SHE-Bewertung (Sicherheit, Gesundheit, Umwelt) wurde im Rahmen eines Unterauftrages von Elmar Heinzle und Konstantin Schneider, (Technische Biochemie, Universität des Saarlandes) durchgeführt.

Wie später bei der Beschreibung der Bewertungsmethode etwas detaillierter ausgeführt, beruhen ökologische Bewertungen auf Stoffbilanzen der Ein- und Ausgangsströme und einer entsprechenden Wichtung der Stoffe nach Sicherheits-, Gesundheits- und Umweltkriterien (SHE). Ökologische Bewertungen zum Projekt wurden nach Möglichkeit auf der Basis von experimentellen Daten oder gut dokumentierten Literaturdaten durchgeführt. Dies betrifft insbesondere die Herstellung von 6 β -Hydroxytestosteron, wozu bereits zum Zwischenbericht experimentelle Daten und Literaturdaten zur Verfügung standen. Da im Falle der Herstellung von Cortisol die tatsächlich erhaltenen Resultate nicht den Erwartungen entsprachen, konnten die experimentellen Daten nicht für eine ökologische Bewertung eingesetzt werden. Es wurde jedoch eine solche mit Literaturdaten und mit Erwartungswerten nach einer weitergehenden Optimierung, die nicht mehr innerhalb dieses Projekts durchgeführt werden kann, erstellt. Da die beiden Prozesse technisch sehr ähnlich ablaufen würden, konnte mit einem Modell sowohl die Produktion von 6 β -Hydroxytestosteron als auch von Cortisol dargestellt werden, allerdings mit jeweils angepassten Parametern.

4.1. Ökologische Bewertung – Herstellung von 6 β -Hydroxytestosteron

Die Bewertung wurde mit den zum Projektstand 2009 verfügbaren Daten durchgeführt, wobei auch ein chemischer Prozess zum Vergleich herangezogen werden konnte. Die Daten zum chemischen Prozess stammten aus der Literatur (Schänzer et al., 1995).

Die daraus erstellten Stoffbilanzen erlauben einen Einblick in die damit verbundenen Risikopotentiale in den Bereichen Gesundheit, Sicherheit und Umweltschutz (SHE). Da es sich um Laborverfahren handelt, besteht entsprechend ein Potential zur Optimierung dieser Synthesestufen hinsichtlich Produktqualität, Produktivität aber auch SHE-Aspekten. In beiden Prozessen (biotechnologisch und chemisch) fällt die klare Dominanz der Lösungsmittel auf (Abb. 42). Die Reduktion des Einsatzes der Lösungsmittel wäre aus SHE-Sicht zunächst anzustreben. Dies ist allerdings nur dann sinnvoll, wenn Produktqualität und –ausbeute nicht in signifikantem Maße vermindert werden. Es existieren auch klare physikalische Grenzen durch die geringe Löslichkeit des Produkts in einem Teil der Lösungsmittel.

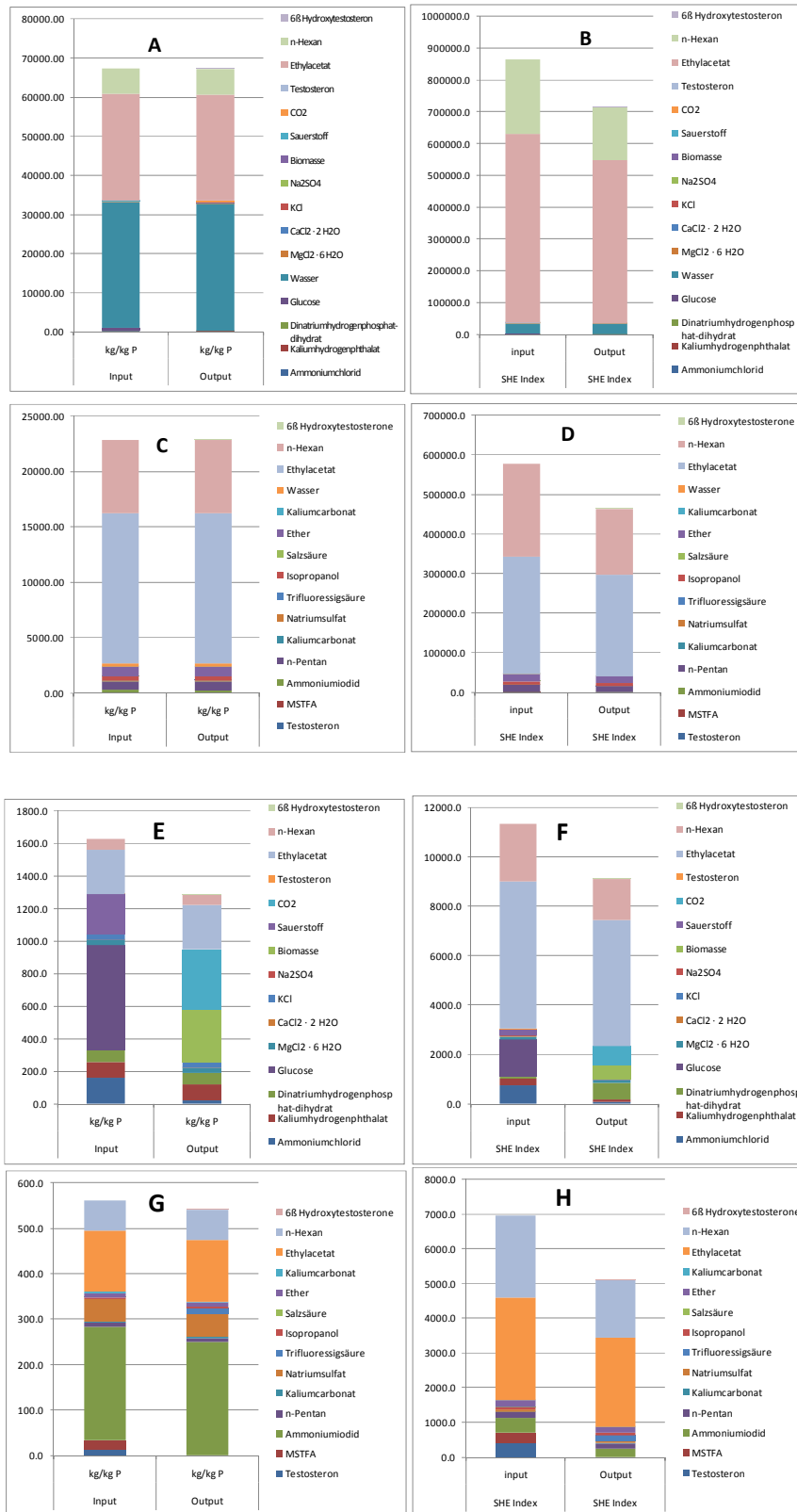


Abb. 42: Produktion von 6β-Hydroxytestosteron. Massenindices (jeweils linke Abbildung) und Umweltindices (jeweils rechte Abbildung, Index-Input – linker Balken; Index-Output – rechter Balken) für einzelne Synthesestufen. (Berechnungsmethode Heinzle et al., 2006). A,B,E,F – biotechnologische Herstellung; C,D,G,H – chemische Produktion. A,C,E,G – Massenindices; B,D,F,H – Umweltindices (SHE). A-D – alle Stoffe; E-H – ohne Wasser, 99% Recycling aller Lösungsmittel.

Das Recycling der Lösungsmittel durch Destillation stellt einen gangbaren Weg für die Reduktion Lösungsmittelverbrauchs und der damit verbundenen Umweltbelastung dar. Für später realisierte Prozesse wären entsprechende Schutzmaßnahmen zu treffen, was in einer ökonomische Analyse entsprechend zu berücksichtigen wäre.

A-Bewertungen von Stoffen treten insbesondere bei Lösungsmitteln und bei Schwermetallsalzen auf. Dies ist in der chemischen Produktion ausgeprägter, Lösungsmittel kommen aber auch in der biotechnologischen Produktion in der Aufarbeitung vor und sind aus ökologischer Sicht dort auch die kritischsten Stoffe, deren Bedeutung aber in späteren Prozessentwicklungsphasen durch optimierte Rückführung gemindert werden kann. Ökologisch und ökonomisch gesehen wäre der beste Fortschritt durch eine erhöhte Produktkonzentration zu erzielen, was technisch wegen der geringen Löslichkeit beschränkt ist. Dadurch würden sich die benötigten Lösungsmittelmengen entsprechend reduzieren und man könnte bei den Investitionskosten durch kleinere Apparate wesentlich sparen. Insgesamt kann man aus der durchgeführten Analyse beim vorliegenden Entwicklungsstand keine eindeutigen Vorteile des biotechnologischen gegenüber dem chemischen Verfahren erkennen.

4.2. Ökologische Bewertung – Herstellung von Cortisol aus 11-Deoxycortisol

In einer zweiten Projektphase wurde insbesondere die biotechnologische Herstellung von Cortisol näher betrachtet, da dieser Prozess im Falle der Realisierung von der Menge her die größte Bedeutung hätte. Die aus den Experimenten verfügbaren Daten zeigen, dass zwar im Projektverlauf eine klare Verbesserung der Ausbeuten und Umsätze erreicht werden konnte, jedoch gelang es nicht, einen quantitativen Umsatz zu erreichen, was eine notwendige Voraussetzung für einen technischen Prozess darstellt. Wie man aus der folgenden Analyse sehen kann, sind die erreichten Endkonzentrationen an Cortisol ein wesentlicher Faktor in der ökologischen Bewertung. Höhere Produktkonzentrationen vermindern den notwendigen Einsatz von Lösungsmitteln beinahe proportional, so dass im Wesentlichen das Umweltgefährdungspotential vermindert würde. Im gegebenen Fall wurde im ersten Fall eine Produktendkonzentration von 0.3 mg/L erreicht. Diese konnte nach der Weiterentwicklung und Optimierung des Prozesses zunächst auf 6.9 mg/L und danach sogar auf 13.4 mg/L gesteigert werden. Das entspricht einer Verbesserung des Umweltgefährdungspotentials um einen Faktor von ca. 20 im ersten Schritt und danach nochmals um den Faktor 2. Es wurden also klare Entwicklungsfortschritte erzielt, die jedoch noch nicht für eine kommerzielle Umsetzung ausreichen.

Für die folgenden Berechnungen wurde angenommen, dass wichtige Ziele nach weiteren Forschungs- und Entwicklungsarbeiten erreicht wären. Es wurde angenommen, dass in der Biotransformation ein Umsatz von 95% erreicht werden kann, wobei das Substrat in Ethanol gelöst eingesetzt wird und zwar so, dass die Löslichkeitsgrenze gerade nicht erreicht wird (Abb. 43).

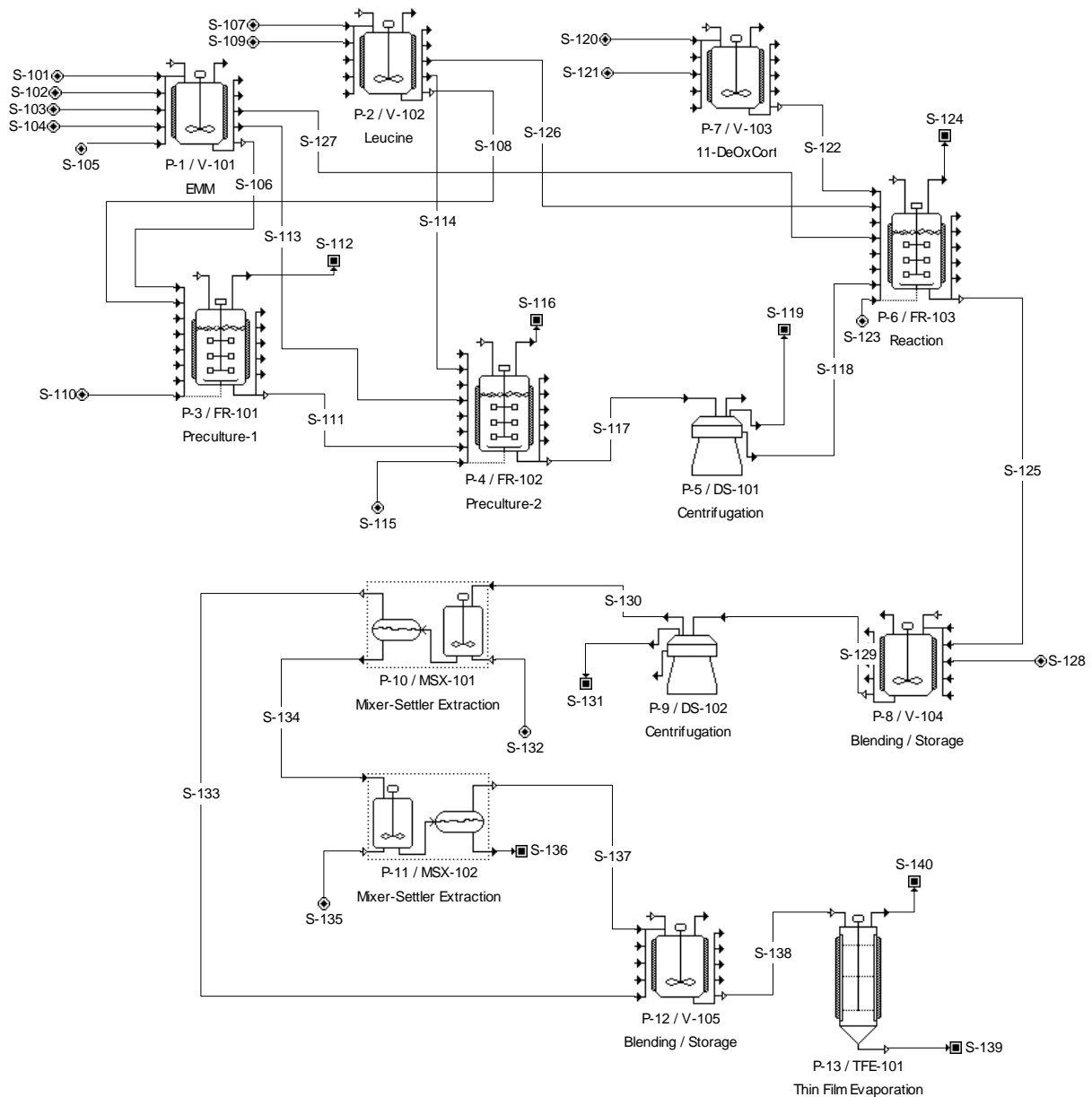


Abb. 43: Produktion von Cortisol und Extraktion mit Ethylacetat und Hexan.

Die Nährmedien werden in zwei Tanks bereitgestellt (EMM in P1/V101; Leucin in P2/V102). In einem weiteren wird die ethanolische Lösung von 11-Deoxycortisol vorgelegt (P-7/V103).

In zwei Stufen wird die Kultur angezüchtet (Preculture-1, P-3/FR101; Preculture-2, P-4/FR102). Nach Abzentrifugation (P-5, PS101) werden die Zellen in neuem Medium suspendiert und die ethanolische Lösung von 11-Deoxycortisol wird zudosiert (P-6, FR103) und entsprechend umgesetzt. Nach der Extraktion mit Ethylacetat in P-8 (95%) wird die wässrige Phase mit den Zellen abgetrennt (P-9, DS102). Danach wird in zwei Stufen das Produkt zusammen mit dem nicht reagierten 11-Deoxycortisol mit Hexan extrahiert (P-10/MSX101 und P-11/MSX102) und schließlich nach Vereinigung in P-12/V105 in einem Dünnschichtverdampfer (P-13/TFE101) eingetrocknet.

Die Massenbilanz dieses Prozesses (Abb. 44A) zeigt, dass Wasser, Luft gefolgt von den beiden Lösungsmitteln klar dominieren. Nach einer SHE-Wichtung zeigt sich die klare Dominanz der Lösungsmittel bei den Öko-Indexpunkten (Abb. 44B). Man kann nun in einem weiteren Schritt davon ausgehen, dass Wasser und Luft eigentlich nicht verbraucht werden. Werden entsprechend Wasser und Luft in der Ökobilanz nicht berücksichtigt, dann sieht man in der Massenbilanz noch klarer die Bedeutung der Lösungsmittel (Abb. 44C), die nun klar die Massenbilanz dominieren. Nach der SHE-Wichtung verschwinden alle anderen Komponenten praktisch ganz und alleine Hexan und Ethylacetat beherrschen das Bild (Abb. 44D). Nimmt man an, dass 95% der Lösungsmittel aus S-136 und S-140 nach Destillation rückgeführt werden können, so treten auch andere Stoffe wie CO₂ und die Biomasse hervor (Abb. 44E). Nach ökologischer Wichtung bleiben auch in diesem Falle die Lösungsmittel klar dominierend.

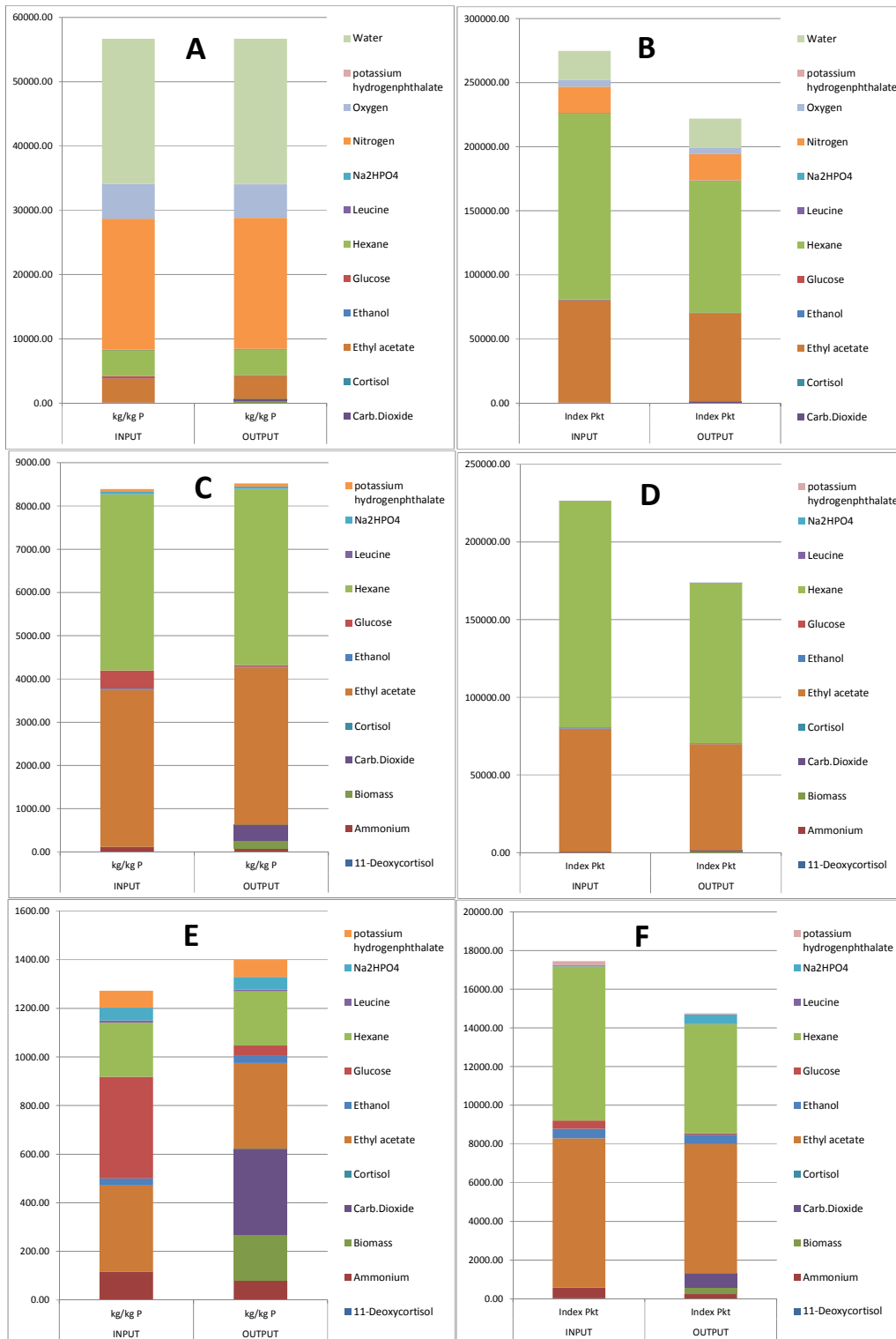


Abb. 44: Produktion von Cortisol. Massenindices (jeweils linke Abbildung) und Umweltindices (jeweils rechte Abbildung, Index-Input – linker Balken; Index-Output – rechter Balken). (Berechnungsmethode Heinzle et al., 2006). A,B – Gesamtbilanz; C,D – Bilanz ohne Luft und Wasser. E,F – Bilanz bei 95% Recycling der Lösungsmittel Ethylacetate und Hexan.

Nach einer SHE-Bewertung zeigt sich die klare Dominanz der Lösungsmittel (Abb. Öko3-B). Werden Wasser und Luft nicht berücksichtigt, dann sieht man in der Massenbilanz noch

klarer die Bedeutung der Lösungsmittel. Nach der SHE-Wichtung verschwinden alle anderen Komponenten (Abb. 44D). Nimmt man an, dass 95% der Lösungsmittel aus S-136 und S-140 nach Destillation rückgeführt werden können, so treten auch andere Stoffe wie Glucose und Ammonium und im geringeren Maße die Puffersubstanzen im Input und CO₂ und Biomasse sowie die Puffersubstanzen beim Output hervor (Abb. 44E). Nach ökologischer Wichtung bleiben auch in diesem Falle die Lösungsmittel klar dominierend (Abb. 44F), wobei auch Ethanol klar hervortreten, während Ammonium und die Puffer relativ an Bedeutung verlieren. Durch einen höheren Rückführungsgrad der Lösungsmittel könnte die Situation entsprechend verbessert werden, wobei ab einem bestimmten Punkt die ökologischen Nachteile durch den erforderlichen höheren Energieeinsatz die Vorteile durch geringeren Lösungsmittelbedarf bzw. geringere Lösungsmittelbelastung überwiegen würden.

Die aus dieser Analyse ergebenden Schlüsse für die weitere Prozessentwicklung sind analog denen bei der Produktion von 6 β -Hydroxytestosteron: Erhöhung der Produktausbeute und verstärktes Lösungsmittelrecycling. Eine Verbesserung könnte man auch in der Extraktion durch einen Gegenstrombetrieb z.B. mit einem Podbelniak-Extraktor erreichen. Dadurch könnten die Verluste bei der Extraktion vermindert werden, wodurch sich entsprechend die Produktmenge erhöhen würde. Außer den Lösungsmitteln treten bei diesem Prozess aber klar keine besonders kritischen Stoffe auf, was gegenüber chemischen Verfahren klar von Vorteil ist.

4.3. Ökologische Bewertung – Methode

Bei frühen Bewertungen von Prozessen stehen insbesondere das umfassende Erkennen potentiell kritischer Aspekte und das Aufzeigen und die Bewertung von Optimierungspotenzialen im Zentrum (Heinzle und Hungerbühler, 1997). Eine erste Betrachtung konzentriert sich auf den Einsatz kritischer Stoffe. In dieser frühen Phase der Entwicklung wird zur SHE-Bewertung die Methode von Heinzle et al. (2006) eingesetzt, die eine Bewertung auf der Basis von Stoffbilanzen und gut verfügbaren SHE-Merkmalen der eingesetzten und soweit bekannt auch der gebildeten Stoffe erlaubt. Für die Stoffe wurde zunächst eine ABC-Einstufung durchgeführt (Siehe Tabelle 6). Wie in Heinzle et al. (2006) und in früheren Arbeiten (Heinzle et al., 1998; Biber und Heinzle, 2004) ausführlich dargestellt, handelt es dabei um Risikopotentiale und nicht um die mit einem späteren Prozess tatsächlich verbundenen Risiken. Diese können ja einerseits durch technische Verbesserungen wie Änderung der Einsatzstoffe oder der Lösungsmittel, andererseits durch Änderung der Prozessführung oder durch den Einsatz von Schutzmaßnahmen eventuell wesentlich vermindert werden. Tabelle 6 enthält die ermittelten ABC-Klassifizierungen der

eingesetzten Stoffe. Die Einstufung erfolgt dabei durchgängig mit den Daten der reinen Stoffe. In Tabelle 7 sind die aus den Daten von Tabelle 6 errechneten ökologischen Wichtungsfaktoren für Input und Output aufgelistet. Durch Multiplikation der Stoffströme mit diesen Wichtungsfaktoren erhält man eine erste Quantifizierung der SHE-Risiken (Abb. 42).

4.4. Fazit aus der ökologischen Bewertung

In allen betrachteten Verfahren, chemisch wie biotechnologisch muss den Lösungsmitteln das größte Umweltgefährdungspotential zugewiesen werden. Lösungsmittel müssen aus heutiger Sicht auf jeden Fall eingesetzt werden. Durch die geringe Löslichkeit und die nicht so günstigen Verteilungskoeffizienten sind die benötigten Mengen auch sehr groß. Den physikalisch bedingten Grenzen könnte man vor allem durch möglichst hohe Produktkonzentrationen am Ende des Prozesses näher kommen. Bei der Herstellung von 6 β -Hydroxytestosteron kann durch die durchgeführte Analyse kein eindeutiger ökologischer Vorteil durch das biotechnologische Verfahren gegenüber dem chemischen abgeleitet werden. In zweiter Priorität bietet sich zur Verbesserung ein verstärktes Recycling der Lösungsmittel an, was aber durch den damit verbundenen erhöhten Energiebedarf und die damit verbundene Umweltbelastung auch auf Grenzen stößt. Durch die Prozessverbesserung beim Cortisolprozess konnte aus ökologischer Sicht eine klare Verbesserung um einen Faktor von ca. 40 erreicht werden, jedoch ist beim bisher erreichten Entwicklungsstand die Produktqualität bedingt durch den geringen Umsatz und die schwierige Abtrennung des chemisch ähnlichen Edukts noch nicht ausreichend.

Tabelle 6: Stoffe und ihre ABC-Einstufung bezüglich SHE-Risiken gemäß Heinze *et al.* (2006)

Name	CAS-#	Complexität	Land	Reichweite	ThermRisiko	Akutox	ChronTox	BioRisiko	EcoTox	GWP	ODP	AP	PECP	Geruch	NutrPot	#A	#B
11-deoxycortisol	152-58-9	B	A	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C	1	3
11-deoxycortisol	152-58-9	B	A	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C	1	3
air	RR-4-1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	0
ammonium chloride	12125-02-9	B	C	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C	0	3
ammonium iodide	12027-06-4	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	1
biomass	biomass	C	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	0	2
calcium chloride	10043-52-4	C	C	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C	0	2
carbon dioxide	124-38-9	C	C	C	C	C	C	C	C	B	C	C	C	C	C	0	1
copper sulfate pentahydrate	7758-99-8	C	C	B	C	A	A	C	A	C	C	C	C	C	C	3	1
cortisol	50-23-7	B	A	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C	0	2
diethyl ether	60-29-7	C	C	B	A	B	B	C	C	C	C	C	A	B	C	2	4
di-sodium hydrogen phosphate dihydrate	10028-24-7	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	1	0
ethanol	64-17-5	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C	C	A	B	C	2	1
ethyl acetate	141-78-6	B	C	B	A	B	B	C	C	C	C	C	A	B	C	2	5
ethyl oleate	111-62-6	C	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	1
glucose	14431-43-7	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	0	1
hexane	110-54-3	C	C	B	A	B	A	C	C	C	C	C	C	C	C	2	2

hydrochloric acid	7647-01-0	B	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C	C	A	C	2	1
isopropanol	67-63-0	C	C	B	A	B	B	C	C	C	C	C	A	B	C	2	4
L-Leucine	61-90-5	C	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	1
magnesium sulfate	7487-88-9	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	1
magnesium sulfate (heptahydrate)	10034-99-8	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	1
molybdate	7782-91-4	C	C	B	C	B	A	C	C	C	C	C	C	C	C	1	2
MSTFA, N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-2,2,2-trifluoroacetamid	24589-78-4	A	C	B	B	B	B	C	A	C	C	C	C	C	C	1	3
nitrogen	7727-37-9	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	0
oxygen	7782-44-7	C	C	C	C	B	A	C	C	C	C	C	C	C	C	1	1
pentane	109-66-0	C	C	B	A	B	B	C	C	C	C	C	A	C	C	2	3
potassium carbonate	584-08-7	C	C	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C	0	2
potassium hydrogenphthalate	877-24-7	B	C	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	2
Potassium iodide	7681-11-0	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	0
Sodium chloride	7647-14-5	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	0
trifluoroacetic acid	76-05-1	C	C	B	C	A	B	C	C	C	C	C	C	C	C	1	2
water	7732-18-5	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0	0
zinc sulfate heptahydrate	7733-02-0	C	C	C	C	A	B	C	A	C	C	C	C	C	C	2	1

Tabelle 7: Input und Output Wichtungsfaktoren für Sicherheit, Gesundheit und Ökologie (SHE)
(Heinzle et al., 2006)

Name	CAS	Input-SHE	Output-SHE
11-deoxycortisol	152-58-9	19.1	3.1
air	RR-4-1	1.0	1.0
ammonium chloride	12125-02-9	4.7	3.1
ammonium iodide	12027-06-4	1.7	1.0
biomass	Biomass	2.3	1.8
calcium chloride	10043-52-4	3.9	3.1
carbon dioxide	124-38-9	1.0	2.1
copper sulfate pentahydrate	7758-99-8	34.3	33.5
cortisol	50-23-7	19.1	3.1
diethyl ether	60-29-7	21.1	18.9
di-sodium hydrogen phosphate dihydrate	10028-24-7	1.0	9.7
di-sodium hydrogen phosphate dihydrate	10028-24-7	1.0	9.7
ethanol	64-17-5	17.1	16.8
ethyl acetate	141-78-6	21.9	18.9
ethyl oleate	111-62-6	2.3	1.0
glucose	14431-43-7	1.0	1.8
hexane	110-54-3	35.8	25.3
hydrochloric acid	7647-01-0	17.8	16.4
isopropanol	67-63-0	21.1	18.9
L-Leucine	61-90-5	2.3	1.0
magnesium sulfate	7487-88-9	1.7	1.0
magnesium sulfate (heptahydrate)	10034-99-8	1.7	1.0
molybdate	7782-91-4	19.7	13.7
MSTFA, N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-2,2,2-trifluoroacetamid	24589-78-4	14.5	13.5
nitrogen	7727-37-9	1.0	1.0
oxygen	7782-44-7	18.6	13.7
pentane	109-66-0	21.1	18.5
potassium carbonate	584-08-7	3.9	3.1
potassium hydrogenphthalate	877-24-7	2.8	1.0
potassium iodide	7681-11-0	1.0	1.0
sodium chloride	7647-14-5	1.0	1.0
trifluoroacetic acid	76-05-1	19.7	13.7
water	7732-18-5	1.0	1.0
zinc sulfate heptahydrate	7733-02-0	18.6	22.9

5. Patente

Im Rahmen des Projektes wurden bisher keine Patentanmeldungen vorgenommen.

6. Veröffentlichungen

Im Rahmen des Projektes entstanden bisher die folgenden Originalarbeiten:

1. Peters FT, Dragan CA, Schwaninger AE, Sauer C, Zapp J, Bureik M & Maurer HH (2009) Use of fission yeast heterologously expressing human cytochrome P450 2B6 in biotechnological synthesis of the designer drug metabolite N-(1-phenylcyclohexyl)-2-hydroxyethanamine. *Forensic Sci Int* **184**, 69-73.
2. Peters FT, Dragan CA, Kauffels A, Schwaninger AE, Zapp J, Bureik M & Maurer HH (2009) Biotechnological synthesis of the designer drug metabolite 4'-hydroxymethyl-alpha-pyrrolidinohexanophenone in fission yeast heterologously expressing human cytochrome P450 2D6--a versatile alternative to multistep chemical synthesis. *J Anal Toxicol* **33**, 190-7.
3. Zehentgruber D, Dragan CA, Bureik M & Lütz S (2010) Challenges of steroid biotransformation with human cytochrome P450 monooxygenase CYP21 using recombinant *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biotechnol* **146**, 179-185.
4. Dragan, C. A., Peters, F. T., Bour, P., Schwaninger, A. E., Schaan, S. M., Neunzig, I., Widjaja, M., Zapp, J., Kraemer, T., Maurer, H. H., & Bureik, M. (2011) Convenient Gram-Scale Metabolite Synthesis by Engineered Fission Yeast Strains Expressing Functional Human P450 Systems. *Appl Biochem Biotechnol* **163**, 965-980.
5. Neunzig, I., Dragan, C. A., Widjaja, M., Schwaninger, A. E., Peters, F. T., Maurer, H. H., & Bureik, M. (2011) Whole-cell Biotransformation Assay for Investigation of the Human Drug Metabolizing Enzyme CYP3A7. *Biochim Biophys Acta* **1814**, 161-167.
6. Neunzig, I., Göhring, A., Drägan, C. A., Zapp, J., Peters, F. T., Maurer, H. H. & Bureik, M. (in revision) Production and NMR analysis of the human ibuprofen metabolite 3-hydroxyibuprofen. *J Biotechnol*

Drei weitere Manuskripte befinden sich zur Zeit kurz vor der Fertigstellung:

7. Tarek Hakki & Rita Bernhardt: Molecular evolution of human cytochromes P450 in recombinant fission yeast.
8. Ina Neunzig, Maria Widjaja, Călin-Aurel Drăgan, Frank T. Peters, Hans H. Maurer and Matthias Bureik: Engineering human CYP3A enzymes by combination of activating polymorphic variants.
9. Tarek Hakki, Sami A. Khalid, Rita Bernhardt. Recombinant fission yeast for the investigation of human metabolism-based drug-drug interactions.

Weiterhin wurden folgende Dipl.- bzw. Dr.-Arbeiten auf dem Projektgebiet angefertigt:

1. Doktorarbeit Daniela Zehentgruber (Okt 2010): Biotransformationen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen.
2. Diplomarbeit Ina Kielinger (Feb 2009): Heterologe Expression von humanem CYP3A7 und dessen Variante CYP3A7*2 in *Schizosaccharomyces pombe*.
3. Masterarbeit Maria Widjaja (Feb 2010): *Design of Experiment* (DoE) für Ganzzell-Biotransformation mit rekombinanten Spalthefen.
4. Doktorarbeit Ina Neunzig geb. Kielinger (läuft noch).
5. Doktorarbeit Maria Widjaja (läuft noch).

7. Präsentationen

Vorträge auf Konferenzen:

- Călin-Aurel Drăgan, Frank T. Peters, Rita Bernhardt, Hans H. Maurer & Matthias Bureik: Cytochrome P450-dependent biotransformations using recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Bioperspectives 2008 (Hannover).
- Matthias Bureik & Rita Bernhardt: Human Cytochromes P450 and Cancer: Beyond Aromatase. 13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine 2008 (Kreta).
- Matthias Bureik, Călin-Aurel Drăgan, Hans H. Maurer, Ina Neunzig, Maria Kristina Parr, Frank T. Peters, Wilhelm Schänzer, Nils Schlörer, Andrea Schwaninger, Maria

Widjaja & Andy Zöllner: Production of human cytochrome P450 (CYP) metabolites using recombinant fission yeast. BIT's Inaugural Symposium on Enzymes & Biocatalysis 2010 (Shanghai).

- Matthias Bureik, Daniela Buchheit, Julia Maria Naumann, Ina Neunzig & Călin-Aurel Drăgan: Production of Human Drug Metabolites Up to 100g Scale Using Recombinant Fission Yeast. BIT's 8th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology 2010 (Beijing).

Am 3.9.2008 wurde eine **Pressemitteilung** mit dem Titel „Eine halbe Million Euro für effizientere biotechnologische Produktionsverfahren“ von der Universität des Saarlandes veröffentlicht.

Außerdem wurde ein Beitrag für BioChemTec Reviews erstellt und publiziert.

8. Literaturverzeichnis

Biwier A, Heinzle E (2004) Environmental Assessment in Early Process Development. J Chem Technol Biotechnol, 79:597–609

Chang SY, Li W, Traeger SC, Wang B, Cui D, Zhang H, Wen B, Rodrigues AD (2008) Confirmation that cytochrome P450 2C8 (CYP2C8) plays a minor role in (S)-(+)- and (R)-(-)-ibuprofen hydroxylation in vitro. Drug Metab Dispos 36(12): 2513-2522

Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E, Bienstock RJ, Mohrenweiser HW, Goldstein JA (2001) Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. J Pharmacol Exp Ther 299(3): 825-831

Dragan C, Blank L, Bureik M (2006) Increased TCA cycle activity and reduced oxygen consumption during cytochrome P450-dependent biotransformation in fission yeast. Yeast 11:779-794

Fenske M (1995) Rapid and efficient method for extraction and separation of glucocorticosteroids and sex steroids from urines. J. Chromatogr. B. Biomed Appl. 18;670(2):373-5

Guengerich FP, Wu ZL, Bartleson CJ (2005) Function of human cytochrome P450s: characterization of the orphans. Biochem Biophys Res Commun. 338(1):465-9

Heinzle E, Biwier A, Eissen M, Abdul Kholiq M (2006) Bewertung biotechnologischer Prozesse in frühen Phasen der Entwicklung hinsichtlich Risiken bezüglich Ökologie, Sicherheit und Gesundheit. Chemie Ing. Tech., 78:301-305

Heinzle E, Hungerbühler K (1997) Integrated process development: The key to future production of chemicals. Chimia 51:176-183

- Heinze E, Weirich D, Brogli F, Hoffmann V, Koller G, Verduyn MA, Hungerbühler K (1998) Ecological and Economic Objective Functions for Screening in Integrated Development of Fine Chemical Processes. I. Flexible and Expandable Framework Using Indices. *Ind. Eng. Chem. Res.* 37, 3395-3407
- Kepp DR, Sidelmann UG, Tjornelund J, Hansen SH (1997) Simultaneous quantitative determination of the major phase I and II metabolites of ibuprofen in biological fluids by high-performance liquid chromatography on dynamically modified silica. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 696(2): 235-241
- Lang C, Looman AC (1995) Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44 (1-2):147-56
- Lathia C, Lettieri J, Cihon F, Gallentine M, Radtke M, Sundaresan P (2006) Lack of effect of ketoconazole-mediated CYP3A inhibition on sorafenib clinical pharmacokinetics. *Cancer Chemother Pharmacol* 57(5): 685-692
- Marill J, Cresteil T, Lanotte M, Chabot GG (2000) Identification of human cytochrome P450s involved in the formation of all-trans-retinoic acid principal metabolites. *Mol Pharmacol* 58(6): 1341-1348
- Ohmori S, Nakasa H, Asanome K, Kurose Y, Ishii I, Hosokawa M, Kitada M (1998) Differential catalytic properties in metabolism of endogenous and exogenous substrates among CYP3A enzymes expressed in COS-7 cells. *Biochim Biophys Acta* 1380(3): 297-304
- Rodriguez-Antona C, Jande M, Rane A, Ingelman-Sundberg M (2005) Identification and phenotype characterization of two CYP3A haplotypes causing different enzymatic capacity in fetal livers. *Clin Pharmacol Ther* 77(4): 259-270
- Schänzer W, Horning S, Donike M (1995) Metabolism of anabolic steroids in humans: synthesis of 6 beta-hydroxy metabolites of 4-chloro-1,2-dehydro-17 alpha-methyltestosterone, fluoxymesterone, and metandienone. *Steroids.* 60,353-66
- Singh MV, Weil PA (2002) A method for plasmid purification directly from yeast. *Anal Biochem.* 2002 Aug 1;307(1):13-7
- Torimoto N, Ishii I, Toyama K, Hata M, Tanaka K., Shimomura H., Nakamura H., Ariyoshi N., Ohmori S., Kitada M (2007) Helices F-G are important for the substrate specificities of CYP3A7 *Drug Metab Dispos.* 35(3):484-492
- Volak LP, Ghirmai S, Cashman JR, Court MH (2008) Curcuminoids inhibit multiple human cytochromes P450, UDP-glucuronosyltransferase, and sulfotransferase enzymes, whereas piperine is a relatively selective CYP3A4 inhibitor. *Drug Metab Dispos.* 36(8):1594-605