

Rita Bernhardt<sup>1</sup>

## Cytochrom P450 und die Anwendung der Molekularbiologie



Rita Bernhardt

Sehr verehrter Jubilar, Herr Präsident, liebe Kollegen und Gäste,

es ist mir eine ganz besondere Freude und auch eine außerordentliche Ehre, dass ich heute diesen Vortrag zu Ehren des 80. Geburtstages von Werner Scheler halten darf.

Wie wir hier bereits gehört haben, zog sich die Farbe Rot in mehrfacher Hinsicht durch das gesamte Leben unseres Jubilars. Schon in den 50er Jahren, nachdem er sich der Gruppe um Friedrich Jung am Pharmakologischen Institut der Humboldt-Universität zu Berlin angeschlossen hatte, publizierte er seine ersten Arbeiten zum roten Blutfarbstoff, dem Hämoglobin. Und noch als Akademie-Präsident blieb er der Untersuchung von Hämoproteinen, insbesondere von Cytochromen P450, in seiner Gruppe, der Abteilung Hämkatalyse, treu. Ich bin 1977, in einer Zeit, da Werner Scheler noch Leiter des Forschungszentrums in Berlin-Buch war, an das Zentralinstitut für Molekularbiologie Berlin-Buch in die Abteilung Biokatalyse (Leiter: Prof. Klaus Ruckpaul) gekommen. Und seither lassen auch mich die Hämoproteine, und zwar die Cytochrome P450, nicht mehr los. Einen Überblick darüber, was diese interessante Enzymgruppe, die durch den Hämcharakter, aber auch die große Bedeutung für die Pharmakologie, gleich zweifach mit dem Jubilar verbunden ist und auch darüber, was ich in den letzten Jahren in meiner Gruppe erarbeitet habe, möchte ich jetzt geben.

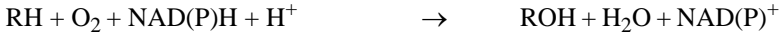
---

1 Universität des Saarlandes, FR 8.8 – Biochemie, P.O. Box 15 11 50, D–66041 Saarbrücken, Germany

## 1. Einführung zu den Cytochromen P450

Cytochrome P450 sind Hämoproteine, d.h. sie enthalten als prosthetische Gruppe das Protoporphyrin IX, den roten Blutfarbstoff Häm, der unseren Jubilar, den hochgeschätzten und hochverehrten Werner Scheler, sein ganzes Leben lang begleitete.

Cytochrom P450 Systeme katalysieren folgende Reaktion:



Ihren Namen erhielten sie durch die für Hämoproteine untypische Absorption des reduzierten CO-Komplexes bei 450 nm (Abb. 1)

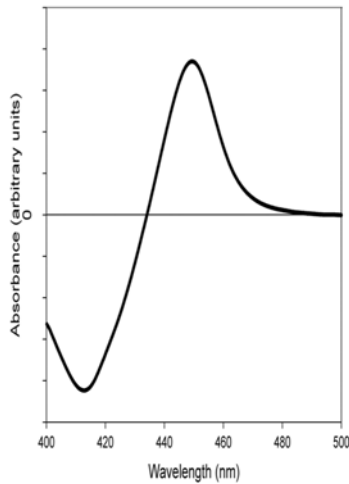


Abb. 1: Spektrum des reduzierten CO-gebundenen Komplexes von Cytochrom P450

Cytochrome P450 sind in den Metabolismus vieler Arzneimittel und Xenobiotika eingebunden (Abb. 2):

- Hydroxylierung von Aromaten (Bsp.: Steroide, Gallensäuren, Anilin)
- Hydroxylierung von Aliphaten (Bsp.: Fettsäuren, Alkane)
- Seitenketten-Hydroxylierung (Bsp.: Cholesterol, Barbiturate)
- Epoxidation (Bsp.: Vinylchlorid)
- Peroxidation (Bsp.: Lipide)
- N-Oxidation (Bsp.: Nikotin, Morphin), S-Oxidation
- N-Desalkylierung, O-Desalkylierung (Bsp.: Codein), S-Desalkylierung
- Desaminierung (Bsp.: Amphetamine, Mescaline)
- Dehalogenierung (Bsp.: Chloroform)

Abb. 2: Beispiele für P450-katalysierte Reaktionen

Die von ihnen katalysierten Reaktionen sind sehr vielfältig und umfassen z.B. Hydroxylierungen, N-, O- und S-Dealkylierungen, Sulfoxidation, Epoxidierung, Desaminierung, Entschwefelung, Dehalogenierung, Peroxidierung und N-oxid-Reduktion. Ihre Substrate sind Fettsäuren, Steroide, Prostaglandine, aber auch eine große Zahl anderer Komponenten wie Arzneimittel, Anästhetika, organische Lösemittel, Ethanol, Alkyl-Aryl-Kohlenwasserstoffe, Pestizide und Karzinogene (siehe Bernhardt 1996, 2003; Ruckpaul und Rein 1981).

Es ist offensichtlich, dass diese Vielzahl von Substraten und katalysierten Reaktionen nicht durch wenige Iso-Formen von Cytochrom P450 umgesetzt bzw. bewirkt werden können. Bei der ersten Klassifikation der Protein-Familie im Jahre 1991 wurden 154 verschiedene P450-Gene beschrieben und in 27 Gen-Familien eingeteilt. 1993 war die Anzahl der P450-Gene schon auf 221 angewachsen, die in 36 Genfamilien vorkommen; jetzt sind mehr als 3000 P450-Gene bzw. cDNAs kloniert, die mehr als 200 CYP Familien angehören (siehe <http://drnelson.utmem.edu/nelsonhomepage.html>) (Abb. 3).

- |              |                             |
|--------------|-----------------------------|
| Sept. 2002:  | 2383 Isoenzyme (Gene)       |
| • Total:     | >200                        |
| • Bakterien: | 75                          |
| • Pilze:     | >20                         |
| • Pflanzen:  | 52                          |
| • Tiere:     | 69                          |
| • Säuger:    | 18 Familien, 43 Subfamilien |

Abb. 3: CYP Familien

Nach der neuen Nomenklatur wird das Kürzel CYP zur Charakterisierung der P450-Hämoproteine benutzt. Die daran anschließende arabische Ziffer kennzeichnet die Genfamilie, der nachfolgende Buchstabe die Unterfamilie und

die zweite Ziffer das einzelne Enzym, z.B. CYP1A1 ist Cytochrom P4501A1 (früher als P450c bezeichnet). Mitglieder der gleichen Genfamilie sind so definiert, dass sie normalerweise  $\leq 40\%$  Sequenz-Übereinstimmung zu P450-Proteinen anderer Familien aufweisen. Diese Definition wurde willkürlich festgelegt, hat sich jedoch als sehr brauchbar erwiesen. Säugetier-Sequenzen innerhalb der gleichen Unterfamilie sind immer  $> 55\%$  identisch. Analysiert man die Zahl der Cytochrome P450 in verschiedenen Organismen, so fällt auf, dass es sehr große Schwankungen gibt (Abb. 4).

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i>: 0</li> <li>• <i>Bacillus subtilis</i>: 7</li> <li>• <i>Mycobacterium tuberculosis</i>: 20</li> <li>• <i>Saccharomyces cerevisiae</i>: 3</li> <li>• <i>Arabidopsis thaliana</i>: 275</li> <li>• <i>Caenorhabditis elegans</i>: 80</li> <li>• <i>Drosophila melanogaster</i>: 90</li> <li>• Mensch: 58</li> </ul> |
|---|

Abb. 4: CYPom (= Gesamtheit aller CYPs eines Organismus) verschiedener Organismen

Während die Pflanze *Arabidopsis* mehr als 200 verschiedene Gene für Cytochrome P450 aufweist, deren Funktionen wir bisher noch nicht einmal annähernd kennen, weist der Mensch 58 verschiedene Formen auf, deren Funktionen wir ebenfalls noch nicht alle im Detail verstehen. Die Verteilung auf die verschiedenen Chromosomen ist sehr ungleichmäßig. So finden sich auf Chromosom 2 beispielsweise 5 verschiedene Cytochrome P450, während Chromosom 5 keines aufweist. Beim Menschen sind ca. 15 verschiedene Cytochrome P450 am Arzneimittelmetabolismus beteiligt. Etwa 75-80% der Phase I Reaktionen werden durch Cytochrome P450 der Familien 1-3 katalysiert, wobei CYP3A4 am Metabolismus von  $> 50\%$  der Arzneimittel (Bsp.: Erythromycin, Cyclosporin, Nifedipin) teilnimmt (Evans and Relling 1999). Forschungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass mehrere dieser Arzneimittel-metabolisierenden Cytochrome P450 sogenannte Polymorphismen aufweisen, also Änderungen in den Genen, die zu Änderungen in der Aktivität dieser Enzyme führen. So konnte gezeigt werden, dass CYP2D6 bei 5-10% der europäischen (caucasian) Bevölkerung Defekte aufweist, die eine starke Verringerung des Abbaus von Arzneimitteln wie Debrisoquin und Bufuralol bewirkt (Meyer 1996) und somit zu erheblichen Nebenwirkungen führen kann. Andererseits konnte gezeigt werden, dass es Patienten gibt, die mehrfache Kopien dieses Gens aufweisen, wodurch es zu einem sehr schnellen

Abbau der entsprechenden Arzneimittel kommt (Ingelmann-Sundberg 2001). Mit den Mitteln der Molekularbiologie können diese Gendefekte analysiert werden und die Patienten können die entsprechende individuelle Arzneimitteldosis bekommen. Allerdings werden derartige molekulargenetische Untersuchungen zur individuellen Arzneimitteltherapie z.Z. aus Kostengründen noch nicht breit angewandt.

Die Verschiedenheit der Cytochrome P450 und die von ihnen katalysierten Reaktionen haben das Interesse von Forschern sehr verschiedener Richtungen auf sich gezogen (Abb. 5).

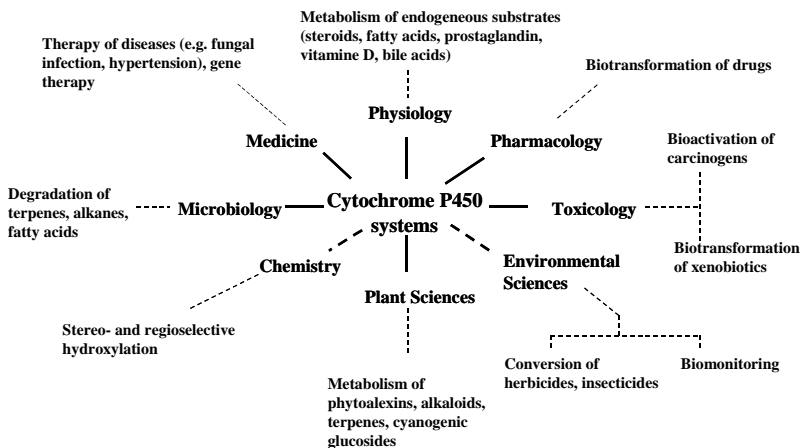


Abb. 5: Cytochrom P450-Funktionen

Neben Pharmakologen und Toxikologen arbeiten auch Endokrinologen, Physiologen, Mikrobiologen, Organische Chemiker, Pflanzenphysiologen und Umweltforscher an verschiedensten Aspekten der Funktion und Regulation von P450. Auch unser Jubilar hat sich mehrere Jahre, ausgehend von seinen Untersuchungen am Hämoglobin und wegen der pharmakologischen Relevanz der Cytochrome P450 mit dieser Enzymgruppe beschäftigt, wie z.B. sein Beitrag im vom Akademie-Verlag 1983 von Ruckpaul und Rein herausgegebenen Buch „Cytochrome P450“ belegt. Die wachsende Vielfalt von Organismen, in denen P450-Gene und -Enzyme gefunden wurden und die Entdeckung neuer P450-Formen wird zu weiteren Untersuchungen und neuen Forschungsgebieten führen.

Das Hauptinteresse meiner Gruppe gilt den Cytochrom P450-abhängigen Steroidhydroxylasen. Noch zu DDR-Zeiten hatten wir in der Gruppe von

Klaus Ruckpaul damit begonnen, an der Herstellung rekombinanter Mikroorganismen zu arbeiten, die für die Steroidhormonproduktion eingesetzt werden sollten. Die damaligen Bedingungen ließen ein schnelles Voranschreiten nicht zu, erlaubten mir aber, im Rahmen des Akademieaustausches mit Japan, mit einem Stipendium der Japan Society for Promotion of Science, gentechnische Methoden im Labor von Prof. Fujii-Kuriyama in Sendai zu erlernen. Dieses methodische know-how hat mir dann in den Folgejahren sehr geholfen, mein wissenschaftliches Arbeitsfeld erfolgreich zu bearbeiten. Sie sind von prinzipieller Bedeutung für die Steroidhormonbiosynthese (siehe Abb. 6).

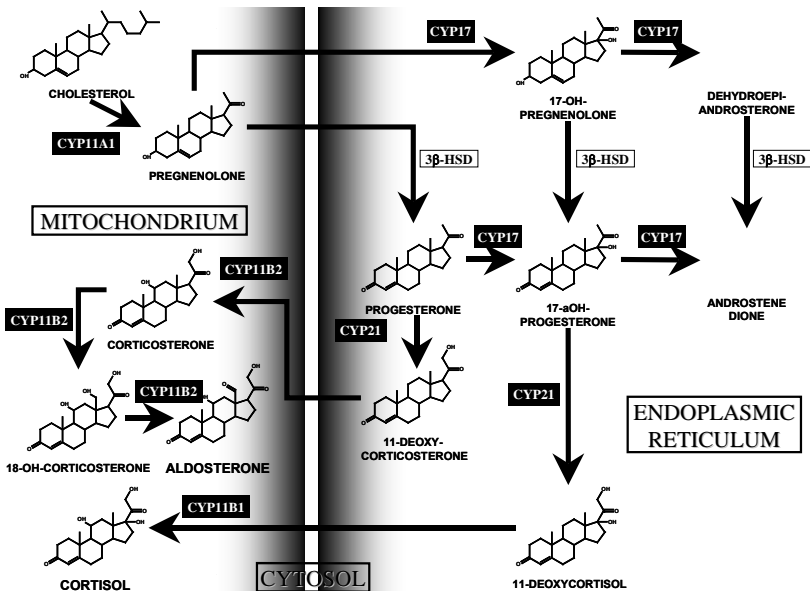


Abb. 6: Schema der Steroidbiosynthese in menschlichen Nebennieren

Insbesondere erforschen wir die mitochondrialen Cytochrom P450-Systeme (aus Rind bzw. aus humaner Nebenniere): CYP11A1, das die Seitenkettenspaltung des Cholesterols katalysiert, CYP11B1, das die 11 $\beta$ -Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol zu Cortisol katalysiert, sowie CYP11B2, das die Umsetzung von 11-Desoxycorticosteron zu Aldosteron bewirkt. Des Weiteren arbeiten wir an der Expression und Charakterisierung der 15 $\beta$ -Hydroxylase aus *Bacillus megaterium* (CYP106A2). Die genannten Steroidhydroxylasen erhalten die für die Sauerstoffaktivierung nötigen Elektronen über eine

NAD(P)H-abhängige Reduktase sowie über ein Eisen-Schwefel-Protein des [2Fe-2S]-Typs, im Falle des Nebennierenproteins als Adrenodoxin bezeichnet (Abb. 7).

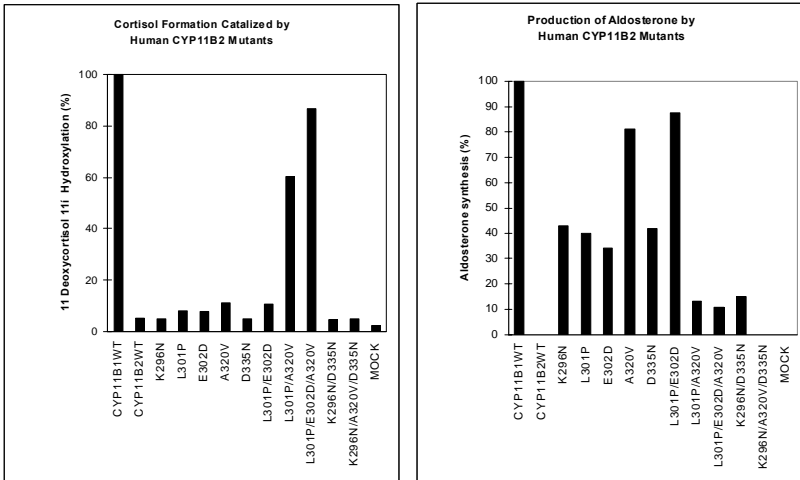


Abb. 7: Schema des Aufbaus mitochondrialer Steroidhydroxylasen

Drei Fragen stehen im Mittelpunkt des Interesses bei unseren Untersuchungen:

1. Was ist die strukturelle Basis für die Ausprägung der Stereo- und Regioselektivität von Steroid-Hydroxylierungen durch die Cytochrom-P450-abhängigen Steroid-Hydroxylasen?
2. Wie wird die Geschwindigkeit der Steroid-Hydroxylierungen reguliert?
3. Molekulargenetische Charakterisierung von Steroid-Hydroxylasen von Patienten, welche Defekte an diesen Proteinen haben (Adrenogenitales Syndrom, verursacht durch CYP11B1-Mangel; Glucocorticoid-supprimierbarer Hyperaldosteronismus, Hyperaldosteronismus).

## 2. Strukturelle Basis für die Regioselektivität von Steroid-Hydroxylierungen

Nebennieren erzeugen drei Arten von Steroid-Hormonen: Mineralocorticoide, Glucocorticoide und Androgene. Sie sind verantwortlich für den Mineralstoffhaushalt, für die Regulation des Protein-, Kohlenhydrat- und Lipid-Stoffwechsels und für die Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale.

Verschiedene Enzyme sind in die Synthese dieser Hormone eingebunden, darunter mehrere Cytochrome P450. Während einige dieser Cytochrome im Endoplasmatischen Retikulum der Nebennieren lokalisiert sind (Cytochrom P450 17 $\alpha$ , CYP17; Cytochrom P450 C21, CYP21A2), werden andere in Mitochondrien gefunden (Cytochrom P450<sub>scc</sub>, CYP11A1; Cytochrom P450 11 $\beta$ , CYP11B1; Aldosteron-Synthase, CYP11B2). CYP11A1 ist verantwortlich für die Seitenketten-Abspaltung in Cholesterol, welche zu Pregnenolon führt. CYP11B1 katalysiert die 11 $\beta$ -Hydroxylierung von 11-Desoxycorticosteron und 11-Desoxycortisol, welche zu Corticosteron und Cortisol führt, während CYP11B2 die Aldosteron-Bildung über 18-Hydroxylierung und 18-Oxidation von Corticosteron gewährleistet (Abb. 6). Es ist hier anzumerken, dass die Überproduktion von Aldosteron nicht nur zu Bluthochdruck führen kann, sondern offenbar auch zu einer Fibrose des Herzgewebes und damit zu einer schlechteren Überlebensrate nach einem Herzinfarkt (Peters et al. 1998, Bureik et al. 2002, Pitt et al. 1999).

Computer-Modellierung und ortsgerichtete Mutagenese werden eingesetzt, um die Unterschiede in der Regiospezifität der Steroid-Hydroxylierung durch die menschlichen Nebennieren-Cytochrome CYP11B1 und CYP11B2, die zu 93% identisch sind, zu untersuchen. Nach der Klonierung der cDNAs aus normalen menschlichen Nebennieren wurde die Protein-Expression in COS-1-Zellen durchgeführt (Denner et al. 1995a). Zusätzlich wurde eine stabile Expression beider Enzyme in V79-Zellen von chinesischen Hamstern erhalten, die die ersten Zell-Linien darstellen, um Inhibitor-Effekte von Arzneimitteln und physiologischen Substanzen auf menschliche Mitochondrien-Cytochrome P450 untersuchen zu können (Denner et al. 1995b, Denner und Bernhardt 1998). Die Effekte von Metyrapon, Spironolacton und verschiedener Azol-Derivate auf CYP11B1 und CYP11B2 wurden getestet und die Zell-Linien scheinen gut geeignet zu sein, um potentielle spezifische Inhibitoren von CYP11B2 zu identifizieren, die auf CYP11B1 keinen Einfluss haben (Denner et al. 1995b, Denner und Bernhardt 1998, Ehmer et al. 2002, Bureik et al. 2003). Derartige selektive und spezifische Inhibitoren für CYP11B2, die Aldosteronsynthase, sind ein neuer Ansatzpunkt für die Entwicklung von Arzneimitteln gegen den Aldosteron-bedingten Bluthochdruck und gegen bestimmte Formen von Herzerkrankungen.

Die Computer-Modellierung der 3D-Strukturen von CYP11B1 und 11B2 auf der Basis bekannter 3D-Strukturen von bakteriellen Cytochromen P450 ergaben, dass drei Sequenz-Differenzen zwischen CYP11B1 und CYP11B2 in der sogenannten I-Helix auftreten, und zwar in den Aminosäure-Positionen



301, 302 und 320. Einfache, doppelte und dreifache Mutanten wurden hergestellt, wobei die normalerweise in CYP11B2 vorkommenden Aminosäuren in diejenigen von CYP11B1 geändert wurden (Abb. 8).

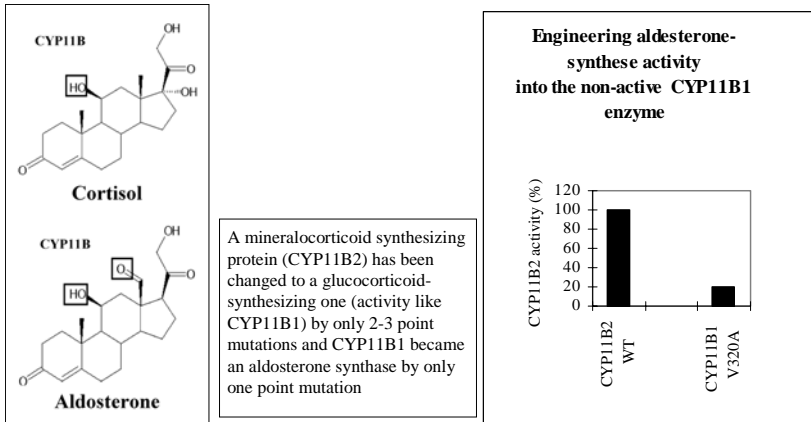


Abb. 8: Änderung der Regioselektivität der CYP11B1 und CYP11B2 katalysierten Steroidhydroxylierung durch ortsgerichtete Mutagenese

Danach wurde untersucht, ob der Ersatz dieser Aminosäuren die Regiospezifität der Steroid-Hydroxylierung beeinflusst. Es wurde gefunden, dass eine L301P/A320V Doppel-Mutante von CYP11B2 die 11 $\beta$ -Hydroxylase-Aktivität auf 60% (das native CYP11B2 hat unter diesen Bedingungen 10–15% Aktivität), verglichen mit derjenigen von CYP11B1, erhöht. Die zusätzliche Substitution des Asp-302 durch Glu-302 in CYP11B2 erhöhte die Aktivität auf 85% (Böttner et al. 1996, Böttner und Bernhardt 1996). Die Aldosteron-Synthase-Aktivitäten dieser CYP11B2-Protein-Mutanten wurde auf 10–13%, bezogen auf den Wild-Typ CYP11B2, reduziert. Dies ist der erste literaturbeschriebene direkte Wechsel der Stereo- und Regioselektivität von Steroid-Hydroxylasen.

Nach diesen Studien sollte getestet werden, ob es durch ortgerichtete Mutagenese im angegebenen sogenannten I-Helix-Bereich nicht nur möglich ist, bestimmte Reaktivitäten zu erniedrigen (im oben angegebenen Fall die 18-Hydroxylierung und 18-Oxidation), bei gleichzeitiger quantitativer Vergrößerung einer anderen Aktivität (11 $\beta$ -Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol), sondern ob auch eine neue Spezifität kreiert werden kann. Dazu wurden die Aminosäuren des CYP11B1 in dieser Region gegen solche des CYP11B2 ausgetauscht. Es zeigte sich, dass bereits der Austausch einer Aminosäure

(V320A) ausreicht, um die 11 $\beta$ -Hydroxylase (CYP11B1) zu einer Aldosterosynthase (mit der Fähigkeit zur 18-Hydroxylierung/18-Oxidation) zu machen (Böttner et al. 1998).

Damit konnte durch rationales Proteindesign ein Enzym mit einer neuen Substratspezifität generiert werden. Interessant ist, dass der letztgenannte Befund neben der erkenntnistheoretischen und biotechnologischen Bedeutung auch physiologische Relevanz besitzt. Bestimmte Formen des zu Bluthochdruck führenden Hyperaldosteronismus könnten auf eine einzige Punktmutation zurückzuführen sein. Weitere Untersuchungen sollen die Anwendbarkeit der gefundenen Ergebnisse auf andere Steroidhydroxylasen bzw. andere Hydroxylierungspositionen testen. Zu diesem Zweck werden in meiner Gruppe weiterhin Modelling und ortsgerichtete Mutagenese, aber auch die Methoden der molekularen Evolution eingesetzt.

### 3. Regulation der Geschwindigkeit der Steroidhydroxylierung

#### 3.1. Die Funktion von Adrenodoxin als Elektronendonator für mitochondriale Cytochrome P450, CYP11A1 und CYP11B1

Die mitochondrialen Cytochrome P450 der Nebenniere übernehmen die notwendigen Elektronen für die Sauerstoff-Aktivierung und die darauffolgende Substrathydroxylierung von einer NADPH-Adrenodoxin-Reduktase über ein Ferredoxin (Adrenodoxin) (Abb. 9).

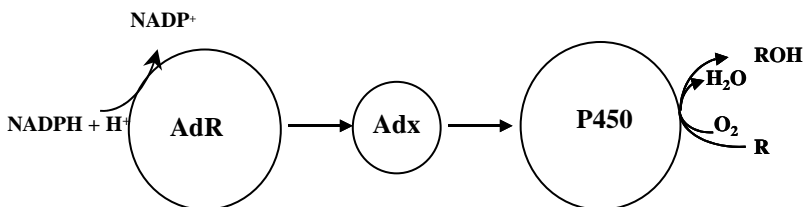


Abb. 9: Schema der Funktion von Adrenodoxin als Elektronendonator

Interessanterweise unterscheiden sich verschiedene P450-Systeme um einen Faktor von 100-1000 in ihrer Elektronenübertragungs-Rate und entsprechend in ihrer Substratumwandlungs-Effektivität. Die Gründe hierfür sind z.Z. noch unklar. Um dieser Frage nachzugehen, haben wir ein System für eine Hochleistungs-Adrenodoxin-Expression im Bakterium *E. coli* entwickelt und Mutagenese-Studien durchgeführt (Uhlmann et al. 1992). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Expression in das Periplasma von *E. coli* als auch die Expression des fertigen Proteins in das Cytoplasma von *E. coli* zu der As-

semblierung des Eisen-Schwefel-Clusters führt. Die Expressionsrate beträgt ca. 5 mg Adrenodoxin/1 *E. coli* im Falle des periplasmatischen Expressions-Systems und 100 mg/1 *E. coli* im Falle des cytoplasmatischen Systems.

Die ortsgerichtete Mutagenese des einzigen Tyrosinbausteins von Adrenodoxin, Y82, dessen Beteiligung an der Elektronenübertragung von der Reduktase auf CYP11A1 auf der Basis chemischer Modifikationsversuche in der Literatur postuliert wurde, zeigte, dass diese aromatische Aminosäure nicht am Elektronentransfer beteiligt ist, jedoch in der Nähe der Interaktionsstelle dieses Proteins mit CYP11A1 und CYP11B1 lokalisiert ist. Interessanterweise sind die Mutationseffekte weniger ausgeprägt, wenn anstatt CYP11B1 die Interaktion mit CYP11A1 betrachtet wird, was darauf hindeutet, dass der Elektronentransfer von Adrenodoxin zu diesen Proteinen partiell durch verschiedene Strukturen der Cytochrome bestimmt wird (Beckert et al. 1997).

Da bei der Adrenodoxin-Isolierung aus Nebennieren eine proteolytische Verkürzung des Proteins vom C-terminalen Ende her stattfindet, wurde die Funktion dieser Region für Struktur und Funktion des Proteins systematisch untersucht, indem die Deletions-Mutanten Adx (4–114), Adx (4–108) und Adx (4–107), welchen die Aminosäure 1–3 und 115–128, 109–128 oder 108–128 fehlen, getestet wurden (Uhlmann et al. 1994).

EPR- und CD-Studien zeigen, dass die Strukturen der Mutanten Adx (4–114) und Adx (4–108) von denen des Wildtyps abweichen. Die Mutante Adx (4–107), der zusätzlich zu den Aminosäuren 109–128 auch das einzige Prolin, Pro 108, fehlt, zeigt kein EPR-Signal. Das deutet darauf hin, dass P108 für die Bindung und/oder Stabilität des Eisen-Schwefel-Clusters unbedingt erforderlich ist. Thermodynamische Studien mit Mutanten des Adrenodoxins in der Position 108 (P108A, P108S, P108K und P108W) zeigen, dass der Austausch des Prolins an dieser Position zu einer drastischen Erniedrigung der Proteinstabilität führt, die auf einen erhöhten Entropie-Beitrag des P108 bei der Auffaltung des Adrenodoxins zurückzuführen ist. Für die thermodynamischen Studien wurde, gemeinsam mit der Gruppe von Prof. W. Pfeil/Universität Potsdam, einem Schüler unseres Jubilars, ein System entwickelt, das derartige Untersuchungen dieses [2Fe-2S]-Proteins erlaubt (Burova et al. 1995, 1996). Es wurden Unterschiede in der Konformations-Stabilität verschiedener Adrenodoxin-Mutanten gefunden. Die in-vitro Substitution des [2Fe-2S]-Clusters in die Mutante Adx (4–107) lieferte ein aktives, aber signifikant weniger stabiles Protein im Vergleich zur Mutante Adx (4–108) bzw. zum Wildtyp. Funktionsstudien mit den Mutanten Adx (4–114) und

Adx (4–108) zeigten, dass die Effektivität der Substratumwandlung ( $V_{\max}$ ) mit CYP11B1, nicht jedoch mit CYP11A1 im Falle der Mutante Adx (4–108) um den Faktor 5 erhöht wird. Weiterhin wurde der erste Schritt des Elektronentransfers auf CYP11B1 um den Faktor 4,5 beschleunigt, was durch stopped-flow-Messungen gezeigt werden konnte (Uhlmann et al. 1994). Die molekulare Basis dieser Erhöhung der Elektronentransfer-Rate wird gegenwärtig untersucht. Eine Mutante, die in der zur Aminosäure W106 des Putidaredoxins homologen Position ebenfalls ein Tryptophan aufweist (Adx verfügt natürlicherweise über kein Tryptophan in seiner Sequenz und nur über ein Tyrosin, Y82), S112W, zeigte eine um den Faktor 10 erhöhte Elektronentransfer-Geschwindigkeit zu CYP11A1. Die Effektivität der Katalyse ( $V_{\max}/K_m$ ) steigt um das etwa 100-fache an (Schiffler et al. 2000). Eine detaillierte stopped-flow kinetische Untersuchung dieser und weiterer Mutanten wurde durchgeführt. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei einer sehr guten Kenntnis der bearbeiteten Enzyme durch den gezielten Einsatz der ortsgerichteten Mutagenese erhebliche Verbesserungen der katalytischen Eigenschaften möglich sind.

In weiteren Studien wurde belegt, dass neben dem in der Literatur beschriebenen Wechselwirkungsareal des Adx um die Reste D76 und D79 ein weiteres Bindungsareal für AdR und die Cytochrome P450 nahe der Aminosäurereste D41 und T47 existiert (Hannemann et al. 2001).

### 3.2. Dreidimensionale Struktur von Adrenodoxin

Die ersten Kristalle von Adrenodoxin wurden bereits zu Beginn der 70er Jahre erhalten, dennoch gelang mehreren Gruppen nicht der Durchbruch zum Erhalt gut streuender Kristalle dieses Proteins. Eigene Untersuchungen und Literaturdaten zeigten, dass Adx im C-terminalen Bereich zur Proteolyse neigt. Wir haben daher mittels gentechnischer Verfahren verkürzte Formen dieses Proteins hergestellt und untersucht. Es zeigte sich, dass die Mutante Adx (4–108) über volle, z.T. sogar gegenüber dem Wildtyp verbesserte, Funktionseigenschaften verfügt (siehe oben) und gut streuende Kristalle liefert. Die Kristallstrukturanalyse erfolgte in der Gruppe von U. Heinemann (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin) in Kooperation mit unserer Gruppe (Müller et al. 1998). Weitere Untersuchungen werden durchgeführt, auch mit Hilfe der molekularen Evolution, um die strukturellen Grundlagen der Regulation der Geschwindigkeit der Steroidhydroxylierung besser verstehen zu lernen.

#### **4. Untersuchungen der molekularen Basis von Störungen bei menschlichen Steroid-Hydroxylasen**

Es gibt eine ganze Reihe von Krankheitsbildern, die durch Störungen des Steroidstoffwechsels verursacht werden. Am häufigsten ist das sogenannte Adrenogenitale Syndrom, bei dem es zu einem Ausfall der 21-Hydroxylase (CYP21) oder der 11 $\beta$ -Hydroxylase (CYP11B1), seltener der 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (CYP17) oder der 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase kommt. Dadurch ist die Synthese von Cortisol (auch von Aldosteron) eingeschränkt, wohingegen es zu einem Anstieg von Zwischenprodukten des Steroidstoffwechsels, besonders der 17-Keto-Steroide (Vorstufen für die Androgenbiosynthese) und damit zu den bekannten klinischen Symptomen kommt.

Beim CMO I-Defekt ist die Umwandlung von Corticosteron in 18-Hydroxycorticosteron gehemmt, während beim CMO II-Defekt die Bildung von Aldosteron aus 18-Hydroxycorticosteron inhibiert ist (siehe Peters et al. 1998).

Bei Patienten mit Defekten in der mitochondrialen Steroid-Hydroxylierung wurde die DNA sequenziert und eine Funktionsanalyse der mutierten Proteine nach Expression der cDNAs in COS-1-Zellen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuresubstitution R384P in CYP11B2 einen Abfall der 18-Hydroxylaseaktivität hervorruft. Damit konnte das klinische Bild des CMO I-Defekts eindeutig einer Punktmutation zugeordnet und die molekulargenetische Ursache des Krankheitsbildes bei dem untersuchten Patienten aufgeklärt werden. In einer Reihe weiterer Patienten wurde als Auslöser für einen Glucocorticoid-supprimierbaren Hyperaldosteronismus ein chimäres Gen aus CYP11B1 und CYP11B2 gefunden (Strauch et al. 2003), während in einigen Patienten keine Chimären-Bildung nachgewiesen werden konnte, obwohl der Hyperaldosteronismus Dexamethason-supprimierbar war. Es wurde in Kooperation mit einer vietnamesischen Arbeitsgruppe erstmals ein Patient mit 11 $\beta$ -Hydroxylase-Defekt charakterisiert, der als Ursache ein chimäres Gen aus Aldosteronsynthase (CYP11B2)-Promotor und CYP11B1-Strukturgen aufweist (Hampf et al. 2001). Darüber hinaus wurde auf dem zweiten Allel eine das Leseraster verschiebende Splice-site Mutation nachgewiesen.

#### **5. Ausblick**

Cytochrome P450 stellen eine Enzymgruppe dar, die vielfältige chemische Reaktionen katalysieren und deren biotechnologische Anwendbarkeit noch

nicht einmal zu einem geringen Teil ausgeschöpft ist. Moderne molekularbiologische und gentechnische Verfahren werden aber helfen, diesen Engpass zu überwinden und diese Enzymgruppe für die Durchführung von Oxidationsreaktionen einsetzbar zu machen. Die Beteiligung der Cytochrome P450 an vielfältigen Synthesen von Sekundärmetaboliten wird darüber hinaus das biotechnologische Einsatzspektrum dieser Enzymgruppe erweitern.

Auf dem Gebiet der Pharmakologie wird die Entwicklung von preisgünstigen DNA-Chips sicher dafür sorgen, die erwähnten Arzneimittelpolymorphismen zu erfassen, wodurch eine individualisierte Therapie möglich werden wird.

Auf dem Gebiet der Endokrinologie erlaubt die in den letzten Jahren erreichte Verfeinerung solcher analytischer Verfahren wie Radioimmunoassay (RIA) und HPLC eine sensitive Analyse verschiedener Steroide im Blut und Urin. Damit ist in vielen endokrinologisch arbeitenden Labors eine wichtige erste Diagnose von Änderungen der Steroidbiosynthese, die neben anderen Faktoren zur Hypertonie führen kann, möglich. Der Einzug molekularbiologischer Verfahren in die wissenschaftliche und klinische Laborpraxis ermöglicht als nächsten Schritt die exakte molekulargenetische Analyse eventueller Gendefekte als Ursache für eine Hypertonie. Die Kenntnis der molekularen Ursachen kann Ansätze nicht nur für eine frühzeitige und verbesserte Diagnostik, sondern auch für eine differenzierte Therapie und neue Therapieansätze bringen. Insgesamt gesehen lassen die nächsten Jahre eine verfeinerte Diagnostik Steroid-bedingter Hypertonien unter Einbeziehung molekulargenetischer Techniken erwarten. Dabei werden möglicherweise neuartige Zusammenhänge zwischen klinischem Erscheinungsbild und genetischem Defekt entdeckt werden. Diese neuen Einblicke werden unser Wissen und unsere Phantasie erfordern, um daraus neuartige Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

Hochgeschätzter Jubilar, liebe Gäste, ich hoffe, ich konnte zeigen, dass die wissenschaftlichen Leistungen, die Werner Scheler erbracht hat, die Wurzel bilden für Forschungen, die auch ich mit meiner Gruppe jetzt durchführe. Diese Wurzeln, die mit der Erforschung des Hämoglobins gesetzt wurden, führten über Friedrich Jung, Werner Scheler, Klaus Ruckpaul und Horst Rein direkt zu meinen Forschungen und den Forschungen von Christiane Jung, die heute ihre Arbeiten zum Cytochrom P450cam vorstellte. Ich hoffe, dass dieser Baum kräftig bleibt und dass unsere Schüler wiederum weitere neue Triebe bilden. Dir, lieber Werner Scheler, wünsche ich alles Gute: Gesund-

heit, Freude mit Deiner Familie und Spaß am Verfolgen der wissenschaftlichen Fortschritte!

## Literatur

- Beckert, V. and Bernhardt, R., 1997. Specific aspects of electron transfer from adrenodoxin to cytochromes P450<sub>sc</sub> and P450<sub>11β</sub>. *J. Biol. Chem.* 272, 4883–4888.
- Bernhardt, R., 1996. Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 127, 137–221.
- Bernhardt, R., Cytochrome P450. 2003. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, in press.
- Böttner, B., Schrauber, H., Bernhardt, R., 1996. Engineering a mineralocorticoid- to a glucocorticoid-synthesizing cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* 271, 8028–8033.
- Böttner, B., Bernhardt, R., 1996. Changed ratios of glucocorticoid/mineralocorticoids caused by point mutations in the putative I-helix regions of CYP11B1 and CYP11B2. *Endocr. Res.* 22, 455–561.
- Böttner, B., Denner, K., Bernhardt, R., 1998. Conferring aldosterone synthesis to human CYP11B1 by replacing key amino acid residues with CYP11B2-specific ones. *Eur. J. Biochem.* 252, 458–466.
- Bureik, M., Lisurek, M., Bernhardt, R., 2002. The human steroid hydroxylases CYP11B1 and CYP11B2. *Biol. Chem.* 383, 1537–1551.
- Bureik, M., Hübel, K., Dragan, C.-A., Scher, J., Becker, H., Lenz, N., Bernhardt, R., 2003. Development of test systems for the discovery of selective human aldosterone synthase (CYP11B2) and 11β-hydroxylase (CYP11B1) inhibitors. Discovery of a new lead compound for the therapy of congestive heart failure, myocardial fibrosis and hypertension, *Molecular and Cellular Endocrinology*, in press.
- Burova, T.V., Bernhardt, R., Pfeil, W., 1995. Conformational stability of bovine holo and apo adrenodoxin - a scanning calorimetric study. *Protein Sci.* 4, 909–916.
- Burova T.V., Beckert, V., Uhlmann, H., Ristau, O., Bernhardt, R., Pfeil, W., 1996. Conformational stability of adrenodoxin mutant proteins. *Protein Sci.* 5, 1890–1897.
- Denner, K., Doehmer, J., Bernhardt, R., 1995a. Cloning of CYP11B1 and CYP11B2 from normal human adrenal and their functional expression in COS-7 and V79 Chinese hamster cells. *Endocr. Res.* 21, 443–448.
- Denner, K., Vogel, R., Schmalix, W., Doehmer, J. and R. Bernhardt, 1995b. Cloning and stable expression of the human mitochondrial cytochrome P450<sub>11B1</sub> cDNA in V79 chinese hamster cells and their application for testing of potential inhibitors. *Pharmacogenetics* 5, 89–96.
- Denner, K., Bernhardt, R., 1998. Inhibition studies of steroid conversions mediated by human CYP11B1 and CYP11B2 expressed in cell cultures. In: Ishimura, Y., Shimada, H., Suematsu, M. (ed.), *Oxygen Homeostasis and Its Dynamics*, Springer-Verlag, Tokyo, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 231–236.

- Ehmer, P.B., Bureik, M., Bernhardt, R., Müller, U., Hartmann, R.W., 2002. Development of a test system for inhibitors of human aldosterone synthase (CYP11B2): screening in fission yeast and evaluation of selectivity in V79 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 81, 173–179.
- Evans, W.E., Relling, M.V. 1999. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286, 487–491.
- Hampf, M., Dao, N.T., Hoan, N.T., Bernhardt R., 2001. Unequal crossing-over between aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase genes causes congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4445–4452.
- Hannemann, F., Rottmann, M., Schiffler, B., Zapp, J., Bernhardt, R. 2001. The loop region covering the iron-sulfur cluster in bovine adrenodoxin comprises a new interaction site for redox partners. *J. Biol. Chem.* 276, 1369–1375.
- Ingelmann-Sundberg, M. 2001. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat. Res.* 482, 11–19.
- Meyer, U. 1996. Overview of enzymes of drug metabolism. *J. Pharmacokinet. and Biop.* 24, 449–459.
- Müller, A., Müller, J.J., Müller, Y.A., Uhlmann, H., Bernhardt, R., Heinemann, U. 1998. New aspects of electron transfer revealed by the crystal structure of a truncated bovine adrenodoxin, Adx(4-108). *Structure* 6, 269–280.
- Peters, J., Hampf, M., Peters, B., Bernhardt, R., 1998. Molekularbiologie, Klinik und Therapie steroidbedingter Hypertonien. In: *Handbuch der Molekularen Medizin* (D. Ganten und K. Ruckpaul, Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp.413–452.
- Pitt, B., 2002. Do diuretics and aldosterone receptor antagonists improve ventricular remodeling? *J. Card. Fail.* 8, 491–493.
- Ruckpaul, K. and H. Rein (Eds) *Cytochrome P-450* Akademie-Verlag Berlin, 1983.
- Schiffler, B., Kiefer, M., Wilken, A., Hannemann, F., Adolph, H.-W., Bernhardt, R. 2001. The interaction of bovine adrenodoxin with CYP11A1 (cytochrome P450<sub>11A1</sub>) and CYP11B1 (cytochrome P450 11B<sub>1</sub>): Acceleration of reduction and substrate conversion by site-directed mutagenesis of adrenodoxin. *J. Biol. Chem.* 276, 36225–36232.
- Strauch B., Zelinka, R, Hampf M., Bernhardt, R. and Widimisky, J. 2003. Prevalence of primary hyperaldosteronism in moderate to severe hypertension in the Central Europe region. *J. Hum. Hypertens* 17, 349–352.
- Uhlmann, H., Beckert, V., Schwarz, D., Bernhardt, R. 1992. Expression of bovine adrenodoxin in *E. coli* and site-directed mutagenesis of /2 Fe-2S/ cluster ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88, 1131–1138.
- Uhlmann, H., Kraft, R., Bernhardt, R., 1994. C-terminal region of adrenodoxin affects its structural integrity and determines differences in its electron transfer function to cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 269, 22557–22564.



