

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
30. Dezember 2015 (30.12.2015)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2015/197698 A2

- (51) **Internationale Patentklassifikation:**
C12P 33/00 (2006.01) *C12N 9/04* (2006.01)
- (21) **Internationales Aktenzeichen:** PCT/EP2015/064264
- (22) **Internationales Anmeldedatum:**
24. Juni 2015 (24.06.2015)
- (25) **Einreichungssprache:** Deutsch
- (26) **Veröffentlichungssprache:** Deutsch
- (30) **Angaben zur Priorität:**
14173747.8 24. Juni 2014 (24.06.2014) EP
14182290.8 26. August 2014 (26.08.2014) EP
- (71) **Anmelder:** PHARMAZELL GMBH [DE/DE];
Rosenheimer Str. 43, 83064 Raubling (DE).
- (72) **Erfinder:** WEUSTER-BOTZ, Dirk; Leonrodstr. 12,
80634 München (DE). SUN, Boqiao; Paul-Heyse-Str. 34,
80336 München (DE). QUIRIN, Christian; Mühlenstraße
39a, 83098 Brannenburg (DE).
- (74) **Anwalt:** REITSTÖTTER KINZEBACH;
Sternwartstraße 4, 81679 München (DE).
- (81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz
2 Buchstabe g)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5
Absatz 2 Buchstabe a)

(54) **Title:** NOVEL METHOD FOR BIOCATALYTIC WHOLE CELL REDUCTION OF DEHYDROCHOLIC ACID COMPOUNDS, NOVEL
7SS-HYDROXY STEROID DEHYDROGENASE MUTANTS AND IMPROVED BIOCATALYTIC METHOD FOR PRODUCING
URSODESOXYCHOLIC ACID

(54) **Bezeichnung** : NEUARTIGE VERFAHREN ZUR BIODKATALYTISCHEN GANZZELLREDUKTION VON
DEHYDROCHOLSÄUREVERBINDUNGEN, NEUARTIGE 7 β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE-MUTANTEN UND
VERBESSERTE BIODKATALYTISCHE VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON URSODESOXYCHOLSÄURE

(57) **Abstract:** The invention relates to novel biocatalytic processes, comprising the whole cell reduction of dehydrocholic acid
(DHCS) compounds, novel 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase mutants, to the sequences encoding said enzyme mutants, to methods
for producing the enzyme mutants and to the use thereof in enzymatic conversion of cholic acid compounds, and especially in the
production of ursodeoxycholic acid (UDCS); The invention also relates to novel methods for the synthesis of UDCS using the
enzyme mutants; and in particular to a further improved method for producing UDCS using recombined whole-cell biocatalysts.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft neuartige biokatalytische Prozesse, umfassend die Ganzzell-Reduktion von
Dehydrocholsäure(DHCS)-Verbindungen, neuartige 7 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-Mutanten, die für diese Enzym-Mutanten
kodierenden Sequenzen, Verfahren zur Herstellung der Enzym-Mutanten und deren Verwendung bei enzymatischen Umsetzungen
von Cholsäureverbindungen, und insbesondere bei der Herstellung von Ursodesoxycholsäure (UDCS); Gegenstand der Erfindung
sind auch neuartige Verfahren zur Synthese von UDCS unter Verwendung der Enzym-Mutanten; sowie insbesondere ein weiter
verbessertes Verfahren zur Herstellung von UDCS unter Verwendung rekombinanter Ganzzell-Biokatalysatoren.



WO 2015/197698 A2

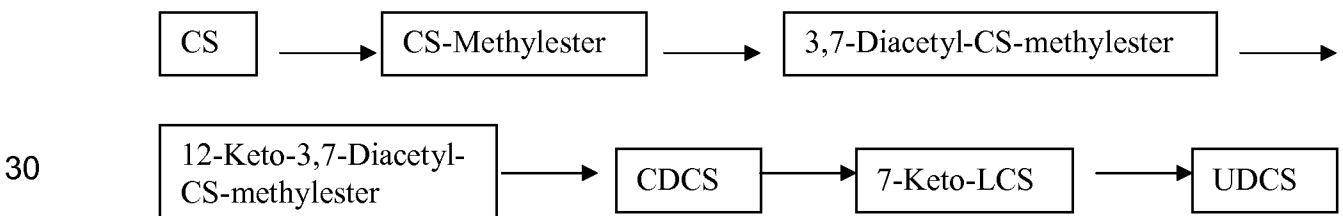
Neuartige Verfahren zur biokatalytischen Ganzzellreduktion von Dehydrocholsäureverbindungen, neuartige 7 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-Mutanten und verbesserte biokatalytische Verfahren zur Herstellung von Ursodesoxycholsäure

Die Erfindung betrifft neuartige biokatalytische Prozesse, umfassend die Ganzzell-
 5 Reduktion von Dehydrocholsäure (DHCS)- Verbindungen, neuartige 7 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-Mutanten, die für diese Enzym-Mutanten kodierenden Sequenzen, Verfahren zur Herstellung der Enzym-Mutanten und deren Verwendung bei enzymatischen Umsetzungen von Cholsäureverbindungen (Gallensäure-Derivaten), und insbesondere bei der Herstellung von Ursodesoxycholsäure (UDCS); Gegenstand der Erfindung sind auch neuartige Ver-
 10 fahren zur Synthese von UDCS unter Verwendung der Enzym-Mutanten; sowie insbesondere ein weiter verbessertes Verfahren zur Herstellung von UDCS unter Verwendung rekombinanter Ganzzell-Biokatalysatoren.

Hintergrund der Erfindung:

15 Zur medikamentösen Behandlung von Gallensteinleiden werden seit vielen Jahren u. a. die Gallensalz-Wirkstoffe Ursodesoxycholsäure (UDCS oder UDCA) und das zugehörige Diastereomer Chenodesoxycholsäure (CDCS oder CDCA) eingesetzt. Beide Verbindungen unterscheiden sich lediglich durch die Konfiguration der Hydroxygruppe am C-Atom 7 (UDCS: β -Konfiguration, CDCS: α -Konfiguration). Zur Herstellung von UDCS sind im Stand
 20 der Technik verschieden Verfahren beschreiben, welche rein chemisch durchgeführt werden oder aus einer Kombination chemischer und enzymatischer Verfahrensschritte bestehen. Ausgangspunkt ist jeweils Cholsäure (CS oder CA) oder die aus Cholsäure hergestellte CDCS.

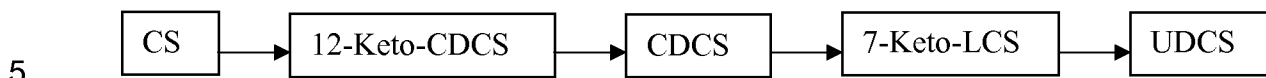
So kann die klassisch chemische Methode zur UDCS Herstellung wie folgt schematisch dargestellt werden:
 25



Ein gravierender Nachteil ist unter anderem folgender: da die chemische Oxidation nicht selektiv ist, müssen die Carboxy-Gruppe und die 3 α und 7 α -Hydroxy-Gruppe durch
 35 Veresterung geschützt werden.

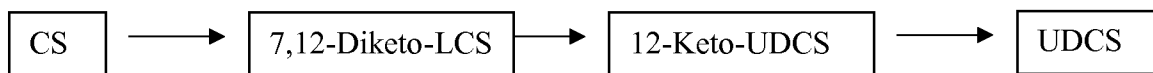
Ein alternatives chemisch/enzymatische Verfahren basierend auf der Verwendung

des Enzyms 12 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase (12 α -HSDH) kann wie folgt dargestellt werden und ist z.B. beschrieben in der PCT/EP2009/002190 der vorliegenden Anmelderin.



Die 12 α -HSDH oxidiert dabei CS selektiv zu 12-Keto-CDCS. Die zwei nach der klassischen chemischen Methode erforderlichen Schützschritte entfallen dabei.

Weiterhin wird von Monti, D., et al., (*One-Pot Multienzymatic Synthesis of 12-Ketoursodeoxycholic Acid: Subtle Cofactor Specificities Rule the Reaction Equilibria of Five Biocatalysts Working in a Row*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2009) ein alternatives enzymatisch-chemisches Verfahren beschrieben, das wie folgt schematisch darstellbar ist:



15 Die CS wird zuerst von 7 α -HSDH aus *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 (Zhu, D., et al., *Enzymatic enantioselective reduction of -ketoesters by a thermostable 7-hydroxysteroid dehydrogenase from Bacteroides fragilis*. *Tetrahedron*, 2006. **62**(18): p. 4535-4539) und 12 α -HSDH zu 7,12-Diketo-LCS oxidiert. Diese beiden Enzyme sind jeweils NADH abhängig. Nach der Reduktion durch 7 β -HSDH (NADPH abhängig) aus *Clostridium absonum* ATCC 27555 (DSM 599) (MacDonald, I.A. and P.D. Roach, *Bile induction of 7 alpha- and 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in Clostridium absonum*. *Biochim Biophys Acta*, 1981. **665**(2): p. 262-9) entsteht 12-Keto-UDCS. Durch Wolff-Kishner-Reduktion wird das Endprodukt erhalten. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, dass wegen der Gleichgewichtslage der katalysierten Reaktion eine komplette Umsetzung nicht möglich ist, und dass für die erste Stufe der Umsetzung zwei unterschiedliche Enzyme eingesetzt werden müssen, was das Verfahren verteuert. Zur Kofaktor-Regenerierung werden Lactat Dehydrogenase (LDH; zur Regenerierung von NAD⁺) und Glucose Dehydrogenase (GlcDH oder GDH, zur Regenerierung von NADPH) eingesetzt. Nachteilig bei der dort verwendeten Kofaktor-Regenerierung ist, dass das entstehende Ko-Produkt nur sehr schwer aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen ist, so dass das Reaktionsgleichgewicht nicht positiv beeinflusst werden kann, was eine unvollständige Umsetzung des Edukts bedingt.

20

25

30

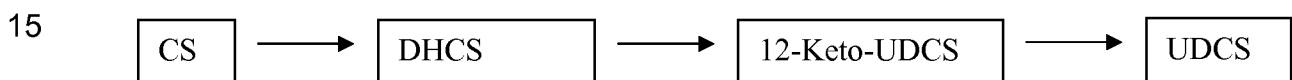
Eine 7 β -HSDH aus Stamm *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 (DSM 3979; ehemalige *Eubacterium aerofaciens*) wurde im Jahr 1982 von Hirano und Masuda beschrieben (Hirano, S. and N. Masuda, *Characterization of NADP-dependent 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenases from Peptostreptococcus productus and Eubacterium aerofaciens*. *Appl Environ Microbiol*, 1982. **43**(5): p. 1057-63). Sequenzinformationen wurden zu diesem Enzym nicht offenbart. Das durch Gelfiltration bestimmte Molekulargewicht betrug 45,000 Da (vgl.

35

Hirano, Seite 1059, linke Spalte). Weiterhin konnte für das dortige Enzym die Reduktion der 7-Oxo-Gruppe zur 7 β -Hydroxygruppe nicht beobachtet werden (vgl. Hirano, Seite 1061, Diskussion 1. Absatz). der Fachmann erkennt somit, dass das von Hirano et al beschriebene Enzym nicht zur Katalyse der Reduktion von Dehydrocholsäure (DHCS oder DHCA) in 7-
 5 Position zu 3,12-Diketo-UDCS geeignet ist.

In der WO2011/064404 der Anmelderin wird eine neuartige 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 beschrieben, welche unter anderem ein Molekulargewicht (bei SDS-Gelelektrophorese) von etwa 28-32 kDa, ein Molekulargewicht (bei Gelfiltration, unter nicht denaturierenden Bedingungen, wie insbesondere ohne SDS): von etwa 53 bis 60
 10 kDa, und die Befähigung zur stereoselektiven Reduktion der 7-Carbonyl-Gruppe von 7-Keto-LCS in eine 7 β -Hydroxy-Gruppe aufweist.

Außerdem wird in der WO2011/064404 ein Verfahren zur UDCS Herstellung bereitgestellt, welches schematisch wie folgt darstellbar ist:



Dabei erfolgt die Oxidation von CS auf klassisch chemischem Weg in einfacher Weise. Die DHCS wird von Enzympaar 7 β -HSDH und 3 α -HSDH einzeln nacheinander oder in einem Topf zu 12-Keto-UDCS reduziert. Kombiniert mit der Wolff-Kishner-Reduktion kann UDCS somit in nur drei Schritte aus CS synthetisiert werden. Während die 7 β -HSDH vom
 20 Kofaktor NADPH abhängig ist, benötigt die 3 α -HSDH den Kofaktor NADH. Die Verfügbarkeit von Enzympaaren mit Abhängigkeit vom gleichen Kofaktor oder erweiterter Anhängigkeit, (z.B. von den Kofaktoren NADH und NADPH) wäre von Vorteil, weil damit die Kofaktor-Regenerierung vereinfacht werden könnte.

In der WO2012/080504 der Anmelderin wird insbesondere ein Ganzzellverfahren zur biokatalytischen Reduktion von Dehydrocholsäure-Verbindungen (DHCS) und insbesondere ein neuartiges Verfahren zur Herstellung von UDCS unter Verwendung von rekombinanten Ganzzell-Katalysatoren beschrieben, welche 7 β -HSDH und 3 α -HSDH exprimieren und wobei die enzymatischen Reduktionsschritte zur Cofaktor-Regenerierung mit einem cofaktor-
 30 regenerierenden Enzym, wie z.B. einer geeigneten Glucosedehydrogenase (GDH) gekoppelt sind.

Entscheidend für die Effizienz einer enzymatischen Synthese ist die Art und Weise, in der die benötigten Enzyme eingesetzt werden. Die Ganzzellbiokatalyse stellt hierbei einen probaten Ansatz dar. Dabei werden die oftmals heterologen Enzyme innerhalb des Wirtsorganismus überexprimiert und die Zelle wird als Ganzes als Biokatalysator eingesetzt. Ein
 35 spezieller Ganzzellbiokatalysator der WO2012/080504, exprimiert heterolog eine, z.B. NADPH-abhängige, 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens*, eine, z.B. NADH-abhängige 3 α -

HSDH aus *Comamonas testosteroni* und eine sowohl NADH als auch NADPH utilisierende GDH aus *Bacillus subtilis* und wird als Ganzzellbiokatalysator für die Reduktion von DHCS zu 12-keto-Ursodesoxycholsäure (12-keto-UDCS) eingesetzt.. Dort wurden z.B. 17,7 gBTM L-1 Biokatalysator eingesetzt werden, um 100 mM DHCS zu 98 % zu 12-keto-UDCS umzu-
5 setzen. Da Biokatalysatoren einen Hauptkostenfaktor in diesem Produktionsprozess darstellen, besteht die aktuelle technische Herausforderung im Auffinden von technischen Lösungen, bei denen die Verfahrenskosten gesenkt werden können, z.B. indem die Biokatalysatoren durch andere Stoffe teilweise ersetzt werden.

Eine erste Aufgabe besteht daher in der Bereitstellung neuartiger biokatalytischer
10 Prozesse, welche sich insbesondere durch höhere Kosteneffizienz bei der reduktiven Herstellung von UDCS über DHCS auszeichnen.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung weiter verbesserter 7 β -HSDHs. Insbesondere sollten Enzym-Mutanten bereitgestellt werden, welche noch vorteilhafter zur enzymatischen oder mikrobiellen (biokatalytischen) Herstellung von UDCS über
15 die stereospezifische Reduktion von DHCS in 7-Position eingesetzt werden können, und insbesondere eine veränderte Kofaktor-Nutzung (insbesondere eine verbesserte NADH-Spezifität) aufweisen.

Kurzfassung der Erfindung:

20 Obige erste Aufgabe konnten überraschenderweise gelöst werden durch ein neuartiges Ganzzellverfahren zur biokatalytischen Reduktion von DHCS-Verbindungen, bei dem die für die Ganzzellkatalyse benötigte Biomasse verringert werden kann, indem diese teilweise durch die Zugabe von Kofaktor NAD und/oder NADP ersetzt werden kann. Hierbei kann entweder NAD oder NADP oder NAD und NADP dem Reaktionsansatz zugegeben
25 werden.

Insbesondere wurde obige erste Aufgabe gelöst durch Bereitstellung eines verbesserten biokatalytischen (mikrobiellen bzw. enzymatischen) Prozesses, insbesondere eines Ganzzellprozesses, umfassend die enzymatische Umsetzung von DHCS über zwei durch
30 7 β -HSDH bzw. 3 α -HSDH katalysierte reduktive Teilschritte, die gleichzeitig oder zeitlich versetzt in beliebiger Reihenfolge ablaufen können, zu 12-Keto-UDCS und Kofaktorregenerierung durch Verwendung von Glucosedehydrogenase (GDH)-Enzymen, welche den verbrauchten Kofaktor aus beiden reduktiven Teilschritten regenerieren.

Obige zweite Aufgabe konnte durch Erzeugung und Charakterisierung von Mutanten der 7 β -HSDH aus aeroben Bakterien der Gattung *Collinsella*, insbesondere des Stammes
35 *Collinsella aerofaciens*, mit verbesserter NADH-Spezifität gelöst, wobei die Mutante ebenfalls bei der (enzymatischen oder mikrobiellen) Umsetzung, insbesondere im Rahmen eines Ganzzellprozesses, von Cholsäureverbindungen, insbesondere bei der Herstellung von

UDCS vorteilhaft Verwendung finden.

Figurenbeschreibung:

Figur 1a zeigt die Aminosäuresequenz der 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens* und
5 Figur 1b die kodierende Nukleinsäuresequenz zur Aminosäuresequenz von Figur 1a; Figur
1c zeigt die Aminosäuresequenz der 3 α -HSDH aus *Comanomonas testosteroni* und Figur
1d die kodierende Nukleinsäuresequenz zur Aminosäuresequenz von Figur 1c; Figur 1 e
zeigt im Vergleich die Aminosäuresequenzen von 7 β -HSDH Wildtyp (WT) und verschiede-
ner Mutanten: 7 β -HSDH D, 7 β -HSDH DF, 7 β -HSDH DFK und 7 β -HSDH DFKG

10 Figur 2 zeigt eine schematische Darstellung der zweistufigen enzymatischen Reduk-
tion von Dehydrocholsäure zu 12-keto-Ursodesoxycholsäure unter Verwendung eines
Ganzzellbiokatalysators, wobei die Teilschritte der Reduktion durch eine 7 β -HSDH und ei-
nen 3 α -HSDH katalysiert werde. Der verbrauchte Kofaktor (NADH bzw. NADPH) wird von
einer ebenfalls vom Ganzzellkatalysator exprimierten GDH unter Verbrauch von Glucose
15 (Bildung von Glucono-1,5-lacton) regeneriert.

Figur 3 zeigt die Vektorkarten der Expressionsplasmide p7(A)T3rG (SEQ ID NO: 18),
p7(A)T3rG-K (SEQ ID NO: 19) und p7(A)T3TG (SEQ ID NO: 20).

Figur 4 zeigt die Reaktionsverläufe der Biokatalysereaktion mit den Ganzzellbiokata-
lysatoren *E. coli* BL49 p7(A)T3rG, *E. coli* BL21 Δ hdhA p7(A)T3rG-K und *E. coli* BL49
20 p7(A)T3TG bei Einsatz von 1 g_{BTM} L⁻¹ Biokatalysator, 0,05 mM NAD und 0,01 mM NADP (X
= 67).

Figur 5 zeigt den Reaktionsverlauf der Biokatalysereaktion mit den Ganzzellbiokata-
lysatoren *E. coli* BL49 p7(A)T3rG bei Einsatz von 3,5 g_{BTM} L⁻¹ Biokatalysator und 0,025 mM
NAD (X = 147,5).

25 Figur 6 zeigt den Reaktionsverlauf der Biokatalysereaktion mit den Ganzzellbiokata-
lysatoren *E. coli* BL49 p7(A)T3rG bei Einsatz von 1,75 g_{BTM} L⁻¹ Biokatalysator, 0,025 mM NAD
und 0,01 mM NADP (X = 89,5).

Figur 7 zeigt den Reaktionsverlauf der Biokatalysereaktion mit den Ganzzellbiokata-
lysatoren *E. coli* BL21 Δ hdhA p7(A)T3rG-K bei Einsatz von 1 g_{BTM} L⁻¹ Biokatalysator, 0,04 mM
30 NAD und 0,0075 mM NADP (X = 61).

Figur 8 zeigt das Aminosäuresequenz-Alignment der unmodifizierten 7 β -HSDH, der
aus dem Stand der Technik bekannten Enzymmutanten 7 β -HSDH G39D und 7 β -HSDH
G39D R40I mit speziellen erfindungsgemäßen Enzymmutanten. Positionen, die von der ur-
sprünglichen Sequenz abweichen sind unterstrichen dargestellt.

35 Figur 9 zeigt die enzymkinetische Untersuchung erfindungsgemäßer 7 β -HSDH-
Mutanten. Auftragung der spezifischen Enzymaktivität gegen unterschiedliche eingesetzte
Substratkonzentrationen (DHCA/DHCS) bei einer konstanten Kofaktorkonzentration 0,5 mM

NADH.

Figur 10 zeigt die enzymkinetische Untersuchung erfindungsgemäßer 7 β -HSDH-Mutanten. Auftragung der spezifischen Enzymaktivität gegen unterschiedliche eingesetzte Kofaktorkonzentrationen (NADH) bei einer konstanten Substratkonzentration von 10 mM DHCA/DHCS.

Figur 11 zeigt Ganzzellbiotransformationen mit bei -20 °C und bei Raumtemperatur/4 °C gelagerten Zellen des Ganzzellbiokatalysators E. coli BLLiu p7(A)T3TG-K. Die oberen zwei Ansätze wurden nach Standardbedingungen durchgeführt: 70 mM DHCA, 350 mM Glucose, OD 2 Zellen, 50 μ M NAD, 10 μ M NADP, 1 mM MgCl₂, 50 mM KPi-Puffer (pH 7,0), 30 °C. Bei dem unteren Ansatz wurde bei sonst gleichbleibenden Bedingungen die NAD-Konzentration auf 100 μ M verdoppelt. Der pH wurde halbstündlich manuell mit NaOH-Lösung (5 M) auf den Ausgangswert eingestellt. Gezeigt sind Mittelwerte aus Dreifachansätzen, die Standardabweichungen sind durch Fehlerindikatoren dargestellt.

Figur 12 zeigt den Vergleich der NADH-abhängigen 7 β -HSDH-Mutanten D, DF, DFK und DKFG mit dem Wildtyp (WT) Enzym.. Die Reaktionsbedingungen waren jeweils 0,2 mg mL⁻¹ 7 β -HSDH, 10 U mL⁻¹ GDH, 0,5 mM NAD, 50 mM DHCA, 200 mM Glucose, 500 mM Kaliumphosphat, pH 8,0, 30 °C. Die Reaktionen wurden in geschüttelten DeepWell-Platten ohne pH-Kontrolle im stark gepufferten System durchgeführt. Standardabweichungen der Dreifachansätze sind durch Fehlerindikatoren gekennzeichnet.

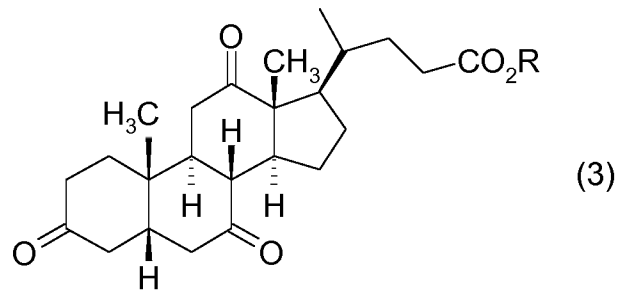
Figur 13 zeigt die Reaktionsverläufe von zweistufigen Biotransformationen mit den NADH-abhängigen 7 β -HSDH-Mutanten DFK und DFKG. Die Reaktionsbedingungen waren jeweils 0,2 mg mL⁻¹ 7 β -HSDH, 1 U mL⁻¹ 3 α -HSDH, 10 U mL⁻¹ GDH, 0,5 mM NAD, 50 mM DHCA, 200 mM Glucose, 500 mM Kaliumphosphat, pH 8,0, 30 °C. Die Reaktionen wurden in geschüttelten DeepWell-Platten ohne pH-Kontrolle im stark gepufferten System durchgeführt. Standardabweichungen der Dreifachansätze sind durch Fehlerindikatoren gekennzeichnet.

Spezielle Ausführungsformen der Erfindung

Die Erfindung betrifft insbesondere folgende spezielle Ausführungsformen:

1. Verfahren zur biokatalytischen Reduktion, insbesondere Ganzzellreduktion, einer Dehydrocholsäureverbindung (DHCS) der allgemeinen Formel 3:

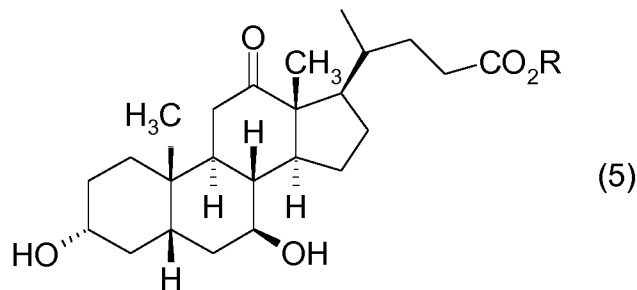
7



worin

R für Alkyl, H, ein Alkalimetallion oder $N(R^3)_4^+$ steht, worin die Reste R^3 gleich oder verschieden sind und für H oder Alkyl stehen, oder die Gruppe $-CO_2R$ durch die Säureamid-Gruppe $-CONR^1R^2$, ersetzt ist, worin R^1 und R^2 unabhängig voneinander für einen Alkylrest stehen;

zur korrespondierenden 12-Keto-Ursodesoxycholsäureverbindung (12-Keto UDCS) der Formel (5)



10

worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe $-CO_2R$ durch die Säureamid-Gruppe $-CONR^1R^2$, wie oben definiert ersetzt ist,

wobei man einen oder mehrere gleiche oder verschiedene Ganzzellbiokatalysatoren, insbesondere einen Ganzzellbiokatalysator, in einem flüssigen Reaktionsmedium, umfassend je nach Kofaktorspezifität der für die Umsetzung benötigten Enzyme, NAD(H) und/oder NADP(H), Glucose und ggf. weitere Hilfsstoffe, sowie wenigstens ein Substrat der Formel (3) mit dem (den) Ganzzellbiokatalysator(en) in Kontakt bringt, und ggf. das Reaktionsprodukt aus dem Reaktionsmedium isoliert; wobei die Reaktion in Gegenwart von 7β -Hydroxysteroiddehydrogenase (7β -HSDH), (NAD(H)- und/oder NADP(H)-abhängig, insbesondere NADP(H)-abhängig); 3α -Hydroxysteroiddehydrogenase (3α -HSDH) (NAD(H)- und/oder NADP(H)-abhängig, insbesondere NAD(H)-abhängig) und Glucosedehydrogenase (GDH) (NAD(H)- und/oder NADP(H)-abhängig; insbesondere Kofaktor-unspezifisch, d.h. NAD(H)- und NADP(H)-verwertend) erfolgt;

wobei NAD(H) und/oder NADP(H), je nach Kofaktorspezifität der benötigten Enzyme, Glucose und ggf. weitere Hilfsstoffe, sowie wenigstens ein Substrat der Formel (3), im Wesentlichen keine endogenen Bestandteile des Biokatalysators sind sondern dem flüssigen, insbe-

25

sondere wässrigen, Reaktionsmedium zugesetzt werden;

und wobei

der Ganzzellbiokatalysator (oder die verschiedenen Ganzzellbiokatalysatoren zusammen) gleichzeitig die Enzymaktivitäten

- 5 (1) 7 β -HSDH und
 (2) 3 α -HSDH exprimiert (exprimieren), und gegebenenfalls
 (3) GDH exprimiert (exprimieren), wenn GDH dem flüssigen Reaktionsmedium nicht zugesetzt wird;

- 10 und wobei die Konzentrationen von Ganzzellbiokatalysator, NAD(H), NADP(H) und Substrat der Formel (3) im Reaktionsansatz in folgendem mathematischen Zusammenhang stehen:

$$X < Y \cdot 200 \text{ oder } X < Y \cdot 175, \text{ wie insbesondere}$$

$$X < Y \cdot 150$$

- 15 mit

$$Y = c_{\text{DHCS}} / 70$$

und

$$X = c_{\text{Kat}} \cdot 40 + c_{\text{NAD(H)}} \cdot 300 + c_{\text{NADP(H)}} \cdot 1200$$

- 20 worin die Parameter wie folgt definiert sind:

c_{DHCS} = anfängliche Substratkonzentration [mM] einer Verbindung der Formel (3)

c_{Kat} = Ganzzellbiokatalysator-Konzentration [$\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$]

$c_{\text{NAD(H)}}$ = Konzentration NAD(H) [mM]

$c_{\text{NADP(H)}}$ = Konzentration NADP(H) [mM].

- 25

Dabei gelten für die oben angegebenen Parameter insbesondere die folgenden bevorzugten Bedeutungen einzeln oder insgesamt:

- a) c_{Kat} liegt im Bereich von 0,05 bis 50, 0,1 bis 10, insbesondere 0,5 bis 5 $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$, wobei „BTM“ für Bakterientrockenmasse steht;
- 30 b) $c_{\text{NAD(H)}}$ und $c_{\text{NADP(H)}}$ stehen nicht gleichzeitig für 0; insbesondere sind beide Werte größer 0, d.h. sowohl ein NAD(H)- als auch ein NADP(H) abhängiger Schritt ist Teil des biokatalytischen Verfahrens,
- c) die Summe von $c_{\text{NAD(H)}} + c_{\text{NADP(H)}}$ beträgt wenigstens 10 μM , insbesondere wenigstens 20 μM , wie z.B. 10 bis 1000 mM, oder 15 bis 500 mM oder 20 bis 250 mM oder 25 bis
- 35 100 mM.
- d) $c_{\text{NAD(H)}}$ und $c_{\text{NADP(H)}}$ sind jeweils geringer als die jeweilige Sättigungskonzentration von NAD(H) und NADP(H), wie z.B. jeweils 1 bis 500 mM, 5 bis 200 mM oder 10 bis 150

mM oder 15 bis 100 mM, und

e) C_{DHCS} liegt in einem Bereich von etwa 0,1 bis 500 mM, insbesondere 1 bis 200mM, oder 10 bis 100 mM liegt.

- 5 Beispielsweise sind wenigstens die Bedingungen a), b) und c), oder a), b), c) und d) oder, oder a) bis e) gleichzeitig gemäß obiger Definition einzustellen.

Eine bevorzugte Ausgestaltung umfasst die Verwendung eines Ganzzellbiokatalysators, in einem flüssigen Reaktionsmedium; wobei die Reaktion in Gegenwart von 7 β -
10 Hydroxysteroiddehydrogenase (7 β -HSDH), (NADP(H)-abhängig); 3 α -
Hydroxysteroiddehydrogenase (3 α -HSDH) (NAD(H)-abhängig) und Glucosedehydrogenase (GDH) (Kofaktor-unspezifisch, d.h. NAD(H)- und NADP(H)-verwertend) erfolgt.

Eine weitere bevorzugte Ausgestaltung umfasst einen Ganzzellkatalysator, der gleichzeitig
15 die Enzymaktivitäten

(1) 7 β -HSDH

(2) 3 α -HSDH und

(3) GDH

obiger bevorzugter Cofaktorspezifität exprimiert.

20

Insbesondere kann der Fachmann unter Befolgung der erfindungsgemäßen Lehre die obigen Konzentrationswerte beispielsweise so wählen, dass ein Umsatz von >95% >98% >99% oder >99,5% in einem Zeitintervall von 4 bis 24 h, insbesondere 6 bis 12 oder 7 bis 8 h erreicht wird, wie z.B. >98% innerhalb 6 bis 12 oder 7 bis 8 h ; oder >99,5% innerhalb 4 bis
25 24 h, oder 6 bis 12 erfolgt. Besonders bevorzugt sind Umsätze von >99% innerhalb einer Reaktionszeit von weniger als 10 h , wie insbesondere 3 bis 9,5 h oder 4 bis 9h, 5 bis 9 h, 6 bis 9 h oder 7 bis 9h und vor allem etwa 8 h. Diese Umsätze sind z.B. nach Standard-Prüfmethode (IPC Methode) bestimmbar, wie sie im folgenden experimentellen Teil näher erläutert sind, wobei die Umsetzung von DHCS zu 12-Keto-UDCS bestimmt wird.

30

2. Verfahren nach Ausführungsform 1, wobei der Ganzzellbiokatalysator ein rekombinanter Mikroorganismus ist.

3. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei der Biokatalysator die kodierenden Sequenzen für die zu exprimierenden Enzymaktivitäten von 7 β -
35 HSDH, 3 α -HSDH und GDH auf einem oder mehreren, insbesondere einem oder zwei, Plasmiden oder Genom-integriert, insbesondere einem Plasmid, trägt. Beispielsweise sind

zu nennen die Plasmide:

p7(A)T3rG = p7(A)T3rG-A = pET22b 7beta-HSDH (G39A) T7P 3alpha-HSDH rbs bsGDH (SEQ ID NO: 18);

5 p7(A)T3rG-K = pET28a 7beta-HSDH(G39A) T7P 3alpha-HSDH rbs bsGDH (SEQ ID NO: 19);

p7(A)T3TG = p7(A)T3TG-A = pET22b 7beta-HSDH(G39A) T7P 3alpha-HSDH T7P bsGDH (SEQ ID NO: 20);

10 p7(A)T3TG-K = pET28a 7beta-HSDH(G39A) T7P 3alpha-HSDH T7P bsGDH (SEQ ID NO: 21);

sowie davon abgeleitete Plasmide, wobei eine oder mehrere der darin enthaltenen enzymkodierenden Sequenzen durch eine für eine Enzymmutante kodierende Sequenz ersetzt ist, Z.B kann die 7beta-HSDH(G39A) kodierende Sequenz ersetzt sein durch eine andere 7β-HSDH- Mutantensequenz, wie z.B. eine, die für eine Mutante gemäß SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 oder 13, oder eine andere hierin beschriebenen oder aus dem Stand der Technik bekannte Mutante kodiert.

4. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei der Biokatalysator keine 7α-HSDH Enzymaktivität (insbesondere keine gemäß SEQ ID NO: 6) exprimiert.

5. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei die 7β-HSDH, 3α-HSDH und GDH exogen exprimierte Enzymaktivitäten sind, d.h. keine endogenen Bestandteile des rekombinanten Mikroorganismus (Ganzzellkatalysators) sind..

6. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei die 7β-HSDH, 3α-HSDH und/oder GDH Wildtyp-Enzyme oder gentechnisch veränderte Enzyme (Enzymmutanten) sind.

30 7. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei die

a) die 7β-HSDH eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 oder eine davon abgeleitete Aminosäuresequenz mit wenigstens 60% Sequenzidentität wie z.B. wenigstens 65, 70, 75, 80, 85, oder 90, wie z.B. wenigstens 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 oder 99,5% zu dieser Sequenz aufweist; wie z.B eine Enzymmutante ausgewählt unter den aus der WO2012/080504 der Anmelderin bekannten Mutanten, wie z.B. den Einfachmutanten: G39A, G39S, G39D, G39V, G39T, G39P, G39N, G39E,

G39Q, G39H, G39R, G39K und G39W, und R40D, R40E, R40I, R40V, R40L, R40G, R40A

den Doppelmutanten: (G39D,R40I), (G39D,R40L), (G39D,R40V); (R40D,R41I); (R40D,R41L); (R40D,R41V); (R40I,R41I); (R40V,R41I), (R40L,R41I). oder

den Dreifachmutanten (G39D,R40I,R41N).; oder den hierin neu beschriebenen Mehrfachmutanten in den folgenden Ausführungsformen 20 bis 24;.

b) die 3 α -HSDH eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:4 oder eine davon abgeleitete Aminosäuresequenz mit wenigstens 60% Sequenzidentität wie z.B. wenigstens 65, 70, 75, 80, 85, oder 90, wie z.B. wenigstens 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 oder 99,5% zu dieser Sequenz aufweist; und/oder

c) die GDH eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:8 oder eine davon abgeleitete Aminosäuresequenz mit wenigstens 60% Sequenzidentität wie z.B. wenigstens 65, 70, 75, 80, 85, oder 90, wie z.B. wenigstens 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 oder 99,5% zu dieser Sequenz aufweist;

8. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei der Biokatalysator ein rekombinanter Stamm von Mikroorganismen der Gattung *Escherichia*, insbesondere ein *E. coli* Stamm, ist.

9. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei die 7 β -HSDH, 3 α -HSDH und GDH gleiche oder verschiedenen Kofaktoren, ausgewählt unter NAD(H) und NADP(H) nutzen; wie z.B. 7 β -HSDH nutzt NADP(H), 3 α -HSDH nutzt (NAD(H) und GDH nutzt NAD(H) und NADP(H).

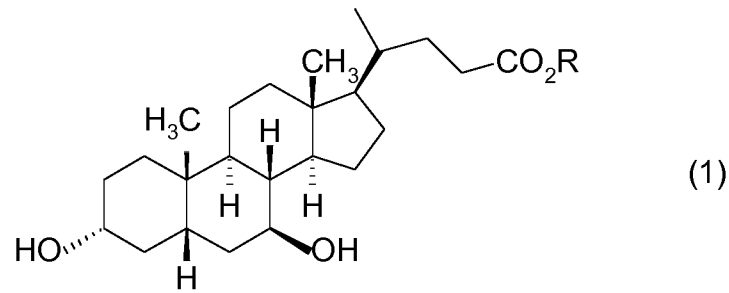
10. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei die GDH zur wenigstens teilweisen ,insbesondere vollständigen Regenerierung der bei der durch 7 β -HSDH und durch 3 α -HSDH katalysierten Teilreaktionen verbrauchten Kofaktoren (NAD(H) und/oder NADP(H), insbesondere NAD(H) und NADP(H) befähigt ist.

11. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei man die Reaktion in einem gepufferten wässrigen Reaktionsmedium, bei pH = 6 -8 durchführt.

12. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei Glucose in einer anfänglichen Konzentration von 10 mM bis 3000 mM, wie z.B. 100 bis 1000 mM eingesetzt wird.

13. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei die Reaktion kontinuierlich oder diskontinuierlich durchgeführt wird.
- 5 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei der Biokatalysator nicht-immobilisiert oder an einem inerten Trägermaterial immobilisiert ist.
- 10 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei das Reaktionsmedium weitere Hilfsstoffe, wie Alkali- oder Erdalkalimetallsalze, mehrwertige niedermolekulare Alkohole und/oder Puffer enthält. Insbesondere können dem Reaktionsmedium ein oder mehrere Hilfsstoffe, wie z.B. Alkali oder Erdalkalimetallsalze, wie z.B. $MgCl_2$ (z.B. 0-20, insbesondere 1 bis 10 mM) und/oder mehrwertige niedermolekulare Alkohole, wie Glycerin 0-30, insbesondere 1 bis 20% (v/v), zugesetzt sein. Weiterhin können Puffersubstanzen, wie z.B. Tris-, Acetat-, oder Phosphat-Puffer, im Bereich von 10 bis 500 mM, insbesondere 20 bis 150 oder 25 bis 100 mM, wie z.B. Natrium- oder insbesondere Kaliumphosphatpuffer zugesetzt werden. Der pH kann dabei im Bereich von 5,5 bis 9 insbesondere 6 bis 8, wie z.B. 7 bis 7,5 eingestellt werden.
- 15
16. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei man einen gegebenenfalls nicht mehr vermehrungsfähigen Ganzzellbiokatalysator im Reaktionsmedium einsetzt.
- 20
17. Verfahren nach Ausführungsform 16, wobei man den Ganzzellbiokatalysator dadurch gewinnt, dass man ihn aktiviert, indem man dessen Zellmembran schädigt, bevor man ihn dem Reaktionsmedium zusetzt.
- 25
- Es gibt mehrere Möglichkeiten, den Ganzzellbiokatalysator zu "aktivieren". Im Prinzip soll nur die Membran geschädigt werden, z.B. durch Einfrieren und Auftauen, oder durch Lagerung bei Raumtemperatur oder bei 4 °C oder dadurch, dass man die Zellmembranen chemisch oder mechanisch perforiert.
- 30
18. Verfahren zur Herstellung einer Ursodesoxycholsäure-Verbindung(UDCS) der Formel (1)

13

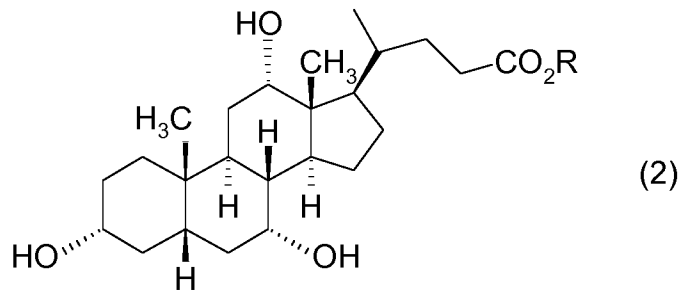


worin

R für Alkyl, H, ein Alkalimetallion oder $N(R^3)_4^+$ steht, worin die Reste R^3 gleich oder verschieden sind und für H oder Alkyl stehen, oder die Gruppe $-CO_2R$ durch die Säureamid-Gruppe
 5 $-CONR^1R^2$, ersetzt ist, worin R^1 und R^2 unabhängig voneinander für einen Alkylrest stehen;

wobei man

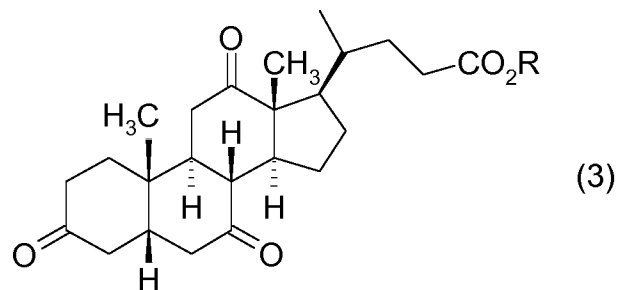
a) gegebenenfalls eine Cholsäure (CS) der Formel (2)



10

worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt oder die Gruppe $-CO_2R$ durch die Säureamid-Gruppe $-CONR^1R^2$, wie oben definiert ersetzt ist,
 zur Dehydrocholsäure-Verbindung (DHCS) der Formel (3)

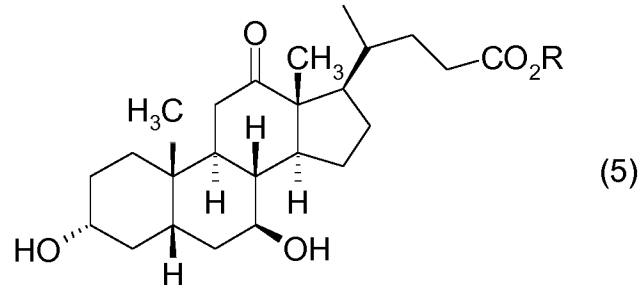
15



worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe $-CO_2R$ durch die Säureamid-Gruppe $-CONR^1R^2$, wie oben definiert ersetzt ist, oxidiert, wie z.B. chemisch oder enzymatisch, insbesondere chemisch oxidiert;

20

b) DHCS mittels eines biokatalytischen Verfahrens nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen zur korrespondierenden 12-Keto-ursodesoxycholsäure-Verbindung (12-Keto UDCS) der Formel (5)



5

worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wie oben definiert ersetzt ist, reduziert und anschließend

c) 12-Keto-UDCS der Formel (5) chemisch zur UDCS-Verbindung reduziert; und

10

d) das Reaktionsprodukt gegebenenfalls weiter aufreingt.

19. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei die Enzymaktivitäten in folgenden Konzentrationsbereich im Reaktionsansatz enthalten sind

15

(1) 7β -HSDH: 100 bis 3000, wie z.B. 100 bis 1500, wie z.B. 500 bis 1000 U/g_{BTM}

(2) 3α -HSDH: 50 bis 500, wie z.B. 10 bis 300 U/g_{BTM}

(3) GDH: 100 bis 2000, wie z.B. 200 bis 1000 U/g_{BTM}

wobei c_{Kat} im Bereich von 0,05 bis 50, 0,1 bis 10, insbesondere 0,5 bis 5 $\text{g}_{\text{BTM}} \text{L}^{-1}$; liegt.

20

20. 7β -Hydroxysteroiddehydrogenase (7β -HSDH), welche wenigstens die stereospezifische enzymatische Reduktion eines 7-Ketosteroids zum korrespondierenden 7-Hydroxysteroid katalysiert, wobei das Enzym je eine Mutation in den Positionen G39 und R40 von SEQ ID NO:2 sowie gegebenenfalls in den Positionen R41 und/ gegebenenfalls der Position K44 von SEQ ID NO:2 oder in den jeweils korrespondierenden Sequenzpositionen einer davon abgeleiteten Aminosäuresequenz mit wenigstens 80% Sequenzidentität zu SEQ ID NO:2, wie z.B. wenigstens 85, oder 90, wie z.B. wenigstens 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 oder 99,5% zu dieser Sequenz, umfasst.

25

21. 7β -HSDH nach Ausführungsform 20, umfassend die Doppelmutation G39D/R40F.

30

22. 7β -HSDH nach Ausführungsform 20 oder 21, umfassend die Dreifachmutation

G39D/R40F/R41X₁, wobei X₁ für einen beliebigen andere Aminosäurerest, insbesondere proteinogenen Aminosäurerest, insbesondere eine die NADH-Spezifität erhöhenden Rest, insbesondere für K, Q, S oder R und vor allem für K steht.

- 5 23. 7 β -HSDH nach einer der Ausführungsformen 20 bis 22, umfassend die Vierfachmutation G39D/R40F/R41X₁,/K44X₂, wobei X₁ für einen beliebigen andere Aminosäurerest, insbesondere proteinogenen Aminosäurerest, insbesondere eine die NADH-Spezifität erhöhenden Rest insbesondere für K, Q, S oder R und vor allem K steht, und X₂ für einen beliebigen andere Aminosäurerest, insbesondere proteinogenen Aminosäurerest, insbesondere eine die NADH-Spezifität erhöhenden Rest, insbesondere für G, N oder Q, und vor allem G steht.
- 10
24. 7 β -HSDH nach einer der Ausführungsformen 20 bis 23, die im Vergleich zur 7 β -HSDH mit SEQ ID NO:2 folgendes Eigenschaftsprofil zeigt:
- 15
- a) eine erhöhte spezifische Aktivität (V_{max} [U/mg]) für NADH bei der enzymatischen Reduktion von DHCA mit NADH als Cofaktor; und ggf.
 - b) eine erhöhte spezifische Aktivität (V_{max} [U/mg]) für NADH bei der enzymatischen Reduktion von 7-Ketosteroiden (insbesondere Gallensalzen mit einer Ketogruppe in Position C7 des Steroidrings), mit NADH als Cofaktor;
- 20
25. Nukleotidsequenz kodierend für eine 7 β -HSDH nach einer der Ausführungsformen 20 bis 24.
- 25 26. Expressionskassette, umfassend unter der Kontrolle wenigstens einer regulatoriver Sequenz wenigstens eine Nukleotidsequenz nach Ausführungsform 25, sowie ggf. kodierende Sequenzen für wenigstens ein (wie z.B. 1, 2 oder 3) weiteres Enzym, ausgewählt unter Hydroxysteroiddehydrogenasen, insbesondere 3 α -HSDH, und zur Kofaktorregenerierung geeignete Dehydrogenasen, wie z.B. FDH, GDH, ADH, G-6-PDH, PDH. Insbesondere können die in einer Expressions-Kassette enthaltenen Enzyme verschiedene, bevorzugt aber gleiche Kofaktorenpaare nutzen, wie z.B. das Kofaktorenpaar NAD⁺/NADH oder NADP⁺/NADPH.
- 30
27. Expressionsvektor, umfassend wenigstens eine Expressionskassette nach Ausführungsform 26.
- 35
28. Rekombinanter Mikroorganismus, der wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß Ausführungsform 25 oder wenigstens eine Expressionskassette nach Ausführungsform 26

oder wenigstens einen Expressionsvektor nach Ausführungsform 27 trägt.

29. Rekombinanter Mikroorganismus nach Ausführungsform 28, der zusätzlich gegebenfalls die kodierende Sequenz für wenigstens ein weiteres Enzym, ausgewählt unter Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSDH) und zur Cofaktorregenerierung geeignete Dehydrogenasen, trägt.

30. Rekombinanter Mikroorganismus nach Ausführungsform 29, wobei die weitere HSDH ausgewählt ist unter 3α -HSDHs; und die Dehydrogenase ausgewählt ist unter NADH-regenerierenden Enzymen, wie NADH Dehydrogenasen, Alkoholdehydrogenasen (ADH), und NADH regenerierenden Formiatdehydrogenasen (FDH), sowie Glucosedehydrogenase (GDH), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH), oder Phosphit-Dehydrogenasen (PtDH), sowie NADH regenerierenden Glucosedehydrogenasen (GDH).

31. Rekombinanter Mikroorganismus nach einer der Ausführungsformen 28 bis 30 welcher ein 7α -HSDH knock-out Stamm ist.

32. Verfahren nach einer der Ausführungsformen 1 bis 19, durchgeführt unter Verwendung eines Mikroorganismus nach einer der Ausführungsformen 28 bis 30.

33. Verfahren zur enzymatischen oder mikrobiellen Synthese von 7β -Hydroxysteroiden, wobei man das korrespondierende 7-Ketosteroid in Gegenwart einer 7β -HSDH gemäß der Definition in einer der Ausführungsformen 20 bis 24 oder in Gegenwart eines diese 7β -HSDH exprimierenden rekombinanten Mikroorganismus nach einer der Ausführungsformen 28 bis 32 reduziert, und gegebenenfalls wenigstens ein gebildetes Reduktionsprodukt aus dem Reaktionsansatz isoliert.

34. Verfahren nach Ausführungsform 33, wobei das 7- Ketosteroid ausgewählt ist unter Dehydrocholsäure (DHCA), 7-Keto-lithocholsäure (7-Keto-LCS), 7,12-Diketo-lithocholsäure (7,12-Diketo-LCS) und den Derivaten davon, wie insbesondere einem Salz, Amid oder Alkylester der Säure.

35. Verfahren nach Ausführungsform 33 oder 34, wobei die Reduktion in Gegenwart und insbesondere unter Verbrauch von NADH und/oder NAPH ; insbesondere unter Ver-

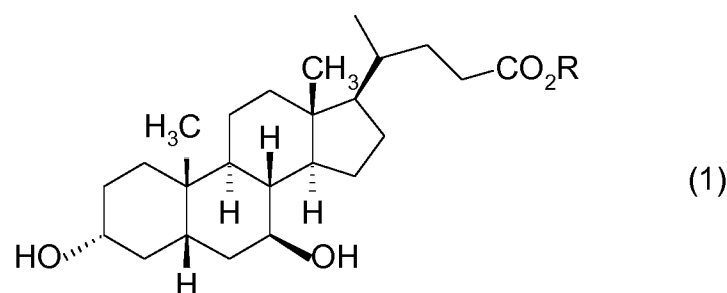
brauch von NADH erfolgt.

36. Verfahren nach Ausführungsform 35, wobei verbrauchtes NADH durch Kopplung mit einem NADH-regenerierenden Enzym regeneriert wird, wobei dieses insbesondere ausgewählt ist unter NADPH Dehydrogenasen, Alkoholdehydrogenasen (ADH), und NADH regenerierenden Formiatdehydrogenasen (FDH) und einer NADH-regenerierenden Glucosedehydrogenase (GDH), wobei das NADH-regenerierende Enzym gegebenenfalls von einem rekombinanten Mikroorganismus exprimiert wird;

und/oder wobei verbrauchtes NADPH durch Kopplung mit einem NADPH-regenerierenden Enzym regeneriert wird, wobei dieses insbesondere ausgewählt ist unter NADPH-Dehydrogenasen, NADPH-regenerierenden Formiatdehydrogenasen (FDH), NADPH-regenerierenden Alkoholdehydrogenasen (ADH), NADPH-regenerierenden Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenasen (G6PDH), NADH-regenerierenden Phosphitdehydrogenasen (PtDH) sowie NADPH-regenerierenden Glucosedehydrogenasen (GDH), wobei das NADPH-regenerierende Enzym ggf. in einem rekombinanten Mikroorganismus exprimiert wird

37. Verfahren nach Ausführungsform 36, wobei das NADPH-regenerierende Enzym ausgewählt ist unter GDHs.

38. Verfahren zur Herstellung von Ursodesoxycholsäure (UDCS) der Formel (1)

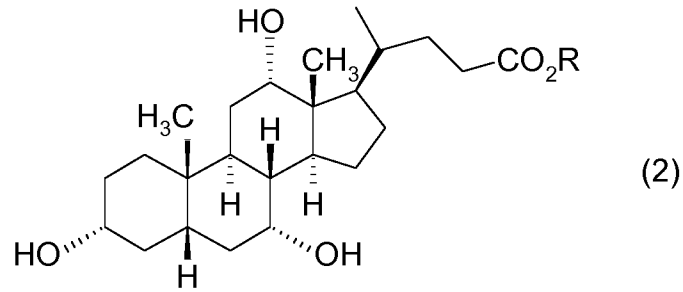


25 worin

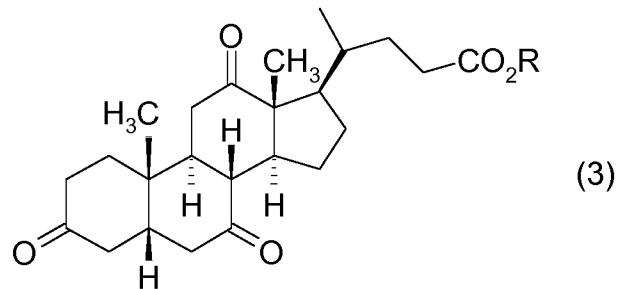
R für Alkyl, H, ein Alkalimetallion oder $N(R^3)_4^+$ steht, worin die Reste R^3 gleich oder verschieden sind und für H oder Alkyl stehen, oder die Gruppe $-CO_2R$ durch die Säureamid-Gruppe $-CONR^1R^2$, ersetzt ist, worin R^1 und R^2 unabhängig voneinander für einen Alkylrest stehen;

30 wobei man

a) gegebenenfalls eine Cholsäure (CS) der Formel (2)



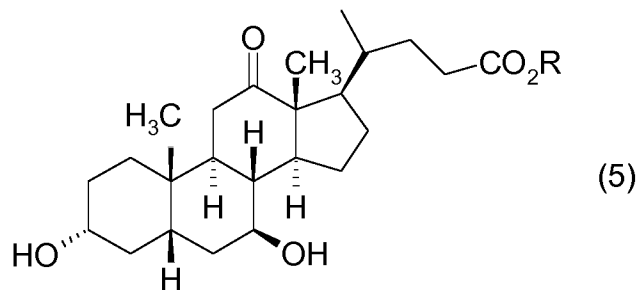
5 worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wie oben definiert ersetzt ist, zur Dehydrocholsäure (DHCS) der Formel (3)



10 worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wie oben definiert ersetzt ist, oxidiert, wie z.B. chemisch oder enzymatisch, insbesondere chemisch oxidiert;

;

15 b) DHCS in Gegenwart wenigstens einer 7β -HSDH-Mutante gemäß der Definition in einer der Ausführungsformen 20 bis 24 und in Gegenwart wenigstens einer 3α -HSDH zur korrespondierenden 12-Keto-ursodesoxycholsäure (12-Keto UDCS) der Formel (5)



20 worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wie oben definiert ersetzt ist, insbesondere in Gegenwart

und unter Verbrauch von NADH und /oder NADPH
reduziert und anschließend

c) 12-Keto-UDCS der Formel (5) chemisch zu UDCS reduziert; und

5

d) das Reaktionsprodukt gegebenenfalls weiter aufreingt.

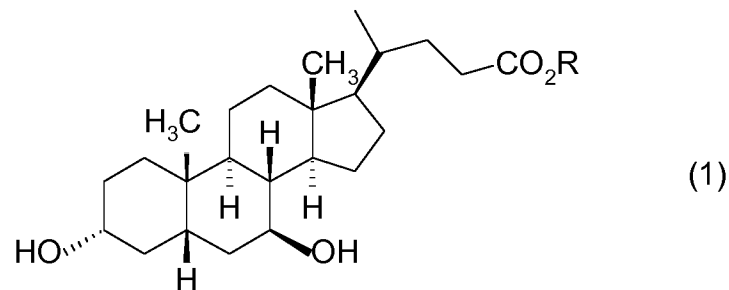
39. Verfahren nach Ausführungsform 38 wobei zumindest Schritt b) in Gegenwart
eines rekombinanten Mikroorganismus nach einem der Ausführungsformen 28 bis 32 durch-
geführt werden.

10

40. Verfahren nach Ausführungsform 38 oder 39, wobei Schritt b) mit gleichen oder
verschiedenen Kofaktorregenerierungssystemen gekoppelt ist.

15

41. Verfahren zur Herstellung von UDCS der Formel (1)



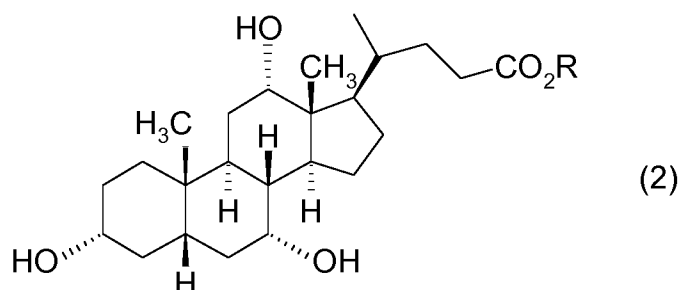
worin

R für Alkyl, NR^1R^2 , H, ein Alkalimetallion oder $\text{N}(\text{R}^3)_4^+$ steht, worin die Reste R^3 gleich oder
verschieden sind und für H oder Alkyl stehen oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-
Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wie oben definiert ersetzt ist

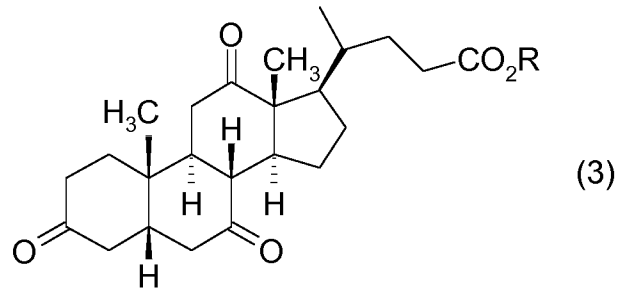
20

wobei man

25 a) gegebenenfalls eine CS der Formel (2)



worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wie oben definiert ersetzt ist, zur DHCS der Formel (3)



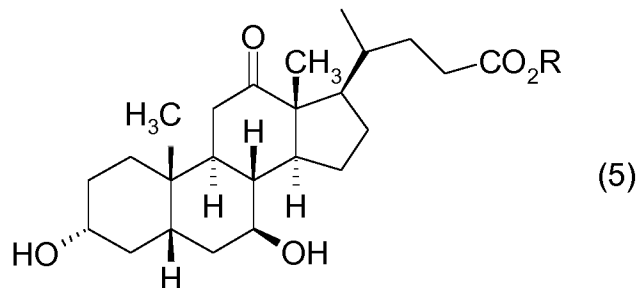
5

worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$ wie oben definiert ersetzt ist oxidiert, wie z.B. chemisch oder enzymatisch, insbesondere chemisch oxidiert;

;

10

b) DHCS in Gegenwart wenigstens einer 7β -HSDH und in Gegenwart wenigstens einer 3α -HSDH zur korrespondierenden 12-Keto UDCS der Formel (5)



15 worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$ wie oben definiert ersetzt ist, insbesondere in Gegenwart und unter Verbrauch von NADH und/oder NADPH, reduziert und anschließend

c) 12-Keto-UDCS der Formel (5) chemisch zu UDCS reduziert; und

20

d) das Reaktionsprodukt gegebenenfalls weiter aufreingt;

wobei die Umsetzungen des Schritts b) in Gegenwart eines rekombinanten Mikroorganismus nach einer der Ausführungsformen 28 bis 32 erfolgen.

25

Vorliegende Erfindung ist nicht auf die hierin beschriebenen konkreten Ausführungsformen

beschränkt. Der Fachmann wird durch die Lehre der vorliegenden Erfindung vielmehr in die Lage versetzt, ohne unzumutbaren Aufwand weitere Ausgestaltungen der Erfindung bereitzustellen. So kann er beispielsweise auch weitere Enzymmutanten gezielt generieren und diese auf das gewünschte Eigenschaftsprofil (verbesserte Kofaktor-Abhängigkeit und /der
5 Stabilität, verringerte Substratinhibition) screenen und optimieren; oder weitere geeignete Wildtypenzyme (7 β - und 3 α -HSDHs, FDHs, GDHs ADHs usw) isolieren und erfindungsgemäß verwenden. Weiterhin kann er beispielsweise je nach Eigenschaftsprofil (insbesondere Kofaktor-Abhängigkeit) der verwendeten HSDHs, wie insbesondere 7 β -HSDH und 3 α -HSDH oder Mutanten davon, geeignete zur Kofaktorregenerierung brauchbare Dehydrogenasen
10 (GDH, FHD, ADH usw.) und Mutanten davon auswählen, und die ausgewählten Enzyme auf einen oder mehrere Expressionskonstrukte oder Vektoren verteilen und damit erforderlichenfalls einen oder mehrere rekombinante Mikroorganismen erzeugen, die dann ein optimiertes ganzzellbasiertes Herstellungsverfahren ermöglichen.

15 **Weitere Ausgestaltungen der Erfindung**

1. Allgemeine Definitionen und verwendete Abkürzungen

Ein „Ganzzellkatalysator“ umfasst sowohl lebensfähige (vermehrungsfähige, in jedem Wachstumsstadium befindliche) als auch nicht mehr lebensfähige Mikroorganismen, insbesondere rekombinante Mikroorganismen, welche die zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens erforderlichen Enzymaktivitäten vollständig oder wenigstens teilweise, in
20 exprimierter Form enthalten. Der Ganzzellkatalysator kann dabei zusätzlich eine durch chemische, mechanische oder sonstige Einwirkung (Temperatur, Lagerung) perforierte Zellwand aufweisen, um den Stoffaustausch (insbesondere Substrat, Produkt, Kofaktoren) mit dem umgebenden Reaktionsmedium weiter zu fördern.

25 Werden keine anderen Angaben gemacht, so bezeichnet der Begriff „7 β -HSDH“ ein Dehydrogenase-Enzym, welches wenigstens die stereospezifische und/oder regiospezifische Reduktion von DHCS oder 7,12-Diketo-UDCS (7,12-Diketo-LCS) zu 3,12-Diketo-UDCS oder 12-Keto-UDCS insbesondere unter stöchiometrischem Verbrauch von NADPH, und gegebenenfalls die entsprechende Umkehrreaktion katalysiert. Das Enzym kann dabei ein
30 natives bzw. rekombinant hergestelltes Enzym sein. Das Enzym kann grundsätzlich im Gemisch mit zellulären, wie z.B. Proteinverunreinigungen, vorzugsweise aber in Reinform vorliegen. Geeignete Nachweisverfahren sind z.B. im folgenden experimentellen Teil beschrieben oder aus der Literatur bekannt (z.B. *Characterization of NADP-dependent 7 beta-hydroxysteroid dehydrogenases from Peptostreptococcus productus and Eubacterium aerofaciens*. S Hirano and N Masuda. Appl Environ Microbiol. 1982). Enzyme dieser Aktivität
35 sind unter der EC Nummer 1.1.1.201 klassifiziert.

Werden keine anderen Angaben gemacht, so bezeichnet der Begriff „3 α -HSDH“ ein

Dehydrogenase-Enzym, welches wenigstens die stereospezifische und/oder regiospezifische Reduktion von 3,12-Diketo-UDCS oder DHCS zu 12-Keto-UDCS oder 7,12-Diketo-UDCS (7,12-Diketo-LCS), insbesondere unter stöchiometrischem Verbrauch von NADH und/oder NADPH, und gegebenenfalls die entsprechende Umkehrreaktion katalysiert. Geeignete Nachweisverfahren sind z.B. im folgenden experimentellen Teil beschrieben oder aus der Literatur bekannt. Geeignete Enzyme sind z.B. aus *Comanomonas testosteroni* (z.B. ATCC11996) erhältlich. Eine NADPH abhängige 3 α -HSDH ist z.B. aus der Nagern bekannt und ebenfalls einsetzbar. (Cloning and sequencing of the cDNA for rat liver 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase, J E Pawlowski, M Huizinga and T M Penning, May 15, 1991 The Journal of Biological Chemistry, 266, 8820-8825). Enzyme dieser Aktivität sind unter der EC Nummer 1.1.1.50 klassifiziert.

Werden keine anderen Angaben gemacht, so bezeichnet der Begriff „GDH“ ein Dehydrogenase-Enzym, welches wenigstens die Oxidation von β -D-Glucose zu D-Glucono-1,5-Lacton unter stöchiometrischem Verbrauch von NAD⁺ und/oder NADP⁺ sowie ggf. die entsprechende Umkehrreaktion katalysiert. Geeignete Enzyme sind z.B. aus *Bacillus subtilis* oder *Bacillus megaterium* erhältlich. Enzyme dieser Aktivität sind unter der EC Nummer 1.1.1.47 klassifiziert.

Werden keine anderen Angaben gemacht, so bezeichnet der Begriff „FDH“ ein Dehydrogenase-Enzym, welches wenigstens die Oxidation von Ameisensäure (oder korrespondierenden Formiat-Salzen) zu Kohlendioxid unter stöchiometrischem Verbrauch von NAD⁺ und/oder NADP⁺, und gegebenenfalls die entsprechende Umkehrreaktion katalysiert. Geeignete Nachweisverfahren sind z.B. im folgenden experimentellen Teil beschrieben oder aus der Literatur bekannt. Geeignete Enzyme sind z.B. aus *Candida boidinii*, *Pseudomonas sp.*, oder *Mycobacterium vaccae* erhältlich. Enzyme dieser Aktivität sind unter der EC Nummer 1.2.1.2 klassifiziert.

Unter einer „Reinform“ oder einem „reinen“ oder „im wesentlichen reinen“ Enzym versteht man erfindungsgemäß ein Enzym mit einem Reinheitsgrad von mehr als 80, vorzugsweise mehr als 90, insbesondere mehr als 95, und vor allem mehr als 99 Gew.-%, bezogen auf den Gesamtproteingehalt, bestimmt mit Hilfe üblicher Proteinnachweismethoden, wie z.B. der Biuret-Methode oder dem Proteinnachweis nach Lowry et al. (vgl. Beschreibung in R.K. Scopes, Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin (1982)).

Unter einem „Redoxäquivalent“ versteht man eine als Elektronendonator bzw. Elektronenakzeptor brauchbare, niedermolekulare organische Verbindung, wie beispielsweise Nikotinamidderivate wie NAD⁺ und NADH⁺ bzw. deren reduzierte Formen NADH bzw. NADPH. „Redoxäquivalent“ und „Kofaktor“ werden im Kontext der vorliegenden Erfindung als Synonym verwendet. So kann ein „Kofaktor“ im Sinne der Erfindung auch als „redoxfähiger Kofaktor“, d.h. als Kofaktor, der in reduzierter und einer oxidierten Form vorliegen kann, um-

schrieben werden.

Unter einem „verbrauchten“ Kofaktor versteht man diejenige reduzierte bzw. oxidierte Form des Kofaktors, die im Verlauf einer vorgegebene Reduktions- bzw. Oxidationsreaktion eines Substrats in die korrespondierende oxidierte bzw. reduzierte Form überführt wird.

5 Durch Regenerierung wird die bei der Reaktion gebildete oxidierte bzw. reduzierte Kofaktor-Form wieder in die reduzierte bzw. oxidierte Ausgangsform zurück überführt, so dass diese für die Umsetzung des Substrats wieder zur Verfügung steht.

Unter einer „veränderten Kofaktor-Nutzung“ versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine qualitative oder quantitative Veränderung im Vergleich zu einer Referenz. Insbesondere ist eine veränderte Kofaktor-Nutzung durch Vornahme von Aminosäuresequenzmutationen zu beobachten. Diese Veränderung ist dann im Vergleich zum nicht-mutierten Ausgangsenzym feststellbar. Dabei kann die Aktivität in Bezug auf einen bestimmten Kofaktor durch Vornahme einer Mutation erhöht oder erniedrigt oder vollständig unterbunden werden. Eine veränderte Kofaktor-Nutzung umfasst aber auch Änderungen dergestalt, dass anstelle einer Spezifität für einen einzelnen Kofaktor nunmehr wenigstens ein weiterer, vom ersten Kofaktor verschiedener, zweiter Kofaktor nutzbar ist (d.h. es liegt eine erweiterte Kofaktor-Nutzung vor) Umgekehrt kann aber auch eine ursprünglich vorhandene Befähigung zur Nutzung zweier verschiedener Kofaktoren so abgeändert werden, dass Spezifität nur für einen dieser Kofaktoren erhöht bzw. für einen dieser Kofaktoren verringert oder vollständig aufgehoben wird. So kann beispielsweise ein Enzym, das vom Kofaktor NAD (NADH) abhängig ist, aufgrund einer Veränderung der Kofaktor-Nutzung nunmehr sowohl von NAD (NADH) als auch vom Kofaktor NADP (NADPH) abhängig sein oder die ursprüngliche Abhängigkeit von NAD (NADH) kann vollständig in eine Abhängigkeit von NADP (NADPH) überführt werden und umgekehrt.

25 Die Begriffe „NAD⁺/NADH-Abhängigkeit“ bzw. „NADP⁺/NADPH-Abhängigkeit“ sind erfindungsgemäß, wenn nicht anders definiert, weit auszulegen. Diese Begriffe umfassen sowohl „spezifische“ Abhängigkeiten, d.h. ausschließlich Abhängigkeit von NAD⁺/NADH bzw. NADP⁺/NADPH, als auch die Abhängigkeit der erfindungsgemäß verwendeten Enzyme von beiden Kofaktoren, d.h. Abhängigkeit von NAD⁺/NADH und NADP⁺/NADPH.

30 Entsprechendes gilt für die verwendeten Begriffe „NAD⁺/NADH-akzeptierend“ bzw. „NADP⁺/NADPH-akzeptierend“.

Die Begriffe „NAD⁺/NADH-regenerierend“ bzw. „NADP⁺/NADPH-regenerierend“ sind erfindungsgemäß, wenn nicht anders definiert, weit auszulegen. Diese Begriffe umfassen sowohl „spezifische“ d.h. ausschließliche Befähigung verbrauchten Kofaktor NAD⁺/NADH bzw. NADP⁺/NADPH zu regenerieren, als auch die Befähigung beide Kofaktoren, d.h. NAD⁺/NADH und NADP⁺/NADPH, zu regenerieren.

„Proteinogene“ Aminosäuren umfassen insbesondere (Einbuchstabencode): G, A, V,

L, I, F, P, M, W, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, R und H.

Unter einer „Immobilisierung“ versteht man erfindungsgemäß die kovalente oder nicht-kovalente Bindung eines erfindungsgemäß verwendeten Biokatalysators, wie z.B. einer 7 β -HSDH an einem festen, d.h. in dem umgebenden flüssigen Medium im Wesentlichen unlöslichen, Trägermaterial. Erfindungsgemäß können entsprechend auch ganze Zellen, wie die erfindungsgemäß verwendeten, rekombinanten Mikroorganismen, mit Hilfe derartiger Träger immobilisiert sein.

Eine „im Vergleich zum nicht-mutierten Enzym verringerte Substratinhibition“ bedeutet, dass das die beim nicht-mutierten Enzym für ein bestimmtes Substrat beobachtete Substratinhibition nicht mehr zu beobachten ist, d.h. im Wesentlichen nicht mehr messbar ist, oder erst bei höherer Substratkonzentration einsetzt, d.h. der K_i -Wert erhöht ist.

Unter einer „Cholsäure-Verbindung“ versteht man erfindungsgemäß Verbindungen mit dem Kohlenstoffgrundgerüst, insbesondere der Steroidstruktur der Cholsäure und dem Vorhandensein von Keto- und/oder Hydroxy- oder Acyloxy-Gruppen in der Ringposition 7 und gegebenenfalls den Ringpositionen 3 und/oder 12.

Unter einer Verbindung eines speziellen Typs, wie z.B. einer „Cholsäure-Verbindung“ oder einer „Ursodesoxycholsäure-Verbindung“ versteht man insbesondere auch Derivate der zugrunde liegenden Ausgangsverbindung (wie z.B. Cholsäure oder Ursodesoxycholsäure).

Derartige Derivate umfassen „Salze“, wie z.B. Alkalimetallsalze wie Lithium-, Natrium- und Kaliumsalze der Verbindungen; sowie Ammoniumsalze, wobei man unter einem Ammoniumsalz das NH_4^+ -Salz bzw. solche Ammoniumsalze umfasst, worin wenigstens ein Wasserstoffatom durch einen C_1 - C_6 -Alkylrest ersetzt sein kann. Typische Alkylreste sind insbesondere C_1 - C_4 -Alkylreste, wie Methyl, Ethyl, n- oder i-Propyl-, n-, sec- oder tert-Butyl, sowie n-Pentyl und n-Hexyl und die ein- oder mehrfach verzweigten Analoga davon

„Alkylester“ erfindungsgemäßer Verbindungen sind insbesondere Niedrigalkyl-Ester, wie z.B. C_1 - C_6 -Alkylester. Als nicht limitierende Beispiele sind zu nennen Methyl-, Ethyl-, n- oder i-Propyl-, n-, sec- oder tert-Butylester, oder längerkettige Ester, wie z.B. n-Pentyl- und n-Hexylester sowie die ein- oder mehrfach verzweigten Analoga davon.

„Amide“ sind insbesondere Umsetzungsprodukte erfindungsgemäßer Säuren mit Ammoniak oder primären oder sekundären Monoaminen. Derartige Amine sind beispielsweise Mono- oder Di- C_1 - C_6 -Alkyl-monoamine, wobei die Alkylreste unabhängig voneinander gegebenenfalls weiter substituiert sein können, wie z.B. durch Carboxy-, Hydroxy-, Halogen (wie F, Cl, Br, J)-, Nitro- und Sulfonatgruppen.

Erfindungsgemäße „Acygruppen“ sind insbesondere nichtaromatische Gruppen mit 2 bis 4 Kohlenstoffatomen, wie z.B. Acetyl, Propionyl und Butyryl, sowie aromatische Gruppen mit gegebenenfalls substituiertem einkernigen aromatischem Ring, wobei geeignete Substituenten z.B. ausgewählt sind unter Hydroxy-, Halogen (wie F, Cl, Br, J)-, Nitro- und

C₁-C₆-Alkylgruppen, wie z.B. Benzoyl oder Toluoyl.

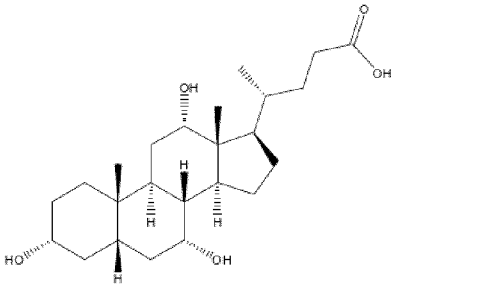
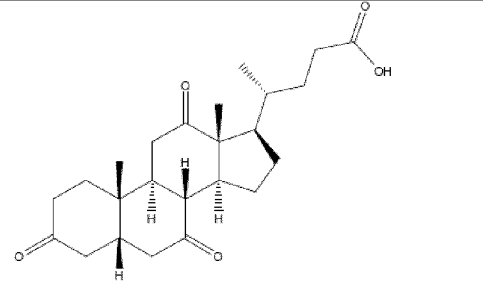
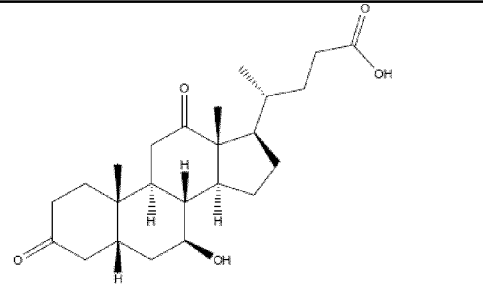
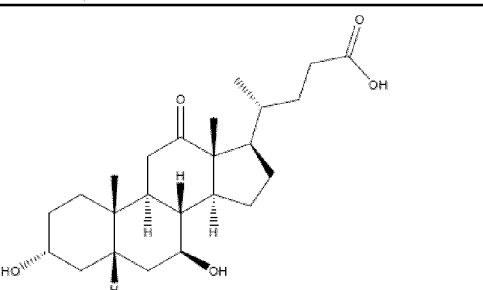
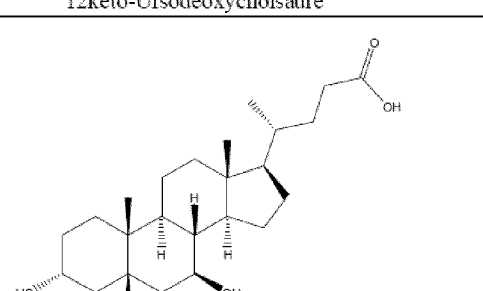
Die erfindungsgemäß eingesetzten bzw. hergestellten Hydroxysteroidverbindungen, wie z.B. Cholsäure, Ursodesoxycholsäure, 12-Keto-Chenodesoxycholsäure, Chenodesoxycholsäure und 7-Keto-Lithocholsäure können in stereoisomerenreiner Reinform oder im
5 Gemisch mit anderen Stereoisomeren im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt oder daraus erhalten werden. Vorzugsweise werden jedoch die eingesetzten bzw. die hergestellten Verbindungen in im Wesentlichen stereoisomerenreiner Form eingesetzt bzw. isoliert.

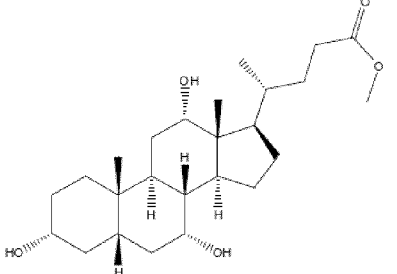
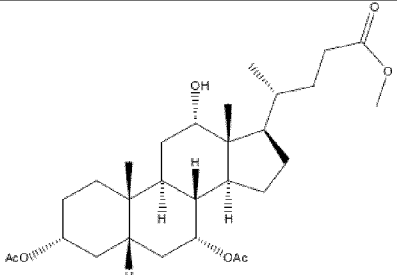
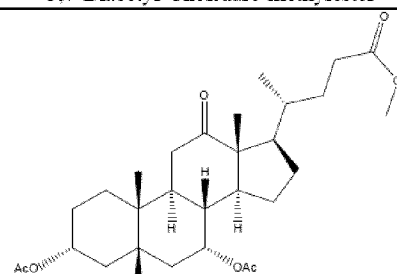
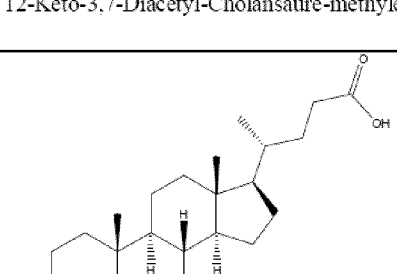
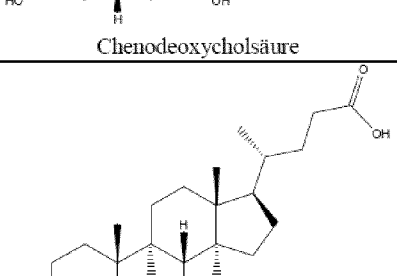
Hierin verwendete Synonyme sind CDCS und CDCA; UDCS und UDCA; DHCS und DHCA; NAD und NAD⁺; NADP und NADP⁺.

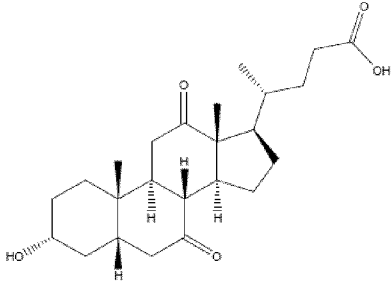
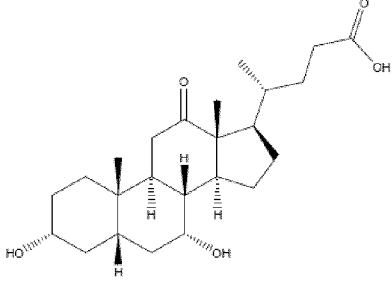
10 „BTM“ steht für Bakterientrockenmasse.

In folgender Tabelle 1 sind die Strukturformeln, deren chemischen Namen und die verwendeten Abkürzungen wesentlicher chemischer Verbindungen tabellarisch zusammengefasst:

15 **Tabelle 1**

Formel	Abkürzung	Chemischer Name
 <p data-bbox="375 544 470 568">Cholsäure</p>	CS	Cholsäure
 <p data-bbox="343 860 518 884">Dehydrocholsäure</p>	DHCS	Dehydrocholsäure
 <p data-bbox="295 1176 566 1200">3,12-Diketo-7β-Cholsäure</p>	3,12-Diketo-7β-CS	3,12-Diketo-7β-Cholsäure
 <p data-bbox="295 1512 550 1536">12keto-Ursodeoxycholsäure</p>	12Keto-UDCS	12Keto-Ursodeoxycholsäure
 <p data-bbox="343 1848 534 1872">Ursodeoxycholsäure</p>	UDCS	Ursodeoxycholsäure

Formel	Abkürzung	Chemischer Name
 <p>Cholsäure-methylester</p>	CS-Methylester	Cholsäure-methylester
 <p>3,7-Diacetyl-Cholsäure-methylester</p>	3,7-Diacetyl-CS-methylester	3,7-Diacetyl-Cholsäure-methylester*
 <p>12-Keto-3,7-Diacetyl-Cholansäure-methylester</p>	12-Keto-3,7-Diacetyl-CS-methylester	12-Keto-3,7-Diacetyl-Cholansäure-methylester*
 <p>Chenodeoxycholsäure</p>	CDCS	Chenodeoxycholsäure
 <p>7-Keto-Lithocholsäure</p>	7-Keto-LCS	7-Keto-Lithocholsäure

Formel	Abkürzung	Chemischer Name
 <p>7,12-Diketo-Lithocholsäure</p>	7,12-Diketo-LCS	7,12-Diketo-Lithocholsäure
 <p>12-Keto-Chenodeoxycholsäure</p>	12-Keto-CDCS	12-Keto-Chenodeoxycholsäure

3,12-Diketo-7beta-Cholansäure ist ein Synonym für 3,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure (3,12-Diketo-UDCS)

7,12-Diketo-Lithocholsäure ist ein Synonym für 7,12-Diketo-Ursodesoxycholsäure (7,12-Diketo-UDCS).

5

2. Proteine

Die vorliegende Erfindung ist nicht auf die hierin konkret offenbarten Proteine bzw. Enzyme insbesondere mit 7 β -HSDH-, FDH-, GDH- oder 3 α -HSDH Aktivität bzw. deren Mutanten beschränkt, sondern erstreckt sich vielmehr auch auf funktionale Äquivalente davon.

10

„Funktionale Äquivalente“ oder Analoga der konkret offenbarten Enzyme sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Polypeptide, welche weiterhin die gewünschte biologische Aktivität, wie z.B. 7 β HSDH-Aktivität, besitzen.

So versteht man beispielsweise unter „funktionalen Äquivalenten“ Enzyme, die im verwendeten Test auf 7 β -HSDH-, FDH-, GDH- oder 3 α -HSDH -Aktivität eine um mindestens 1% , wie z.B. mindestens 10% oder 20 %, wie z.B. mindestens 50 % oder 75% oder 90 % höhere oder niedrigere Aktivität eines Ausgangs-Enzyms, umfassend eine hierin definierte Aminosäuresequenz aufweisen.

15

Funktionale Äquivalente sind außerdem vorzugsweise zwischen pH 4 bis 11 stabil und besitzen vorteilhaft ein pH-Optimum in einem Bereich von pH 6 bis 10, wie insbesondere 8,5 bis 9,5, sowie ein Temperaturoptimum im Bereich von 15°C bis 80°C oder 20°C bis 70°C, wie z.B. etwa 45 bis 60°C oder etwa 50 bis 55°C.

20

Die 7 β -HSDH-Aktivität kann mit Hilfe verschiedener bekannter Tests nachgewiesen werden. Ohne darauf beschränkt zu sein, sei ein Test unter Verwendung eines Referenz-

substrates, wie z. B. CS oder DHCS, unter standardisierten Bedingungen wie im experimentellen Teil definiert, zu nennen.

Tests zur Bestimmung der FDH-, GDH- oder 3 α -HSDH –Aktivität sind ebenfalls an sich bekannt.

5 Unter „funktionalen Äquivalenten“ versteht man erfindungsgemäß insbesondere auch „Mutanten“, welche in wenigstens einer Sequenzposition der oben genannten Aminosäuresequenzen eine andere als die konkret genannte Aminosäure aufweisen aber trotzdem eine der oben genannten biologischen Aktivitäten besitzen. „Funktionale Äquivalente“ umfassen somit die durch eine oder mehrere, wie z.B. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14
10 oder 15, Aminosäure-Additionen, -Substitutionen, -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die genannten Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit dem erfindungsgemäßen Eigenschaftsprofil führen. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Reaktivitätsmuster zwischen Mutante und unverändertem Polypeptid qualitativ übereinstimmen, d.h.
15 beispielsweise gleiche Substrate mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden. Beispiele für geeignete Aminosäuresubstitutionen sind in folgender Tabelle 2 zusammengefasst:

Tabelle 2

<u>Ursprünglicher Rest</u>	<u>Beispiele der Substitution</u>
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn ; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg ; Gln ; Glu
Met	Leu ; Ile
Phe	Met ; Leu ; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp ; Phe
Val	Ile; Leu

20

„Funktionale Äquivalente“ im obigen Sinne sind auch „Präkursoren“ der beschriebenen Polypeptide sowie „funktionale Derivate“ und „Salze“ der Polypeptide.

„Präkursoren“ sind dabei natürliche oder synthetische Vorstufen der Polypeptide mit oder ohne der gewünschten biologischen Aktivität.

Unter dem Ausdruck „Salze“ versteht man sowohl Salze von Carboxylgruppen als auch Säureadditionssalze von Aminogruppen der erfindungsgemäßen Proteinmoleküle. Salze von Carboxylgruppen können in an sich bekannter Weise hergestellt werden und umfassen anorganische Salze, wie zum Beispiel Natrium-, Calcium-, Ammonium-, Eisen- und Zinksalze, sowie Salze mit organischen Basen, wie zum Beispiel Aminen, wie Triethanolamin, Arginin, Lysin, Piperidin und dergleichen. Säureadditionssalze, wie zum Beispiel Salze mit Mineralsäuren, wie Salzsäure oder Schwefelsäure und Salze mit organischen Säuren, wie Essigsäure und Oxalsäure sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

„Funktionale Derivate“ erfindungsgemäßer Polypeptide können an funktionellen Aminosäure-Seitengruppen oder an deren N- oder C-terminalen Ende mit Hilfe bekannter Techniken ebenfalls hergestellt werden. Derartige Derivate umfassen beispielsweise aliphatische Ester von Carbonsäuregruppen, Amide von Carbonsäuregruppen, erhältlich durch Umsetzung mit Ammoniak oder mit einem primären oder sekundären Amin; N-Acylderivate freier Aminogruppen, hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen; oder O-Acylderivate freier Hydroxylgruppen, hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen.

„Funktionale Äquivalente“ umfassen natürlich auch Polypeptide welche aus anderen Organismen zugänglich sind, sowie natürlich vorkommende Varianten. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen und in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente Enzyme ermitteln.

„Funktionale Äquivalente“ umfassen ebenfalls Fragmente, vorzugsweise einzelne Domänen oder Sequenzmotive, der erfindungsgemäßen Polypeptide, welche z.B. die gewünschte biologische Funktion aufweisen.

„Funktionale Äquivalente“ sind außerdem Fusionsproteine, welche eine der oben genannten Polypeptidsequenzen oder davon abgeleitete funktionale Äquivalente und wenigstens eine weitere, davon funktionell verschiedene, heterologe Sequenz in funktioneller N- oder C-terminaler Verknüpfung (d.h. ohne gegenseitigen wesentliche funktionelle Beeinträchtigung der Fusionsproteinteile) aufweisen. Nichtlimitierende Beispiele für derartige heterologe Sequenzen sind z.B. Signalpeptide, Histidin-Anker oder Enzyme.

Erfindungsgemäß mit umfasste „funktionale Äquivalente“ sind Homologe zu den konkret offenbarten Proteinen. Diese besitzen wenigstens 60 %, vorzugsweise wenigstens 75% ins besondere wenigsten 85 %, wie z.B. 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97,98 oder 99%, Homologie (bzw. Identität) zu einer der konkret offenbarten Aminosäuresequenzen, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad, Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448. Eine prozentuale Homologie bzw. Identität eines erfindungsgemäßen homologen Polypeptids bedeutet insbesondere prozentuale Identität der Aminosäurereste bezogen

auf die Gesamtlänge einer der hierin konkret beschriebenen Aminosäuresequenzen.

Die prozentualen Identitätswerte können auch anhand von BLAST Alignments, Algorithmus blastp (protein-protein BLAST), oder durch Anwendung der unten angegebenen Clustal Einstellungen ermittelt werden.

5 Im Falle einer möglichen Proteinglykosylierung umfassen erfindungsgemäße „funktionale Äquivalente“ Proteine des oben bezeichneten Typs in deglykosylierter bzw. glykosylierter Form sowie durch Veränderung des Glykosylierungsmusters erhältliche abgewandelte Formen.

10 Homologe der erfindungsgemäßen Proteine oder Polypeptide können durch Mutagenese erzeugt werden, z.B. durch Punktmutation, Verlängerung oder Verkürzung des Proteins.

15 Homologe der erfindungsgemäßen Proteine können durch Screening kombinatorischer Banken von Mutanten, wie z.B. Verkürzungsmutanten, identifiziert werden. Beispielsweise kann eine variierte Bank von Protein-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt werden, wie z.B. durch enzymatisches Ligieren eines Gemisches synthetischer Oligonukleotide. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller Homologer aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt werden, und das synthetische Gen kann dann
20 in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Gensatzes ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher Sequenzen in einem Gemisch, die den gewünschten Satz an potentiellen Proteinsequenzen kodieren. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind dem Fachmann bekannt (z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984)
25 Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

Im Stand der Technik sind mehrere Techniken zum Screening von Genprodukten kombinatorischer Banken, die durch Punktmutationen oder Verkürzung hergestellt worden sind, und zum Screening von cDNA-Banken auf Genprodukte mit einer ausgewählten Eigenschaft bekannt. Diese Techniken lassen sich an das schnelle Screening der Genbanken anpassen, die durch kombinatorische Mutagenese erfindungsgemäßer Homologer erzeugt worden sind. Die am häufigsten verwendeten Techniken zum Screening großer Genbanken, die einer Analyse mit hohem Durchsatz unterliegen, umfassen das Klonieren der Genbank in replizierbare Expressionsvektoren, Transformieren der geeigneten Zellen mit der resultierenden Vektorenbank und Exprimieren der kombinatorischen Gene unter Bedingungen, unter denen der Nachweis der gewünschten Aktivität die Isolation des Vektors, der das Gen
30 kodiert, dessen Produkt nachgewiesen wurde, erleichtert. Recursive-Ensemble-Mutagenese (REM), eine Technik, die die Häufigkeit funktioneller Mutanten in den Banken vergrößert,
35

kann in Kombination mit den Screeningtests verwendet werden, um Homologe zu identifizieren (Arkin und Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331).

Die Erfindung umfasst weiterhin die Anwendung des 7 β -HSDH-Wildtyps aus *Collin-*
 5 *sella aerofaciens* ATCC 25986, wie er in der älteren internationalen Patentanmeldung WO2011/064404 (PCT/EP2010/068576) der Anmelderin beschrieben ist, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird.

3. Nukleinsäuren und Konstrukte

10 3.1 Nukleinsäuren

Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen, die für ein hierin beschriebenes Enzym mit 7 β -HSDH-, FDH-, GDH- und/oder 3 α -HSDH Aktivität und deren Mutanten kodieren.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Nukleinsäuren mit einem bestimmten Identitätsgrad zu den hierin beschriebenen konkreten Sequenzen.

Unter „Identität“ zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleotide über die jeweils gesamte Nukleinsäurelänge verstanden, insbesondere die Identität, die durch Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameters:

	Gap opening penalty	10
25	Gap extension penalty	10
	Gap separation penalty range	8
	Gap separation penalty	off
	% identity for alignment delay	40
	Residue specific gaps	off
30	Hydrophilic residue gap	off
	Transition weighing	0

Pairwise alignment parameter:

	FAST algorithm	on
35	K-tuple size	1
	Gap penalty	3
	Window size	5

Number of best diagonals 5

Alternativ dazu kann die Identität auch nach Chenna, Ramu, Sugawara, Hideaki, Koike, Tadashi, Lopez, Rodrigo, Gibson, Toby J, Higgins, Desmond G, Thompson, Julie D.

5 Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. (2003) Nucleic Acids Res 31 (13):3497-500, gemäß Internetadresse: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html#> und mit den folgenden Parametern bestimmt werden:

	DNA Gap Open Penalty	15.0
10	DNA Gap Extension Penalty	6.66
	DNA Matrix	Identity
	Protein Gap Open Penalty	10.0
	Protein Gap Extension Penalty	0.2
	Protein matrix	Gonnet
15	Protein/DNA ENDGAP	-1
	Protein/DNA GAPDIST	4

Alle hierin erwähnten Nukleinsäuresequenzen (einzel- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen, wie z.B. cDNA und mRNA) sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen, wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seiten 896–897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligrationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen (einzel- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen, wie z.B. cDNA und mRNA), kodierend für eines der obigen Polypeptide und deren funktionalen Äquivalente, welche z.B. unter Verwendung künstlicher Nukleotidanaloga zugänglich sind.

Die Erfindung betrifft sowohl isolierte Nukleinsäuremoleküle, welche für erfindungsgemäße Polypeptide bzw. Proteine oder biologisch aktive Abschnitte davon kodieren, als auch Nukleinsäurefragmente, die z.B. zur Verwendung als Hybridisierungs sonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung von erfindungsgemäßer kodierenden Nukleinsäuren verwendet werden können.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem untranslatierte Sequenzen vom 3'- und/oder 5'-Ende des kodierenden Genbereichs enthalten

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementären Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

5 Die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von homologen Sequenzen in anderen Zelltypen und Organismen verwendbar sind. Solche Sonden bzw. Primer umfassen
gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter „stringenten“ Bedingungen (siehe
10 unten) an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B. etwa 40, 50 oder
75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges hybridisiert.

Ein „isoliertes“ Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch
15 rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen
Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül kann mittels molekularbiologischer Standard-Techniken und der erfindungsgemäß bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Beispielsweise kann cDNA aus einer geeigneten cDNA-Bank isoliert werden, indem
20 eine der konkret offenbarten vollständigen Sequenzen oder ein Abschnitt davon als Hybridisierungssonde und Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine der
25 offenbarten Sequenzen oder ein Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei die Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz erstellt wurden, verwendet werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und durch DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide können ferner durch Standard-Syntheseverfahren, z.B. mit einem automatischen
30 DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

Erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen oder Derivate davon, Homologe oder Teile dieser Sequenzen, lassen sich beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Bakterien, z.B. über genomische oder cDNA-Banken, isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den erfindungsgemäßen Sequenzen.
35

Unter „hybridisieren“ versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids an eine nahezu komplementäre Sequenz unter Standardbedingungen zu binden, während un-

ter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu können die Sequenzen zu 90-100% komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze.

Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide der konservierten Bereiche verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nucleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nucleinsäure (Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz) oder je nachdem welche Nucleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10 °C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nucleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58 °C in einer wässrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50% Formamid wie beispielsweise 42 °C in 5 x SSC, 50% Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20 °C bis 45 °C, bevorzugt zwischen etwa 30 °C bis 45 °C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30 °C bis 55 °C, bevorzugt zwischen etwa 45 °C bis 55 °C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nucleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nucleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik, wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nucleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Die „Hybridisierung“ kann insbesondere unter stringenten Bedingungen erfolgen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

Unter „stringenten“ Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die Inkubation bei 42°C über Nacht in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x
5 SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium-citrat), 50 mM Natrium Phosphat (pH7,6), 5x Denhardt Lösung, 10% Dextransulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschschrift der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.

Gegenstand der Erfindung sind auch Derivate der konkret offenbarten oder ableitbaren Nukleinsäuresequenzen.

10 So können weitere erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen z.B. von SEQ ID NO:1, 3 oder 7, abgeleitet sein und sich davon durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide unterscheiden, aber weiterhin für Polypeptide mit dem gewünschten Eigenschaftsprofil kodieren.

15 Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten oder Allelvarianten, davon.

20 Gegenstand sind ebenso durch konservative Nukleotidsubstitutionen (d.h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhältliche Sequenzen.

25 Gegenstand der Erfindung sind auch die durch Sequenzpolymorphismen von den konkret offenbarten Nukleinsäuren abgeleiteten Moleküle. Diese genetischen Polymorphismen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund der natürlichen Variation existieren. Diese natürlichen Variationen bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz eines Gens.

30 Unter Derivaten der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 60 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, bevorzugt mindestens 80 % Homologie, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % Homologie über den gesamten Sequenzbereich aufweisen (bezüglich Homologie auf Aminosäureebene sei auf obige Ausführungen zu den Polypeptiden verwiesen auf). Über Teilbereiche der Sequenzen können die Homologien vorteilhaft höher liegen.

35 Weiterhin sind unter Derivaten auch Homologe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, beispielsweise pilzliche oder bakterielle Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der kodierenden und nichtkodierenden DNA-Sequenz, zu verstehen. So besitzen z.B. Homologe auf DNA-Ebene eine Homologie von mindestens 40 %,

bevorzugt von mindestens 60 %, besonders bevorzugt von mindestens 70 %, ganz besonders bevorzugt von mindestens 80 % über den gesamten angegebenen DNA-Bereich.

Außerdem sind unter Derivaten beispielsweise Fusionen mit Promotoren zu verstehen. Die Promotoren, die den angegebenen Nukleotidsequenzen vorgeschaltet sind, können durch wenigstens einen Nukleotidaustausch, wenigstens eine Insertionen, Inversionen und/oder Deletionen verändert sein, ohne dass aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

Dem Fachmann sind darüber hinaus Verfahren zur Erzeugung funktionaler Mutanten bekannt.

Je nach verwendeter Technik kann der Fachmann völlig zufällige oder auch gezielte Mutationen in Gene oder auch nicht codierende Nukleinsäurebereiche (die beispielsweise für die Regulation der Expression wichtig sind) einbringen und anschließend Genbanken erstellen. Die dazu erforderlichen molekularbiologischen Methoden sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise beschrieben in Sambrook und Russell, *Molecular Cloning*. 3. Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.

Methoden zur Veränderung von Genen und somit zur Veränderung der durch diese codierten Protein sind dem Fachmann seit langem geläufig, wie beispielsweise

- die ortsspezifische Mutagenese, bei der gezielt einzelne oder mehrere Nukleotide eines Gens ausgetauscht werden (Trower MK (Hrsg.) 1996; *In vitro mutagenesis protocols*. Humana Press, New Jersey),

- die Sättigungsmutagenese, bei der an jeder beliebigen Stelle eines Gens ein Codon für eine beliebige Aminosäure ausgetauscht oder hinzugefügt werden kann (Kegler-Ebo DM, Docktor CM, DiMaio D (1994) *Nucleic Acids Res* 22:1593; Baretino D, Feigenbutz M, Valcárel R, Stunnenberg HG (1994) *Nucleic Acids Res* 22:541; Barik S (1995) *Mol Biotechnol* 3:1),

- die fehleranfällige Polymerase-Kettenreaktion (error-prone PCR), bei der Nukleotidsequenzen durch fehlerhaft arbeitende DNA-Polymerasen mutiert werden (Eckert KA, Kunkel TA (1990) *Nucleic Acids Res* 18:3739);

- das Passagieren von Genen in Mutator-Stämmen, in denen beispielsweise aufgrund defekter DNA-Reperaturmechanismen eine erhöhte Mutationsrate von Nukleotidsequenzen auftritt (Greener A, Callahan M, Jerpseth B (1996) *An efficient random mutagenesis technique using an E.coli mutator strain*. In: Trower MK (Hrsg.) *In vitro mutagenesis protocols*. Humana Press, New Jersey), oder

- das DNA-Shuffling, bei dem ein Pool aus nahe verwandten Genen gebildet und verdaut wird und die Bruchstücke als Templates für eine Polymerase-Kettenreaktion verwendet wer-

den, bei der durch wiederholte Strangtrennung und Wiederannäherung letztendlich Mosaikgene voller Länge erzeugt werden (Stemmer WPC (1994) Nature 370:389; Stemmer WPC (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:10747).

5 Unter Anwendung der sogenannten gerichteten Evolution („directed evolution“; beschrieben unter anderem in Reetz MT und Jaeger K-E (1999), Topics Curr Chem 200:31; Zhao H, Moore JC, Volkov AA, Arnold FH (1999), Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution, In: Demain AL, Davies JE (Hrsg.) Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology) kann der Fachmann auch in gezielter
10 Weise und auch in großem Maßstab funktionale Mutanten erzeugen. Dabei werden in einem ersten Schritt zunächst Genbanken der jeweiligen Proteine erzeugt, wobei beispielsweise die oben angegebenen Methoden zur Anwendung kommen können. Die Genbanken werden auf geeignete Weise exprimiert, beispielsweise durch Bakterien oder durch Phagen-Display-Systeme.

15 Die betreffenden Gene von Wirtsorganismen, die funktionale Mutanten mit Eigenschaften exprimieren, welche den gewünschten Eigenschaften weitgehend entsprechen, können einer weiteren Mutationsrunde unterworfen werden. Die Schritte der Mutation und der Selektion oder des Screening können iterativ solange wiederholt werden, bis die vorliegenden funktionalen Mutanten die gewünschten Eigenschaften in ausreichendem Maße aufweisen. Durch diese iterative Arbeitsweise können stufenweise eine begrenzte Anzahl
20 von Mutationen, wie z.B. 1 bis 5 Mutationen, vorgenommen und auf deren Einfluss auf die betreffende Enzymeigenschaft bewertet und selektiert werden. Die selektierte Mutante kann dann in gleicher Weise einem weiteren Mutationsschritt unterworfen werden. Dadurch lässt sich die Anzahl der zu untersuchenden Einzelmutanten signifikant verringern.

25 Die erfindungsgemäßen Ergebnisse liefern wichtige Informationen in bezug auf Struktur und Sequenz der betreffenden Enzyme, die erforderlich sind, um gezielt weitere Enzyme mit gewünschten modifizierten Eigenschaften zu generieren. Insbesondere können sogenannte „hot spots“ definiert werden, d.h. Sequenzabschnitte, die sich potentiell eignen, um über die Einführung gezielter Mutationen eine Enzymeigenschaft zu modifizieren.

30 3.2 Konstrukte

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für wenigstens ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

35 Unter einer „Expressionseinheit“ wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure mit Expressionsaktivität verstanden, die einen Promotor, wie hierin definiert umfasst, und nach funktioneller Verknüpfung mit einer zu exprimierenden Nukleinsäure oder einem Gen, die

Expression, also die Transkription und die Translation dieser Nukleinsäure oder dieses Gens reguliert. Man spricht deshalb auch in diesem Zusammenhang von einer „regulativen Nukleinsäuresequenz“. Zusätzlich zum Promotor können weitere, regulative Elemente, wie z.B. Enhancer, enthalten sein.

5 Unter einer „Expressionskassette“ oder „Expressionskonstrukt“ wird erfindungsgemäß eine Expressionseinheit verstanden, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäure oder dem zu exprimierenden Gen funktionell verknüpft ist. Im Gegensatz zu einer Expressionseinheit umfasst eine Expressionskassette somit nicht nur Nukleinsäuresequenzen, welche Transkription und Translation regulieren, sondern auch die Nukleinsäuresequenzen, welche
10 als Folge der Transkription und Translation als Protein exprimiert werden sollen.

Die Begriffe "Expression" oder „Überexpression“ beschreiben im Kontext der Erfindung die Produktion bzw. Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden. Dazu kann man beispielsweise ein Gen in einen Organismus einbringen, ein vorhandenes Gen durch
15 ein anderes Gen ersetzen, die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöhen, einen starken Promotor verwenden oder ein Gen verwenden, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und man kann gegebenenfalls diese Maßnahmen kombinieren.

Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils
20 operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz.

Unter einem „Promotor“, einer „Nukleinsäure mit Promotoraktivität“ oder einer „Promotorsequenz“ wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu transkribierenden Nukleinsäure die Transkription dieser Nukleinsäure reguliert.
25

Unter einer „funktionellen“ oder „operativen“ Verknüpfung versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und einer zu transkribierenden Nukleinsäuresequenz und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente, wie zum Beispiel Nukleinsäuresequenzen, die die Transkription von Nukleinsäuren gewährleisten, sowie zum Beispiel einen Terminator, derart, dass
30 jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Transkription der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die zu
35 transkribierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der Promotorsequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Dabei kann der

Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, oder kleiner als 100 Basenpaare oder kleiner als 50 Basenpaare sein.

5 Neben Promotoren und Terminator sind als Beispiele weiterer regulativer Elemente zu nennen Targeting-Sequenzen, Enhancer, Polyadenylierungssignale, selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen. Geeignete regulatorische Sequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

10 Erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukte umfassen insbesondere Sequenz SEQ ID NO:1, 3 oder 7 oder Derivate und Homologe davon, sowie die davon ableitbaren Nukleinsäuresequenzen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Steuerung, z.B. Erhöhung, der Genexpression operativ oder funktionell verknüpft wurden.

15 Zusätzlich zu diesen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Nukleinsäurekonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die kodierende Sequenz inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation
20 mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird.

Ein bevorzugtes Nukleinsäurekonstrukt enthält vorteilhafterweise auch eine oder mehrere der schon erwähnten "Enhancer" Sequenzen, funktionell verknüpft mit dem Promotor, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können in einer oder mehreren Kopien im Konstrukt enthalten sein. Im Konstrukt können noch weitere Marker, wie Antibiotikaresistenzen oder Auxotrophien komplementierende Gene, gegebenenfalls zur Selektion auf das Konstrukt enthalten sein.

30 Beispiele geeigneter Regulationssequenzen sind in Promotoren wie *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacI^q*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *rhaP* (*rhaP_{BAD}*)*SP6-*, *lambda-P_R-* oder im *lambda-P_L-*Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren *amy* und *SPO2*, in den Hefe- oder Pilzpromotoren *ADC1*, *MFalpha*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* enthalten. Es können auch
35 künstliche Promotoren für die Regulation verwendet werden.

Das Nukleinsäurekonstrukt wird zur Expression in einem Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen Vektor, wie beispielsweise einem Plasmid oder einem Phagen inseriert,

der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Unter Vektoren sind außer Plas-
miden und Phagen auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, also z.B. Viren,
wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cos-
mide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im
5 Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden. Diese Vektoren stellen eine
weitere Ausgestaltung der Erfindung dar.

Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR322,
pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pKK223-3, pDHE19.2, pHS2, pPLc236, pMBL24,
pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, lgt11 oder pBdCl, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702
10 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder
pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2alphaM, pAG-1, YEp6, YEp13 oder
pEMBLYe23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac⁺, pBIN19, pAK2004 oder pDH51. Die ge-
nannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide
15 sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning
Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985 ,
ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann der das erfindungsgemäße
Nukleinsäurekonstrukt oder die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthaltende Vektor auch
vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Mikroorganismen eingeführt werden und
20 über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus inte-
griert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Vektor wie einem Plasmid
oder nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt oder der erfindungsgemäßen Nukleinsäure beste-
hen.

Für eine optimale Expression heterologer Gene in Organismen ist es vorteilhaft die
25 Nukleinsäuresequenzen entsprechend des im Organismus verwendeten spezifischen "Co-
donnutzung" zu verändern. Der "Codonnutzung" lässt sich anhand von Computerauswertun-
gen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion
eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten kodierenden Nukleotidsequenz sowie ei-
30 nem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombina-
tions- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J.
Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold
Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments
with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in
35 Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and
Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in

einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden.

5

4. Mikroorganismen

Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff „Mikroorganismus“ der Ausgangsmikroorganismus (Wildtyp) oder ein genetisch veränderter, rekombinanter Mikroorganismus oder beides verstanden werden.

10

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind und zur Produktion der erfindungsgemäßen Polypeptide eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, oder Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben. Einen Überblick über bakterielle Expressionssysteme für die heterologe Expression von Proteinen liefert z.B. auch Terpe, K. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2006) 72: 211-222.

15

20

25

Als rekombinante Wirtsorganismen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder dem Nukleinsäurekonstrukt kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen in Frage. Vorteilhafterweise werden als Wirtsorganismen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze oder Hefen verwendet. Vorteilhaft werden gram-positive oder gram-negative Bakterien, bevorzugt Bakterien der Familien Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Streptomyetaceae oder Nocardiaceae, besonders bevorzugt Bakterien der Gattungen Escherichia, Pseudomonas, Streptomyces, Nocardia, Burkholderia, Salmonella, Agrobacterium, Clostridium oder Rhodococcus verwendet. Ganz besonders bevorzugt ist die Gattung und Art Escherichia coli. Weitere vorteilhafte Bakterien sind darüber hinaus in der Gruppe der alpha-Proteobakterien, beta-Proteobakterien oder gamma-Proteobakterien zu finden

30

35

Der Wirtsorganismus oder die Wirtsorganismen gemäß der Erfindung enthalten dabei vorzugsweise mindestens eine der in dieser Erfindung beschriebenen Nukleinsäuresequen-

zen, Nukleinsäurekonstrukte oder Vektoren, die für ein Enzym mit 7 β -HSDH-Aktivität gemäß obiger Definition kodieren.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0 °C und 100 °C, bevorzugt zwischen 10 °C bis 60 °C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährlüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, das heißt während der Anzucht reguliert werden oder nicht. Die Anzucht kann „batch“-weise, „semi batch“-weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nachgefüttert werden.

Die erfindungsgemäßen Organismen können bis zu ihrer Verwendung in geeigneter Weise gelagert werden, z.B. in gefrorenem Zustand bei -20°C; oder aber auch als Lyophilisat. Zur Verwendung werden gefrorene Kulturen auf Raumtemperatur gebracht; ggf. können auch ein oder mehrere Gefrier- / Auftauzyklen durchgeführt werden. Lyophilisierte Präparate können zur weiteren Verwendung in einem geeigneten Flüssigmedium, wie Pufferlösungen, gelöst/suspendiert werden.

20

5. Herstellung der UDCS

1. Schritt: Chemische Umsetzung von CS zu DHCS

Die Hydroxygruppen von CS werden zum Beispiel mit Chromsäure bzw. Chromaten in saurer Lösung (z.B. H₂SO₄) zu Carbonylgruppe in an sich bekannter Weise auf klassisch-chemischem Weg oxidiert. Dadurch entsteht DHCS.

25

2. Schritt: Enzymatische oder mikrobielle Umsetzung von DHCS zu 12-Keto-UDCS

In wässriger Lösung wird DHCS durch 3 α -HSDH und 7 β -HSDH bzw. Mutanten davon spezifisch zu 12-Keto-UDCS in Anwesenheit von NADPH bzw. NADH reduziert. Der Kofaktor NADPH bzw. NADH kann durch eine ADH bzw. FDH bzw. GDH bzw. Mutanten davon von Isopropanol bzw. Natrium-formiat bzw. Glucose regeneriert werden. Die Reaktion läuft unter milder Bedingung. Beispielsweise kann die Reaktion bei pH = 6 bis 9, insbesondere etwa pH = 8 und bei etwa 10 bis 30, 15 bis 25 oder etwa 23°C durchgeführt werden.

30

Im Falle eines mikrobiellen Umsetzungsschrittes können rekombinante Mikroorganismen, welche die erforderliche(n) Enzymaktivität(en) exprimieren in Gegenwart des umzusetzenden Substrates (DHCS) anaerob oder aerob in geeigneten Flüssigmedien kultiviert werden. Geeignete Kultivierungsbedingungen sind dem Fachmann an sich bekannt. Sie umfassen

35

Umsetzungen im pH Bereich von beispielsweise 5 bis 10 oder 6 bis 9, bei Temperaturen im Bereich von 10 bis 60 oder 15 bis 45 oder 25 bis 40 oder 37 °C. Geeignete Medien umfassen z.B, die unten beschriebenen LB und TB Medien. Die Umsetzungsdauer kann dabei z.B, batchweise oder kontinuierlich oder in sonstigen üblichen Verfahrensvarianten erfolgen (wie oben beschrieben). Die Umsetzungsdauer kann dabei z.B. im Bereich von Minuten bis mehreren Stunden oder Tagen liegen, und z.B. 1h bis 48 h betragen. Gegebenenfalls kann, wenn Enzymaktivität nicht kontinuierlich exprimiert wird, diese durch Zugabe eines geeigneten Induktors, nach Erreichen einer Zielzellkonzentration, z.B, von etwa $OD_{600} = 0,5$ bis 1,0, eingeleitet werden.

10 Weitere mögliche geeignete Abwandlungen des mikrobiellen Herstellungsverfahrens hinsichtlich Fahrweise der Fermentation, Zusätze zum Medium, Enzymimmobilisierung und Isolierung der Wertstoffe sind auch dem folgenden Abschnitt betreffend „Herstellung der Enzyme bzw. Mutanten“ zu entnehmen

15 3. Schritt Chemische Umsetzung von 12-Keto-UDCS zu UDCS

Die 12-Carbonylgruppe von 12-Keto-UDCS wird mittels Wolff-Kishner-Reduktion in an sich bekannter Weise entfernt, dadurch entsteht UDCS aus 12-Keto-UDCS. In der Reaktion wird zuerst die Carbonylgruppe mit Hydrazin zum Hydrazone umgesetzt. Anschließend wird das Hydrazone in Gegenwart einer Base (z.B. KOH) auf 200 °C erhitzt, hierbei wird Stickstoff abgespalten und UDCS entsteht.

6. Rekombinante Herstellung der Enzyme und Mutanten

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung erfindungsgemäßer Polypeptide oder funktioneller, biologisch aktiver Fragmente davon, wobei man einen Polypeptide-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Polypeptide induziert und diese aus der Kultur isoliert. Die Polypeptide können so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist.

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch- Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der American

Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

5 Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure oder Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin, Methanol oder Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure oder Milchsäure.

10 Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas oder Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

15 Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen.

20 Als Schwefelquelle können anorganische schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.

 Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden.

25 Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

30 Die erfindungsgemäß eingesetzten Fermentationsmedien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen beispielsweise Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue Zusammensetzung der

Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.

Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.

Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht lässt sich während der Anzucht durch Zugabe von basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie z. B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie z. B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gas-mischungen, wie z. B. Umgebungsluft, in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und. Die Kultur wird so lange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Fermentationsbrühe wird anschließend weiterverarbeitet. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden.

Die Zellen können auch, falls die Polypeptide nicht in das Kulturmedium sezerniert werden, aufgeschlossen und das Produkt nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z.B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

Eine Aufreinigung der Polypeptide kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-

Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in
5 Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

Vorteilhaft kann es sein, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die z.B. einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als
10 Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z.B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z.B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatogra-
15 phiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktions-
20 produkt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

7. Enzymimmobilisierung

Die erfindungsgemäßen Enzyme können in den hierin beschriebenen Verfahren frei
25 oder immobilisiert eingesetzt werden. Unter einem immobilisierten Enzym versteht man ein Enzym, das an einen inerten Träger fixiert ist. Geeignete Trägermaterialien sowie die darauf immobilisierten Enzyme sind aus der EP-A-1149849, EP-A-1 069 183 und der DE-OS 100193773 sowie aus den darin zitierten Literaturstellen bekannt. Auf die Offenbarung dieser Schriften wird diesbezüglich in vollem Umfang Bezug genommen. Zu den geeigneten
30 Trägermaterialien gehören beispielsweise Tone, Tonmineralien, wie Kaolinit, Diatomeenerde, Perlit, Siliciumdioxid, Aluminiumoxid, Natriumcarbonat, Calciumcarbonat, Cellulosepulver, Anionenaustauschermaterialien, synthetische Polymere, wie Polystyrol, Acrylharze, Phenolformaldehydharze, Polyurethane und Polyolefine, wie Polyethylen und Polypropylen. Die Trägermaterialien werden zur Herstellung der geträgerten Enzyme üblicherweise in ei-
35 ner feinteiligen, partikelförmigen Form eingesetzt, wobei poröse Formen bevorzugt sind. Die Partikelgröße des Trägermaterials beträgt üblicherweise nicht mehr als 5 mm, insbesondere nicht mehr als 2 mm (Sieblinie). Analog kann bei Einsatz der Dehydrogenase als Ganzzell-

Katalysator eine freie oder immobilisierte Form gewählt werden. Trägermaterialien sind z.B. Ca-Alginat, und Carrageenan. Enzyme wie auch Zellen können auch direkt mit Glutaraldehyd vernetzt werden (Cross-linking zu CLEAs). Entsprechende und weitere Immobilisierungsverfahren sind beispielsweise in J. Lalonde und A. Margolin „Immobilization of Enzymes“ in K. Drauz und H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis 2002*, Vol.III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim beschrieben.

Experimenteller Teil:

10 **A. Allgemeine Angaben**

1. Materialien:

Die genomische DNA von *Collinsella aerofaciens* DSM 3979 (ATCC 25986, frühere Bezeichnung *Eubacterium aerofaciens*) wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. UDCS und 7-Keto-LCS sind an sich bekannte und in der Literatur beschriebene Ausgangsverbindungen. Alle übrigen Chemikalien und Enzyme waren kommerziell erhältliche Handelsprodukte verschiedener Hersteller.

2. Mikroorganismen und Vektoren:

20

2.1 Mikroorganismen

E. coli BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) ₋ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
25 E. coli BL49	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) ₋ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) hdhA::KanR
E. coli BLLiu (=E. coli BL21ΔhdhA)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) ₋ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) ₋ hdhA
30 E. coli NovaBlue(DE3)	endA1 hsdR17(r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) supE44 thi ⁻¹ recA1 gyrA96 relA1lac [F' proA+B+ lacIqZ M15::Tn10(Tc ^R)]
E. coli NB13	endA1 hsdR17(r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) supE44 thi ⁻¹ recA1 gyrA96 relA1lac [F' proA ⁺ B ⁺ lacIqZ M15::Tn10(Tc ^R)] hdhA::KanR

35

2.2 Expressionsvektoren und Vektorkonstrukte

Die Expressionsplasmide (vgl. Fig. 3)

p7(A)T3rG (= p7(A)T3rG-A) (vgl. WO2012/080504)

p7(A)T3rG-K und

5 p7(A)T3TG (=p7(A)T3TG-A)

verfügen jeweils über Expressionskassetten, in denen die Gene 7 β -HSDH, 3 α -HSDH und GDH codiert sind, allerdings mit unterschiedlicher Struktur der Expressionskassette und mit unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen. Diese Plasmide wurden wahlweise in den Wirtstamm *E. coli* BL49 oder *E. coli* BL21 Δ hdhA (beide aus der WO 2012/080504 bzw. der WO 10 2011/147957 der Anmelderin bekannt) eingesetzt.

Folgende so modifizierte Stämme wurden verwendet:

15 *E. coli* BL49 p7(A)T3rG,
E. coli BL21 Δ hdhA p7(A)T3rG-K
E. coli BL49 p7(A)T3TG

3. Mikrobiologische Methoden

20

Molekularbiologische Arbeiten erfolgen, soweit keine anderen Angaben gemacht werden, in Anlehnung an etablierte Methoden, z.B. beschrieben in: Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Ausubel et al. (eds.), 25 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990).

3.1 Kultivierung von *Escherichia coli* im Schüttelkolben

30

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden zunächst 5 mL LB-Medium mit Zugabe des entsprechenden Antibiotikums mit einer Bakterienkolonie oder einer Kryokultur inokuliert und anschließend über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100-200 mL TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit 1-5 mL der Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C, 250 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD600 von 0,6-0,8 wurde die 35 Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur bei 25 °C, 160 rpm weitere 21 h inkubiert.

3.2 Kultivierung von *Escherichia coli* im 7,5 L Rührkesselreaktor

Die Kultivierung von Ganzzellbiokatalysatoren im Litermaßstab erfolgte in einem Rührkesselreaktor ($V = 7,5 \text{ L}$) der Firma Infors AG (Infors 3, Bottmingen, Schweiz). Der Reaktor war mit Sonden für Temperatur, pH und pO_2 ausgestattet, so dass diese Parameter von einer Steuerungseinheit online abgelesen und gegebenenfalls geregelt werden konnten. 5
Temperiert wurde der Reaktor über einen an die Steuerungseinheit angeschlossenen Doppelmantel. Die Begasung erfolgte über ein Tauchrohr und die Durchmischung erfolgte durch drei Sechsstab-Scheibenrührer, die über einen Motor am Deckel des Reaktors angetrieben wurden. 10
Zudem konnte über Zulaufpumpen Substrat und Base (Ammoniumhydroxidlösung, 25 % (w/v)) in den Reaktor zugegeben werden.

Vorkultur

Für die Kultivierung im 7,5 L Rührkesselreaktor wurden insgesamt zwei Vorkulturstufen angesetzt. 15
Die erste Vorkultur erfolgte in einem Reagenzglas mit 5 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum. Diese wurde morgens mit 100 μL einer Kryokultur angeimpft und 6-10 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert, bis eine sichtbare Trübung auftritt. Anschließend wurden 500-1000 μL der ersten Vorkultur in einen mit 200 mL Minimalmedium nach Wilms et al. (2001) Material und gefüllten 1 L-Enghals-Erlenmeyerkolben überführt, welcher über 20
Nacht bei 37 °C, 250 rpm (Exzentrizität 5 cm) inkubiert wurde.

Satzphase

Für die Rührkesselkultivierung wurde ein mit 2,8–3,8 L Minimalmedium und 1,5 mL Antischaummittel (Antifoam 204, Sigma-Aldrich, München) befüllter, sterilisierter Rührkesselreaktor verwendet, dessen Sonden vor Beginn der Kultivierung nach gängigem Verfahren kalibriert wurden. Dieser wurde mit Satzglucose (Endkonzentration 2 g L^{-1}) und entsprechendem Antibiotikum versetzt und anschließend mit 200 mL der zweiten Vorkulturstufe inokuliert. 25
Begast wurde zu Beginn mit 2 L min^{-1} Druckluft und die Rührerdrehzahl betrug am Anfang der Kultivierung 200 rpm. Bei Unterschreiten eines Schwellenwerts von 30 % pO_2 wurde die Rührerdrehzahl inkrementell um 5 rpm bis zu einem theoretischen Maximalwert von 1100 rpm erhöht. Der pH wurde einseitig durch Basenzugabe (25 % Ammoniumhydroxid, w/v) auf 7,0 geregelt, während die Temperatur auf 37 °C gehalten wurde. Nach Verbrauch der Satzglucose, was durch plötzlichen Anstieg des pO_2 festgestellt werden konnte, 30
erfolgte der Übergang zur substratlimitierten Zulaufphase. 35

Substratlimitierte Wachstumsphase

Zu Beginn der Zulaufphase wurde die Begasung mit Druckluft auf 5 L min^{-1} erhöht, die Temperatur auf $30 \text{ }^\circ\text{C}$ verringert und der Schwellenwert für die inkrementelle Rührerdrehzahlerhöhung auf $20 \text{ } \%$ pO_2 verringert. Die Zudosierung des Substratzulaufs erfolgte basierend auf einer festgelegten Wachstumsrate von $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$. Das Zulaufmedium enthielt 500 g L^{-1} Glucose und 99 g L^{-1} Diammoniumhydrogenphosphat. Der Biomassenertrag wurde mit $0,45 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ g}_{\text{Glc}}^{-1}$ angenommen.

Die Dauer der substratlimitierten Wachstumsphase betrug 19 h . Eine Stunde vor Ende dieser Phase wurde die Temperatur auf $20 \text{ }^\circ\text{C}$ verringert, weiterhin wurden 3 mL L^{-1} Spurenelementlösung und 2 mL L^{-1} Magnesiumsulfatlösung (1 M) zugegeben, jeweils bezogen auf V_0 . Wurde Ampicillin als Selektionsantibiotikum verwendet, wurden zudem jeweils zu Beginn und 1 h vor Ende der substratlimitierten Wachstumsphase 50 mg L^{-1} Ampicillin zugegeben.

15 **Expressionsphase**

Nach Beendigung der substratlimitierten Wachstumsphase erfolgte zu Beginn der Expressionsphase die Zugabe von $0,5 \text{ mM}$ IPTG (bezogen auf V_0). Die Temperatur wurde auf $20 \text{ }^\circ\text{C}$ gehalten und die eingestellte Wachstumsrate auf $\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$ verringert. Nach 18 h wurde der Zulaufvolumenstrom auf den zuletzt eingestellten Wert konstant gehalten, da ansonsten eine Sauerstoffsättigung von $\text{pO}_2 \geq 20 \text{ } \%$ nicht gewährleistet werden konnte. Eine weitere Zugabe von 3 mL L^{-1} Spurenelementlösung, 2 mL L^{-1} Magnesiumsulfatlösung (1 M) und gegebenenfalls 50 mg L^{-1} Ampicillin erfolgte 8 h nach Beginn der Expressionsphase. Die Zellen wurden 24 h nach Beginn der Expressionsphase geerntet, gegebenenfalls mit $30 \text{ } \%$ Glycerin (v/v) versetzt und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.3 Kultivierung von Escherichia coli-Bibliotheken in Deep Well-Platten

Für die Kultivierung von *E. coli*-Bibliotheken in Deep Well-Platten wurde zunächst eine Vorkultur in sterilen Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen angesetzt. Hierzu werden jeweils $150 \text{ } \mu\text{L}$ Vorkulturmedium (TB-Medium versetzt mit $5 \text{ } \%$ (v/v) DMSO) in die Vertiefungen gegeben. Anschließend wurden die Vertiefungen mit Kolonien von Agarplatten mit Hilfe von sterilen Zahnstochern inokuliert. Abschließend wurden die Mikrotiterplatten mit sterilen, atmungsaktiven Verschlussfolien (Breathe-Easy, Diversified Biotech, USA) versiegelt und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht bei $200\text{-}250 \text{ rpm}$ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Mikrotiterplatten als Stammpplatten steril bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Proteinexpression erfolgte in sterilen Deep Well-

Platten mit 96 Vertiefungen bei 2,2 mL Vertiefungsvolumen und quadratischen Vertiefungsöffnungen. Hierzu wurden jeweils 600 μL steriles TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in die Vertiefungen überführt, anschließend wurden die Vertiefungen mit je 10 μL Vorkultur aus der Stammpatte inokuliert. Die Deep Well-Platten wurden mit sterilen, atmungsaktiven Verschlussfolien versiegelt und bei 37 °C für 9 h bei 200-250 rpm inkubiert. Nach 9 h Inkubation wurden die Kulturen mit jeweils 100 μL Induktionslösung versetzt. Anschließend wurden die DeepWell-Platten mit sterilen, atmungsaktiven Verschlussfolien versiegelt und bei 30 °C für weitere 21 h bei 200-250 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (30 min, 3000 g). Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4 Stammhaltung

Die kurz- und mittelfristige Stammhaltung von *E. coli* erfolgte auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Selektionsantibiotika bei 4 °C. Für eine langfristige Stammhaltung wurden Kryokulturen hergestellt, indem *E. coli*-Kulturen in LB-Medium angezogen wurden und in der exponentiellen Wachstumsphase ($\text{OD} \leq 0,8$) mit 20 % sterilem Glycerin (v/v) versetzt und in sterilen 1,5 mL-Reaktionsgefäßen bei -80 °C gelagert wurden.

3.5 Zellaufschluss von *Escherichia coli* in der Schwingmühle

Der Zellaufschluss von *E. coli* in der Schwingmühle erfolgte in 2 mL-Reaktionsgefäßen. Hierzu wurden jeweils 1 mL Glasperlen (Durchmesser 0,25-0,5 mm, Carl Roth, Karlsruhe) und 1 mL der aufzuschließenden Bakteriensuspension in das Reaktionsgefäß gegeben, welches anschließend in eine Schwingmühle (MM 200, Retsch, Haan) eingespannt und 6 min bei 30 Hz geschüttelt wurde. Anschließend wurden die Gefäße 10 min bei 4 °C und 17880 g in einer Tischzentrifuge (Biofuge Stratos, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) zentrifugiert. Der Überstand konnte für weitere Anwendungen verwendet werden.

3.6 Zellaufschluss von *Escherichia coli* im Hochdruckhomogenisator

Zellen aus Kultivierungen im Bioreaktor wurden mit einem Hochdruckhomogenisator (Ariete, GEA Niro Soavi, Lübeck) aufgeschlossen. Hierzu wurde die Zellsuspension zunächst in einen mit 50 L Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 7,4) befüllten und auf 4 °C gekühlten 200 L-Edelstahltank überführt. Der Aufschluss erfolgte bei einem Druck von 950 bar und einem Volumenstrom von 300-350 L h^{-1} , welcher nach 15-20 min auf 150 L h^{-1} gedrosselt wurde. Die Zellbrühe wurde nach der ersten Passage in einem zweiten, auf 4 °C gekühlten

200 L-Edelstahltank gesammelt, auf unter 20 °C gekühlt und in einen dritten, mit 50 L Kaliumphosphatpuffer befüllten und auf 4 °C gekühlten 200 L-Edelstahltank überführt. Anschließend wurde eine zweite Passage durch den Hochdruckhomogenisators nach obiger Beschreibung durchgeführt.

5

Diese Vorgehensweise sollte gewährleisten, dass die Temperatur der Zellbrühe während des Aufschlusses 35 °C nicht übersteigt, da eine Passage durch den Hochdruckhomogenisator zu einer Erwärmung des Mediums um 10–15 °C führte. Im Anschluss an den Zellaufschluss wurde in einem ersten Schritt Zelldebris mit einem Tellerseparator (CSA 08, GEA Westfalia, Oelde) abgetrennt. Dieser wurde bei einem Volumenstrom von 100 L h⁻¹, einem Gegendruck von 0-3 bar und einem Teilentleerungsintervall des Feststoffauswurfes von 999 s betrieben. Die geklärte Zellbrühe wurde in 10 L-Plastikkanister aliquotiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

10

15 **3.7 Zellaufschluss von *Escherichia coli* mit Lysozym**

Für den enzymatischen Zellaufschluss mit Lysozym wurden in Deep Well-Platten pelletierte Zellen in 600 µL Aufschlusspuffer (50 mM KPi, 10 mM MgCl₂, 70000 U mL⁻¹ Lysozym, 50 U mL⁻¹ DNaseI) resuspendiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zelldebris durch Zentrifugation (30 min, 3000 g, 4 °C) in einer Standzentrifuge (Rotixa 50 RS, Hettich, Tuttlingen) abgetrennt. Der Überstand wurde für weitere Untersuchungen verwendet.

20

4. Molekularbiologische Methoden

25 **4.1 Isolation von Plasmid-DNA**

Die Isolation von Plasmid-DNA wurde mit dem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, München) durchgeführt. Hierzu wurden 5 mL einer LB-Übernachtskultur von *E. coli* nach Herstellerangaben behandelt. Zur Elution der isolierten Plasmid-DNA wurden 100 µL auf 70 °C temperiertes, steriles, doppelt destilliertes Wasser verwendet.

30

4.2 Polymerasekettenreaktion

Polymerasekettenreaktionen (PCR) zur präparativen Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden nach der Methode von Saiki R. K. et al. *Science*, 239:487-491, 1988, durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 1-2,5 µL Templat-DNA, je 0,5 µM Oligonukleotid, je 0,2 mM der Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTPs) sowie 0,02 U µL⁻¹ Phusion DNA-

35

Polymerase. Das Temperaturprogramm für die DNA-Amplifikation richtete sich nach den Angaben des Polymerasenherstellers und den Schmelztemperaturen der Oligonukleotide.

4.3 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

5

Für die Trennung von DNA-Molekülen wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 1 % Agarose (w/v) verwendet. Dabei wurde 1 g Agarose in 100 mL 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, mit 5 µL Ethidiumbromid (≥98 %) oder alternativ 5 µL Roti®-GelStain (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt und anschließend in eine Gelkammer (C.B.S. Scientific, San Diego, USA) gegossen. Die aufzutrennende DNA wurde vor dem Auftragen mit 5x-Agarose-Gelladepuffer nach Sambrook & Russell (2001) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard diente eine 100 bp DNA-Leiter extended (Carl Roth, Karlsruhe). Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 120 V.

10

15

4.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Gelextraktion

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, München) verwendet. Hierzu wurde nach Herstellerangaben verfahren. Zur Elution der isolierten DNA-Fragmente wurden 50 µL auf 70 °C temperiertes, steriles, doppelt destilliertes Wasser verwendet.

20

4.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels PCR Clean-Up Kit

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit dem GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, München) erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Elution der aufgereinigten DNA-Fragmente wurden 50 µL auf 70 °C temperiertes, steriles, doppelt destilliertes Wasser verwendet.

25

4.6 Restriktion mit Endonukleasen

30

Für die Restriktion von DNA wurden 40–45 µL der zu schneidenden DNA mit 10-20 U der jeweiligen Restriktionsenzyme versetzt und in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer mit entsprechenden Zusätzen für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Fragmente entweder durch Agarosegelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion oder unter Verwendung des PCR Clean-Up Kits aufgereinigt.

35

4.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden zuvor bereits restringierte und aufgereinigte DNA-Fragmente verwendet. Die Ligation erfolgte unter Verwendung von 12 μL geschnittener Vektor-DNA, 4 μL geschnittener Insert-DNA, 20 U mL^{-1} T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt) unter Zusatz von 0,5 mM ATP in dem vom Hersteller dafür vorgesehenen Puffer bei 16 °C. Alternativ wurde die Ligation mit dem Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs, Frankfurt) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden 6 μL geschnittene Vektor-DANN und 3 μL geschnittene Insert-DNA verwendet.

10 4.8 Positionsgerichtete Mutagenese

Positionsgerichtete Mutagenesen an Plasmid-DNA wurden wahlweise mit einer Methodenach Sanchis et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81(2):387-97, 2008 oder Liu, H. & Naismith, J. H., *BMC Biotechnol.*, 8:91, 2008 durchgeführt. Sollte eine Sättigungsmutagenese durchgeführt werden, wurden Primer mit degenerierten Codons verwendet. Im Falle der Methode nach Sanchis et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81(2):387-97, 2008 bestand der Reaktionsansatz aus 0,4 μL Templat-DNA, je 0,1 μM Oligonukleotid, je 0,2 mM der dNTPs sowie 0,02 U μL^{-1} Phusion Hot Start DNA-Polymerase. Das Temperaturprogramm für die DNA-Amplifikation richtete sich nach der publizierten Methode und wurde lediglich entsprechend den Angaben des Polymerasenherstellers und den Schmelztemperaturen der Oligonukleotide angepasst.

Bei der Methode nach Liu & Naismith (2008) bestand der Reaktionsansatz aus 0,2 μL Templat-DNA, je 1 μM Oligonukleotid, je 0,2 mM der dNTPs sowie 0,02 U μL^{-1} Phusion Hot Start DNA-Polymerase. Das Temperaturprogramm für die DNA-Amplifikation richtete sich nach der publizierten Methode und wurde lediglich entsprechend den Angaben des Polymerasenherstellers und den Schmelztemperaturen der Oligonukleotide angepasst. Im Anschluss an die Mutagenese-PCR wurde die parentale DNA restringiert, indem zweimal hintereinander jeweils 0,5 U μL^{-1} DpnI zugegeben und im Anschluss 1 h bei 37 °C inkubiert wurde.

4.9 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen

Für die Herstellung von chemisch kompetenten E. coli-Zellen wurde eine 100 mL-LB-Flüssigkultur im exponentiellen Wachstumsstadium (OD 0,5) in 50 mL-Reaktionsgefäße überführt und durch Zentrifugation (3220 g, 4 °C, 10 min) pelletiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 40 mL eisgekühltem TFB1-Medium resuspendiert und

15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation (3220 g, 4 °C, 10 min) pelletiert, der Überstand verworfen, die Zellen mit 4 mL eisgekühltem TFB2-Medium resuspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 200 µL Aliquots in sterile 1,5 mL-Reaktionsgefäße gegeben und bei -80 °C eingefroren. Für die
5 Transformation wurde jeweils ein Aliquot aufgetaut, mit 1-10 µL DNA-Lösung versetzt und 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42 °C, 1:30 min) im Thermomixer (RiO, QUANTIFOIL Instruments, Jena) wurden die Zellen erneut 1-2 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden 600 µL steriles LB-Medium zugegeben und im Thermomixer weitere 45 min bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Nach einer milden Zentrifugation (3000 rpm, 1 min)
10 wurde der Überstand bis auf 50–100 µL verworfen, das Pellet im verbliebenen Überstand resuspendiert und auf entsprechende Agar-Platten ausplattiert. Diese wurden anschließend im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.10 Herstellung und Transformation elektrokompetenter Zellen

15

Für die Herstellung von elektrokompetenten E. coli-Zellen wurde eine 200 mL-LB Flüssigkultur im exponentiellen Wachstumsstadium (OD 0,5) in eisgekühlte 50 mL-Reaktionsgefäße überführt, 20 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation (4000 g, 4 °C, 15 min) pelletiert. Die Zellen wurden anschließend dreifach gewaschen, indem das Pellet nachfolgend in 200
20 mL, 100 mL und 8 mL eisgekühlter 10 %-iger Glycerinlösung (v/v) resuspendiert und erneut durch Zentrifugation (6000 g, 4 °C, 15 min) pelletiert wurden. Im Anschluss wurden die Zellen auf ein Gesamtvolumen von 0,4–0,8 mL mit eisgekühltem 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert und in Aliquots a´ 20 µL in eisgekühlten, sterilen 1,5 mL-Reaktionsgefäßen abgefüllt und bei -80 °C eingefroren.

25

Für die Transformation wurden die Zellen mit 2-10 µL entsalzter DNA-Lösung versetzt und in Elektroporationsküvetten mit 1-2 mm Elektrodenabstand nach Herstellerprotokoll des Elektroporators (Gene Pulser Xcell™, Bio-Rad, München.) elektroporiert. Anschließend wurden sofort 1 mL LB-Medium zu den Zellen gegeben, die Suspension in sterile 1,5 mL-
30 Reaktionsgefäße überführt und 60 min bei 37 °C und 600 rpm im Thermomixer (RiO, QUANTIFOIL Instruments, Jena) inkubiert. Nach einer milden Zentrifugation (3000 rpm, 1 min) wurde der Überstand bis auf 50–100 µL verworfen, das Pellet im verbliebenen Überstand resuspendiert und auf entsprechende Agar-Platten ausplattiert. Diese wurden anschließend im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

35

4.11 Kolonie-Polymerasekettenreaktion

Präparative Kolonie-Polymerasekettenreaktionen (Kolonie-PCR) wurden durchgeführt, um das Gen für die Glucosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis* zu isolieren. Die Vorgehensweise entspricht der in Abschnitt 4.2 angegebenen, mit der Abwandlung, dass anstelle von Templat-DNA ein Bakterienabstrich von einer auf Agarplatten kultivierten Einzelkolonie zum Reaktionsansatz zugegeben wurde. Analytische Kolonie-PCR dienten zur Kontrolle einer korrekt erfolgten Ligation. Auch hierbei diente ein Abstrich einer einzelnen Bakterienkolonie als Templat. Primer für die Kolonie-PCR wurden so gewählt, dass diese an der Ziel-DNA mit zur Insertionsstelle flankierenden Regionen hybridisieren, so dass anhand der Länge des Amplifikats abgeschätzt werden kann, ob die Insertion erfolgreich war. Der Reaktionsansatz bestand aus je 0,5 μM Oligonukleotid, je 0,2 mM der dNTPs sowie 0,05 U μL^{-1} Taq DNA-Polymerase. Das Temperaturprogramm für die DNA-Amplifikation richtete sich nach den Angaben des Polymerasenherstellers und den Schmelztemperaturen der Oligonukleotide.

4.12 Spezifische Ausschaltung chromosomaler Gene

Die spezifische Ausschaltung der chromosomalen 7 α -HSDH in *E. coli* erfolgte mit Hilfe des Kits TargeTron™ Gene Knockout System von Sigma Aldrich (München). Das für die Ausschaltung benötigte Plasmid pMB13 ist in Braun, M., PhD thesis, Technische Universität München, 2011 beschrieben. Dieses Plasmid wurde in chemisch kompetente *E. coli* transformiert und das Ausschalten des Zielgens nach Herstellerangaben durchgeführt. Durch Selektion auf LB-Agarplatten mit Kanamycin sowie Kolonie-PCR konnte das erfolgreiche Ausschalten nachgewiesen werden. Um das im Bakterium verbliebene Plasmid zu entfernen, wurde eine Über-Nacht-Kultur der Zellen in LB-Medium mit Kanamycin (50 mg L⁻¹) und Novobiocin (62 mg L⁻¹) bei 37 °C angesetzt. Anschließend wurde die Kultur auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Vorhandensein des zu entfernenden Plasmids wurde untersucht, indem einzelne Kolonien auf Chloramphenicol-Sensitivität untersucht werden. Dies erfolgte in paralleler Über-Nacht-Kultivierung bei 37 °C in LB-Medium, einmal unter Zugabe von 33 mg L⁻¹ Chloramphenicol, einmal ohne dessen Zugabe.

5. Proteinchemische Methoden

5.1 Aufreinigung von Proteinen im mL-Maßstab

Die Aufreinigung der Proteine im mL-Maßstab erfolgte nach dem Prinzip der Immobilisierten Metallaffinitätschromatographie (IMAC). Das Trennprinzip beruht auf der spezifischen

Wechselwirkung matrixgebundener Metallliganden mit Histidinresten am aufzureinigenden Zielprotein. Zu diesem Zweck wird bei der Expression des Zielproteins ein His6-Anker entweder N- oder C-terminal fusioniert. Für die Aufreinigung an der Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-Anlage wurden HisTrap-Säulen (1 mL oder 5 mL Säulenvolumen) verwendet, deren Agarosematrix mit Ni^{2+} -Ionen beladen war. Die Flussraten der mobilen Phase wurden jeweils auf ein Säulenvolumen (CV) pro Minute eingestellt. Die Proteinkonzentration im Eluatstrom konnte hierbei über die UV-Extinktion bei 280 nm verfolgt werden. Zunächst wurden die Säulen mit mindestens 5 CV Bindepuffer äquilibriert, anschließend erfolgte die Auftragung der Proben. Danach erfolgte das Waschen der Säule mit Bindepuffer zur Entfernung nicht spezifisch bindender Fremdproteine. Das Waschen wurde so lange durchgeführt, bis wieder eine Basislinie des UV-Signals erreicht wurde. Die Elution des Zielproteins wurde durch einen von 0 % auf 100 % über 20 min linear ansteigenden Elutionspuffergradienten erreicht, wobei Eluatfraktionen von jeweils 2 CV gesammelt wurden. Die Fraktionen, die das Zielprotein enthalten, können über das UV-Signal identifiziert werden. Anschließend wurde die Säule nochmal mit 10 CV Elutionspuffer nach gewaschen. Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden anschließend über Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren (Ausschlussgröße 10 kDa) aufkonzentriert und durch dreimaliges Auffüllen und Aufkonzentrieren mit dem Zielpuffer umgepuffert. Der Zielpuffer entsprach in der Regel dem für die weitere Verwendung des Proteins benötigten Reaktionspuffer.

20

Für die Aufreinigung mit Zentrifugaleinheiten wurden HisPur™Ni-NTA Resin Spin Columns (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) mit einem Bettvolumen von 3 mL verwendet. Die Vorgehensweise entsprach dabei den Herstellerangaben. Die Aufkonzentrierung und Um-pufferung entsprach der zuvor beschriebenen Durchführung.

25

5.2 Aufreinigung von Proteinen im L-Maßstab

Die Aufreinigung von Proteinen im L-Maßstab erfolgte ebenfalls auf Basis der IMAC. Hierfür wurde eine Chromatographie-Säule mit 600 mL-Volumen und einem Durchmesser von 50 mm verwendet, die mit Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Science, Uppsala, Schweden) befüllt wurde. Vor dem Packen wurde das in 20 % Ethanol gelagerte Säulenmaterial durch dreimaliges Dekantieren, Wiederauffüllen mit Wasser, Aufschlänmen und Sedimentieren gewaschen. Anschließend wurde das aufgeschlänmte Medium in die leere Säule gegeben und die Säule bei einer maximalen Flussrate von 150 mL min^{-1} und einem maximalen Druck von 1,5 bar gepackt. Die fertig gepackte Säule wurde danach mit 5 CV Bindepuffer bei einem maximalen Druck von 1,2 bar äquilibriert. Die aufzutragende Probe wurde nach dem Auftauen zunächst mit 500 mM NaCl versetzt und mit 1 M NaOH auf pH 7,4 ein-

35

gestellt. Anschließend erfolgte eine Querstromfiltration mit zwei Sartocoon® Slice Hydrosart® Filterkassetten (0,2 µm Ausschlussgröße, je 0,1 m² Filterfläche, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) mit in Reihe geschaltetem Sterilfilter (0,2 µm Ausschlussgröße), um die Probe zu klären. Die Proben wurden danach mit einem maximalen Druck von 1,2 bar entgegen der Elutionsrichtung auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule in Elutionsrichtung mit Bindepuffer gewaschen, bis das UV-Signal des Eluatstroms wieder eine Basislinie anzeigt. Die Elution des Proteins erfolgte über einen von 0 % bis 100 % über 180 min linear ansteigenden Elutionspuffergradienten, wobei Fraktionen von jeweils 2 L gesammelt wurden. Durch das UV-Signal des Detektors konnten die Fraktionen identifiziert werden, die das Zielprotein enthalten. Diese Fraktionen wurden im Anschluss mittels Querstromfiltration mit zwei Sartocoon® Slice Hydrosart® Filterkassetten (10 kDa Ausschlussgröße, je 0,1 m² Filterfläche, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) zunächst aufkonzentriert und anschließend durch Diafiltration mit 5-10-fachem Austauschvolumen an Zielpuffer umgepuffert.

15

5.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Auftrennung von Proteingemischen erfolgte mittels einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit 12,5 %-igem Trenn- und 3 %-igem Sammelgel (Laemmli, U. K., *Nature*, 227(5259):680-5, 1970; Fling, S. P. & Gregerson, D. S., *Anal. Biochem.*, 155(1):83-8, 1986. Für das Trenngel wurde 17,5 mL destilliertes Wasser mit 10 mL Trenngelpuffer (4x) und 12,5 mL Acrylamid (40 %) vermischt und die Polymerisation mit 100 µL Ammoniumpersulfat (APS, 10 %) und 10 µL Tetramethylethyldiamin (TEMED) gestartet. Die Zusammensetzung des Sammelgels besteht aus 15 mL destilliertem Wasser, 20 mL Sammelgelpuffer (2x), 5 mL Acrylamid (40 %), 100 µL APS und 10 µL TEMED. Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden diese auf das Gel aufgetragen, als Größenstandard diente Roti® -Mark Standard (14-212 kDa, Carl Roth, Karlsruhe). Die Elektrophorese erfolgte in einer Elektrophoresekammer (PEQLAB, Erlangen) mit Rotiphorese® SDS-PAGE (Carl Roth, Karlsruhe) als Laufmittel bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel. Zur Färbung der Proteinbanden wurde Roti®-Blue-Färbelösung (Carl Roth, Karlsruhe) gemäß Herstellerangaben verwendet.

35

5.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)

Gesamtproteinkonzentrationen wurden mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA) nach Herstellerangaben gemessen. Als Proteinstandard diente

ein im Kit enthaltener Standard aus Bovinem Serumalbumin (BSA).

5.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten im Mikrotiterplattenphotometer

- 5 Enzymaktivitätsbestimmungen wurden im Mikrotiterplattenphotometer mit einem Probenvolumen von 250 μL bei 30 °C durchgeführt, bei der die Änderung der NAD(P)H-Konzentration ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ nm}$ verfolgt wurde. Die Aktivitäten wurden hierbei durch lineare Regression im linear verlaufenden Teil der Reaktion
- 10 8,0) entsprechend verdünnt und mit Substrat und Kofaktor versetzt. Die Endkonzentrationen an Substrat und Kofaktor waren für 7 β -HSDH 10 mM DHCA und 100 μM NADPH, für 3 α -HSDH 10 mM DHCA und 100 μM NADH, und für GDH 200 mM Glucose und 1000 μM NAD(P).
- 15 Sämtliche Substrate und Kofaktoren waren in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) gelöst. Sämtliche Messungen wurden im Dreifachansatz durchgeführt, anschließend wurde der Mittelwert ermittelt. Bei der Bestimmung der Artificial Units (AU) für die mechanistische Modellierung der multienzymatischen Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA wurde das Protokoll zur Enzymaktivitätsbestimmung modifiziert. Hierbei diente als Reaktionspuffer ein Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,0), dem 20 % (v/v) Glycerin, 0,6 % (w/v) BSA und 0,006 % (v/v) Antifoam 204 (Sigma-Aldrich, München) beigemischt wurde. Die Konzentrationen an Substrat und Kofaktor war 500 μM DHCA und 200 μM NADH für 3 α -HSDH, 500 μM DHCA und 200 μM NADPH für 7 β -HSDH sowie 200 mM Glucose und 1000 μM NAD für GDH. Die Enzyme wurden in Verdünnungen eingesetzt, bei denen die gemessene anfängliche Extinktionsveränderung bei der GDH im Bereich 0,0005 – 0,0020 s^{-1} und bei den HSDH 0,00025 – 0,00100 s^{-1} betrug. Sämtliche Messungen wurden im Achtfachansatz durchgeführt, anschließend wurde der 25 % gestutzte Mittelwert ermittelt. Ein AU wird hierbei als die Menge an aktivem Enzym definiert, die unter diesen genannten Reaktionsbedingungen die Umsetzung von 1 μmol Substrat bzw. Kofaktor innerhalb von 1 min katalysiert.

30

6. Analytische Methoden

6.1 Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen

- 35 Die optische Dichte von E. coli-Suspensionen wurde in einem Küvettenphotometer in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ gemessen. Die Bakteriensuspension wurde gegebenenfalls mit entsprechendem Medium oder Puffer verdünnt, so

dass die gemessene Extinktion 0,5 nicht überstieg.

6.2 Bestimmung der Biotrockenmassenkonzentration von Bakteriensuspensionen

- 5 Die Bestimmung der Biotrockenmassenkonzentration erfolgte gravimetrisch, sofern nicht anders angegeben. Hierzu wurde 1 mL der entsprechenden Bakteriensuspension in vorge-
- trocknete und vorgewogene 1,5 mL-Reaktionsgefäße gegeben, anschließend wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm 10 min bei Raumtemperatur pelletiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Gefäße bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und
- 10 erneut gewogen. Die Biotrockenmassenkonzentration konnte anschließend mittels folgender Gleichung berechnet werden.

$$c_X = (m_{\text{voll}} - m_{\text{leer}})/V$$

mit:

c_X = Biotrockenmassenkonzentration, gBTM L⁻¹

- 15 m_{voll} = Masse des mit Probenmaterial gefüllten Reaktionsgefäßes nach der Trocknung, g

m_{leer} = Masse des leeren Reaktionsgefäßes nach der Trocknung, g

V = Volumen der Zellsuspension vor der Sedimentation, L

6.3 Photometrische Bestimmung von Kofaktorkonzentrationen

20

Konzentrationen von NAD(P) und NADP(H) wurden photometrisch in einem Küvettenphoto-

meter nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz bestimmt. Hierzu wurde eine Quarzküvette (Hellma Analytics, Mülheim) mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet, die mit 1 mL Probe gefüllt war. Die Bestimmung der NAD(P)-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda =$

25 259 nm durchgeführt, wobei der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{259 \text{ nm}} = 16,9 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ betrug. Die Konzentrationen von NAD(P)H wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ nm}$ bestimmt, hierbei betrug der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,22 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.4 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

- 30 Die qualitative und quantitative Analytik von Gallensalzen erfolgte durch eine Auftrennung der Substanzen mittels HPLC. Hierzu wurde das HPLC-System Finnigan Surveyor Plus (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) mit einer Umkehrphasen-Chromatographiesäule des Typs Hibar® 125-4 RP-18e (5 μm) (Merck, Darmstadt) verwendet. Als mobile Phase diente ein Laufmittelgemisch aus phosphorsauren Wasser (pH 2,6) und Acetonitril, wobei für
- 35 die Auftrennung ein Laufmittelgradient verwendet wurde. Die Flussrate der mobilen Phase beträgt 1 mL min⁻¹ und es wurden jeweils 20 μL Probe injiziert. Detektiert werden die Gallensalze mittels UV-Extinktion bei $\lambda = 200 \text{ nm}$. Kalibriert wurde die Methode mit Referenzsub-

stanzen nach gängigen Methoden.

Das Gradientenprofil war wie folgt:

0–3 min: konstanter Anteil an Acetonitril von 35 % (v/v), 3–7 min: lineare Zunahme des Acetonitrilanteils auf 39 % (v/v), 7–8 min: lineare Zunahme des Acetonitrilanteils auf 70 % (v/v),
 5 8–9,5 min: konstanter Anteil an Acetonitril von 70 % (v/v), 9,5–10,5 min: lineare Abnahme des Acetonitrilanteils auf 35 % (v/v), 10,5–14 min: konstanter Anteil an Acetonitril von 35 % (v/v).

10 6.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (engl. fluorescence-activated cell sorting, FACS) wurde verwendet, um die Zellintegrität von Ganzzellbiokatalysatoren zu untersuchen. Hierzu wurden die Zellen mit PBS auf eine Partikeldichte von ca. 10^9 mL^{-1} verdünnt, was bei einer Flussrate von 1 mL s^{-1} 1000 Signalen s^{-1} entspricht. Diese Zellen wurden mit 0,75 mM des Farbstoffs bis- (1,3-Dibutylbarbituräure)-Trimethinoxonol (Dibac4[3]) versetzt, welcher depolarisierte Zellmembranen überwindet und durch Bindung an intrazelluläre Proteine und Membranen eine gesteigerte Fluoreszenz erzeugt. Durch Auftragung der Dibac4[3]-vermittelten Fluoreszenz gegen die Lichtstreuung der Partikel, welche ein Indikator für die Partikelgröße ist, konnten Hinweise auf die Zellintegrität bezogen werden (Suller, M. T. & Lloyd D., *Cytometry*,
 15 35(3):235-41, 1999; Langemann et al., *Bioeng. Bugs*, 1(5):326-36, 2010).
 20

6.6 Standardisierte Prüfmethode zur Bestimmung der enzymatischen Umsetzung von DHCA zu 12-Keto-UDCA (IPC-Methode)

25 a. Ausrüstung

Apparatur: HPLC mit UV-Detektor und Autosampler (Merck Hitachi, LaChrom Elite (Hochdruck-Gradientensystem) oder vergleichbar);

30 Säule: Merck, Purospher® STAR RP-18e, 125 mm X 4,0 mm, 5 μm , Art. #510 036; oder vergleichbar

b. Reagenzien geeignet für Gradientenerzeugung

35 Acetonitril Merck LiChroSolv®
 Wasser Reinstwasser
 H_3PO_4 ortho-Phosphorsäure 85,0%-ig; Merck

Methanol Merck LiChroSolv®

c. HPLC-Parameter

5 Flussrate 1,0 ml/min
 Säulentemperatur 25 °C
 Injektionsvolumen 20 µl

Gradient

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)	Kurve
0,0	80,0	20,0	-
15,0	65,0	35,0	linear
20,0	65,0	35,0	linear
21,0	15,0	85,0	linear
30,0	15,0	85,0	linear
31,0	80,0	20,0	linear
36,0	80,0	20,0	linear

10 Detektion UV 200 nm
 Laufzeit 36,0 min
 Waschen Methanol / Wasser: 9/1 (v/v)

d. Herstellung der Lösungen und Proben

15

Mobile Phase A H₂O (eingestellt auf pH 2,6 mit H₃PO₄ (85%))

Mobile Phase B Acetonitril

20 Blank Verdünnungsmittel: Methanol / Wasser: 9/1 (v/v)

System Suitability Solution (SST) 5,00 mg DHCA, 5,00 mg 12-Keto-UDCA, 5,00 mg 3,12-Diketo-UDCA und 5,00 mg 7,12-Diketo-CA (jeweils genau eingewogen) in 10,0 ml Verdünnungsmittel

25

Testlösung 1 ml Reaktionslösung, verdünnt mit 9 ml Verdünnungsmittel; behandelt mit Ultraschall bei Zimmertemperatur und 10 min. zentrifugiert.

e. Ablauf

Analysensequenz:

5	- Blank	1 x Injektion
	- System Suitability Solution (SST)	1 x Injektion
	- Testlösung	2 x Injektion
	- Blank	1 x Injektion

10 **Regenerierung:**

Nach jeder Sequenz wird die Säule mit Methanol / Wasser (4 / 6 bis 9 / 1 (v/v)) regeneriert. Dann wird die Säule mit Acetonitril / Wasser (4 / 6 (v/v)) gespült.

f. Auswertung

15

Bestimmung der Retentionszeiten (Rt) der Verbindungen aus Analyse der SST Probe.

Flächen- % Analyse von

- DHCA (Edukt)
- 20 • 12-Keto-UDCA (Produkt)
- 3,12-Diketo-UDCA (Intermediat)
- 7,12-Diketo-CA (Intermediat)

Retentionszeiten:

25

Analyt	ca. RT (min)	RRT
12-Keto-UDCA	13,9	1,00
3,12-Diketo-UDCA	14,5	1,04
7,12-Diketo-CA	16,5	1,18
DHCA	17,9	1,28

RT: Retentionszeit

RRT: Relative Retentionszeit

30

7. Stereoselektive Reduktion von Dehydrocholsäure

5 7.1 Satz-Reduktion im 2 mL-Maßstab

Satz-Reduktionen im 2 mL-Maßstab wurden für die mechanistische Modellierung der multi-enzymatischen Reduktion von DHCA zu 12-Keto-UDCA als Validierungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden Deep Well-Platten mit quadratischen Vertiefungsöffnungen und V-förmigen Boden mit einem Nennvolumen von 2,0 mL pro Vertiefung verwendet. Zur Durchmischung wurden die Deep-Well-Platte auf einem Laborschüttler bei 500 rpm geschüttelt. Um Temperaturkonstanz zu gewährleisten, befand sich der gesamte Aufbau in einem auf 30 °C temperierten Inkubationsschrank. Die Reaktionsgemische, bestehend aus DHCA, NAD, NADP, 3 α -HSDH, 7 β -HSDH und GDH lagen in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,0) mit Zusatz von 0,6 % ((w)/v) BSA vor und wurden direkt in den Vertiefungen angesetzt. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von Glucoselösung und anschließendem dreimaligen Invertieren der Deep-Well-Platte. Verwendet wurden Enzyme, die gemäß Abschnitt 5.2 aufgereinigt wurden. Die Probenahme erfolgte halbstündlich durch Entnahme von 100 μ L Reaktionsansatz, welcher direkt mit 900 μ L Methanol (77 %, v/v) versetzt wurde. Die mit Methanol versetzten Proben wurden anschließend durch Vortexen vermischt und 10 min bei 20 13000 rpm in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde danach mittels HPLC analysiert. Sämtliche Reaktionen wurden im Dreifachansatz durchgeführt.

25 7.2 Satz-Reduktion im 20 mL-Maßstab

Stereoselektive Reduktionen von DHCA im 20 mL-Maßstab erfolgten in Enghals-Schraubverschlussflaschen (DURAN Group, Wertheim/Main) mit einem Nennvolumen von 50 mL, einem Innendurchmesser von 41 mm und einem GL32-Schraubverschlussgewinde. Für die Durchmischung sorgte ein kreuzförmiger Magnetrührer bei 450 rpm, der von einer 30 Mehrfachrührplatte (Variomag Multipoint, Thermo Scientific, Waltham, USA) angetrieben wurde. Um Temperaturkonstanz zu gewährleisten, befand sich der gesamte Aufbau in einem temperierten Inkubationsschrank. Für die Reaktionsansätze wurde das Substrat DHCA zunächst mit äquimolarer Menge an NaOH vorgelöst. Der Reaktionsansatz, bestehend aus DHCA, Kosubstrat (Glucose oder Formiat), und gegebenenfalls weiteren Zusätzen wie 35 NAD(P), Glycerin, MgCl₂ wurde vor Beginn der Reaktion zusammengemischt. Als Puffer diente Kaliumphosphat (50 mM) und der pH wurde wahlweise mit Natronlauge, Phosphorsäure oder Ameisensäure (jeweils 5 M) auf den gewünschten Wert eingestellt. Gestartet

wurde die Reaktion durch die Zugabe von Ganzzellbiokatalysatoren. Während der Reaktion wurde der pH in 30-minütigen Abständen mit einem Hand-pH-Meter (pH-Tester Checker®, Carl Roth, Karlsruhe) gemessen und gegebenenfalls mit Natronlauge, Phosphorsäure oder Ameisensäure (jeweils 5 M) auf den Ausgangswert eingestellt. Die Probenahme erfolgte in Abständen von 30 oder 60 Minuten, indem 300 µL Reaktionsansatz entnommen und mit 700 µL Methanol (≥ 99,9 %) vermischt wurden. Anschließend wurde das Proben-Methanol-Gemisch 3:10 mit 70 %-igem Methanol (v/v) verdünnt und 10 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Vom Überstand wurde eine Probe entnommen und 1:10 mit Methanol (70 %, v/v) verdünnt, in Probiergläser gegeben und mittels HPLC analysiert. Sämtliche Reaktionen erfolgten im Dreifachansatz

7.3 Satz-Reduktion im 1 L-Maßstab

Stereoselektive Reduktionen von DHCA im 1 L-Maßstab erfolgten in einem 1,5 L Rührkesselreaktor der Firma Infors AG (Infors 3, Bottmingen, Schweiz) ohne Strömungsbrecher. Der Reaktor war mit Sonden für Temperatur und pH ausgestattet, so dass diese Parameter von einer Steuerungseinheit online abgelesen und gegebenenfalls geregelt werden konnten. Temperiert wurde der Reaktor über einen an die Steuerungseinheit angeschlossenen Doppelmantel und die Durchmischung erfolgte durch zwei Sechsstab-Scheibenrührer bei 500 – 1000 rpm, die über einen Motor am Deckel des Reaktors angetrieben wurden. Zudem konnte über Zulaufpumpen Säure (Phosphorsäure, 5 M) oder Base (Natronlauge, 5 M) zur pH-Regulation in den Reaktor zugegeben werden. Das Substrat DHCA wurde entweder in äquimolarer Natronlauge vorgelöst oder direkt als freie Säure in Pulverform zugegeben. Sämtliche weitere Bestandteile wurden ebenfalls entweder als Feststoff oder als Stammlösung zugegeben. Nach Auffüllen auf das entsprechende Volumen und der Einstellung des gewünschten pH wurde die Reaktion mittels Zugabe von Ganzzellbiokatalysatoren gestartet. Die Probenahme erfolgte im Abstand von 30 oder 60 min wie unter Abschnitt 7.2 beschrieben.

7.4 Isolation von Gallensalzen durch Säurepräzipitation

Die Isolation von Gallensalzen beruht auf der geringen Löslichkeit von Gallensalzen in ihrer protonierten Form bei saurem pH. Hierzu wird ein Gemisch mit gelösten Gallensalzen im gerührten Zustand mit Salzsäure (6 M) tröpfchenweise auf pH ≤ 2,0 titriert. Die gelösten Gallensalze fallen hierbei nahezu vollständig als Feststoff aus. Dieser wurde anschließend mit Hilfe eines Büchnertrichters mit eingesetztem Filterpapier (Durchmesser 150 mm, Rückhaltebereich ≥ 4 µm) von der restlichen Lösung getrennt. Bei Bedarf konnte das Gallensalz gewaschen werden, indem es in Reinstwasser gegeben und durch Titration mit Natronlauge (5 M) auf pH 8 – 9 gelöst, mit dem Büchnertrichter filtriert und anschließend wieder durch

Säurepräzipitation isoliert wurde. Für die Darstellung von 7,12-Diketo-UDCA und 12-Keto-UDCA erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang, für die Darstellung von 3,12-Diketo-UDCA erfolgte der Waschvorgang einmal. Anschließend wurde das isolierte Gallensalz bei 60 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

5

8. Standardisierte Prüfvorschrift für die Umsetzung von Dehydrocholsäure (DHCA) zu 12-Keto-ursodeoxycholsäure (12-Keto-UDCA) mittels Ganzzell-Katalysator (mit 3 α -HSDH, 7 β -HSDH und GDH-Aktivität)

10 **8.1 Reagenzien**

$K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ (≥ 99 %, p.a.); Fa. Roth

KH_2PO_4 (kristallin, reinst); Fa. Merck

$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ ($\geq 99,5$ %, Ph. Eur.); Fa. Roth

$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ (≥ 99 %, p.a.); Fa. Roth

15 DHCA Fa. PharmaZell

β -NAD: Fa. Roth

β -NADP- Na_2 Fa. Merck,

Ganzzell-Katalysator (mit 3 α -HSDH, 7 β -HSDH und GDH-Aktivität) bei -20 °C gelagert)

HCl (37%)

20 NaOH (10%)

8.2 Herstellung der Pufferlösung (Vorratslösung)

Zur Herstellung der Puffer-Vorratslösung werden nacheinander 2,54 g Di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat und 0,18 g Kaliumdihydrogenphosphat eingewogen und
25 in 1000 ml VE-Wasser gelöst; pH-Wert der Lösung: 7,8 bei 25 °C.

8.3 Herstellung der NAD/NADP-Lösung (Vorratslösung)

Zur Herstellung der NAD/NADP-Vorratslösung werden nacheinander 158 mg β -NADP- Na_2 und 663 mg β -NAD in einen 1000ml-Messkolben eingewogen, mit VE-Wasser aufgefüllt und
30 gelöst.

8.4 Probenvorbereitung des Ganzzell-Katalysators (Zellsuspension)

Vor Entnahme der Zell-Suspension ist die Probe auf Raumtemperatur (RT) zu erwärmen. Dauer der Erwärmung ca. 30 min bis ca. 3 Stunden.

35

8.5 Reaktionsansatz (Ganzzell-Umsetzung und DHCA zu 12-Keto-UDCA)

180 ml der o.g. Puffer-Vorratslösung werden im Erlenmeyerkolben auf 26 – 28 °C vorge-

wärmt. Anschließend werden 13,87 g (0,07 mol) α -D(+)-Glucosemonohydrat im 250ml-Dreihalskolben mit ca. 2/3 des Volumens des vorgewärmten Puffers gelöst. 5,64 g (0,014 mol) Dehydrocholsäure (DHCA) zusammen mit dem restlichen Puffer in der Glucose-Pufferlösung suspendiert und auf 26 – 28 °C im Wasserbad erwärmt, dabei sinkt der pH-Wert bereits und wird auf 6,8 eingestellt. Ohne Zeitverzug werden der Suspension nacheinander 36 mg (0,18 mmol) Magnesiumchloridhexahydrat, 10 ml der NAD/NADP-Vorratslösung und 5 ml aufgetaute Zellsuspension hinzugefügt.

Die Reaktionssuspension wird 8 h im Wasserbad (bei 26 - 28 °C) gerührt. Der pH-Wert der Suspension soll bei Verwendung eines pH-Meters und manueller pH-Nachführung (Titration mit 10%-iger NaOH-Lösung) stets zwischen pH 6,70 und 6,90 liegen. Beim alternativen Einsatz eines pH-Stat soll der pH stets bei pH 6,8 liegen.

8.6 HPLC-Analyse

Nach 0,5h, 1h, 1,5h, 2h, 2,5h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h und 8h Reaktionszeit werden zur Reaktionsverfolgung Proben (1 ml Volumen) der Reaktionssuspension mit einer Pipette entnommen und mittels HPLC analysiert (vgl. IPC-Methode oben):

1 ml Probenvolumen wird hierzu in einem 20 ml Schnappdeckelglas mit 9 ml Lösungsmittelmix aus Methanol/H₂O (9:1; v/v) verdünnt und gut durchmischt. Das Schnappdeckelglas wird verschlossen. Vor Injektion auf die HPLC-Säule muss die trübe, verdünnte Lösung zentrifugiert werden. Anschließend wird der klare Überstand abgehoben und hieraus das Injektionsvolumen entnommen.

Die Reaktion wird nach geeigneter Zeit, z.B. 7 bis 10 h, wie z.B. nach 8h Reaktionszeit beendet. Hierzu wird die trübe Reaktionslösung mit ca. 4 - 5 ml konz. HCl angesäuert (pH \leq 1,5) und für 30 min. nachgerührt.

8.7 Auswertung

30

Ermittlung der Reaktionskinetik:

Die Reaktionsverfolgung/Reaktionskinetik setzt sich aus dem (nicht analysierten) Startpunkt „0h“ (für DHCA: 100 Area %, für alle weiteren Analyten: 0 Area %) und z.B. 11 weiteren Messpunkten / HPLC-Analysen (z.B. nach 0,5h, 1h, 1,5h, 2h, 2,5h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h und 8h Reaktionszeit) zusammen.

Die Zusammensetzung der Analyten im aktuellen Probenzug (zum Zeitpunkt: x h Reaktions-

dauer) ist zu ermitteln. Hierzu werden die Area-%-Angaben im HPLC-UV-Chromatogramm zu den Analyten DHCA (Edukt), 12-Keto-UDCA (Endprodukt), 3,12-Diketo-ursodeoxycholsäure (3,12-Diketo-UDCA; Intermediat) und 7,12-Diketo-cholsäure (7,12-Diketo-CA; Intermediat) ausgewertet und protokolliert.

5

B. Ganzzell-Reduktion

Beispiel B.1: Zweistufige Ganzzellreduktion von DHCA mit drei verschiedenen Ganzzellbiokatalysatoren ($X = 67$).

10

Für die Umsetzungen wurden die Biokatalysatorstämme *E. coli* BL49 p7(A)T3rG, *E. coli* BL21 Δ hdhA p7(A)T3rG-K und *E. coli* BL49 p7(A)T3TG verwendet. Die Plasmide p7(A)T3rG, p7(A)T3rG-K und p7(A)T3TG verfügen jeweils über Expressionskassetten, in denen die Gene 7 β -HSDH, 3 α -HSDH und GDH codiert sind, allerdings mit unterschiedlicher Struktur der Expressionskassette und mit unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen. Diese Plasmide wurden wahlweise in den Wirtstamm *E. coli* BL49 oder *E. coli* BL21 Δ hdhA (beide aus der WO 2012/080504 bzw der WO 2011/147957 der Anmelderin bekannt) transformiert, bei denen es sich unterschiedliche Knock-out-Stämme handelt, bei denen jeweils die genomische 7 α -HSDH ausgeknockt wurde. Die Expressionsplasmide sind in Figur 3 dargestellt.

15

20

Mit den genannten Biokatalysatoren wurden Umsetzungen im 1 L-Maßstab durchgeführt. Dabei wurden jeweils 1 g_{BTM} L⁻¹ Biokatalysator, 0,05 mM NAD und 0,01 mM NADP eingesetzt, somit ergibt sich für alle drei Ansätze $X = 67$. Weitere Bedingungen der Umsetzung waren: 70 mM DHCA, 350 mM Glucose, 10 mM MgCl₂, 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7, 30 °C. Maßgeblich für die Beurteilung der Umsetzung ist die Menge des gebildeten Produktes (12-keto-UDCA) im Reaktionsansatz. Die Konzentrationen des Substrats DHCA, der Intermediate 3,12-diketo-UDCA und 7,12-diketo-UDCA sowie des Produkts 12-keto-UDCA im Reaktionsansatz kann durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ermittelt werden.

25

30

Die Verläufe der Reaktionen sind in Figur 4 dargestellt. Mit sämtlichen Ansätzen konnten nach 5-6 h ein Umsatz von > 99 % erzielt werden. Somit ist ersichtlich, dass die Formel für verschiedene Ganzzellbiokatalysatorstämme gültig ist, so lange alle drei Enzyme 7 β -HSDH, 3 α -HSDH und GDH exprimiert werden.

35

Beispiel B.2 Zweistufige Ganzzellreduktion von DHCA mit $3,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Biokatalysator und $0,025 \text{ mM NAD}$ ($X = 147,5$).

Für die Umsetzung wurde der Biokatalysatorstamm *E. coli* BL49 p7(A)T3rG verwendet. Dabei wurden $3,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Biokatalysator, $0,025 \text{ mM NAD}$ und kein NADP eingesetzt, somit ergibt sich für diesen Ansatz $X = 147,5$. Weitere Bedingungen der Umsetzung waren: 70 mM DHCA , 350 mM Glucose , 10 mM MgCl_2 , $50 \text{ mM Kaliumphosphatpuffer}$, $\text{pH } 7$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 mL Reaktionsvolumen.

Der Verlauf der Reaktion ist in Figur 5 dargestellt. Mit diesem Ansatz kann nach 24 h ein Umsatz von $> 99 \%$ erzielt werden. Somit hat die Formel Gültigkeit für diesen Ansatz. Weiterhin wird gezeigt, dass nicht zwingend notwendig NAD und NADP zugegeben werden muss, sondern auch die Zugabe eines der Substanzen ausreichend sein kann.

15 Beispiel B.3 Zweistufige Ganzzellreduktion von DHCA mit $1,75 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Biokatalysator, $0,025 \text{ mM NAD}$ und $0,01 \text{ mM NADP}$ ($X = 89,5$).

Für die Umsetzung wurde der Biokatalysatorstamm *E. coli* BL49 p7(A)T3rG verwendet. Dabei wurden $1,75 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Biokatalysator, $0,025 \text{ mM NAD}$ und $0,01 \text{ mM NADP}$ eingesetzt, somit ergibt sich für diesen Ansatz $X = 89,5$. Weitere Bedingungen der Umsetzung waren: 70 mM DHCA , 350 mM Glucose , 10 mM MgCl_2 , $50 \text{ mM Kaliumphosphatpuffer}$, $\text{pH } 7$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 mL Reaktionsvolumen.

Der Verlauf der Reaktion ist in Figur 6 dargestellt. Mit diesem Ansatz kann nach 24 h ein Umsatz von $> 98 \%$ erzielt werden. Somit hat die Formel Gültigkeit für diesen Ansatz.

Beispiel B.4 Zweistufige Ganzzellreduktion von DHCA mit $1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Biokatalysator, $0,04 \text{ mM NAD}$ und $0,0075 \text{ mM NADP}$ ($X = 61$).

Für die Umsetzung wurde der Biokatalysatorstamm *E. coli* BL21 ΔhdhA p7(A)T3rG-K verwendet. Dabei wurden $1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ L}^{-1}$ Biokatalysator, $0,04 \text{ mM NAD}$ und $0,0075 \text{ mM NADP}$ eingesetzt, somit ergibt sich für diesen Ansatz $X = 61$. Weitere Bedingungen der Umsetzung waren: 70 mM DHCA , 200 mM Glucose , 5 mM MgCl_2 , 4% (v/v) Glycerin, $50 \text{ mM Kaliumphosphatpuffer}$, $\text{pH } 7$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 mL Reaktionsvolumen.

Der Verlauf der Reaktion ist in Figur 7 dargestellt. Mit diesem Ansatz kann nach 24 h ein Umsatz von $> 99 \%$ erzielt werden. Somit hat die Formel Gültigkeit für diesen Ansatz.

Beispiel B.5 Zweistufige Ganzzellreduktion von DHCA mit dem Ganzzellbiokatalysators *E. coli* BLLiu p7(A)T3TG-K

5 Es wurde ein kanamycinresistender Ganzzellbiokatalysatorstamm mit erhöhter GDH-Expression hergestellt. Das Plasmid p7(A)T3rG-K wurde dabei dahingehend modifiziert, dass in die Expressionskassette ein zusätzlicher T7-Promotor vor der GDH eingefügt wurde. Das resultierende Plasmid trägt die Bezeichnung p7(A)T3TG-K und wurde in den Wirtstamm *E. coli* BLLiu transformiert. Der resultierende Ganzzellbiokatalysator trägt die Bezeichnung *E. coli* BLLiu p7(A)T3TG-K.

a) Kultivierung des Ganzzellbiokatalysators *E. coli* BLLiu p7(A)T3TG-K

15 Der Stamm *E. coli* BLLiu p7(A)T3TG-K wurde im Rührkesselreaktor nach Standardprotokoll kultiviert und hinsichtlich des Wachstums- und Expressionsverhaltens mit verwandten Stämmen verglichen.

20 Der Stamm *E. coli* BLLiu p7(A)T3TG-K wurde dazu nach Standardprotokoll im Rührkesselreaktor bei einer Expressionstemperatur von 25 °C kultiviert. Die bei Erntezeitpunkt vorliegenden Zellkonzentrationen und Enzymaktivitäten sind in folgender Tabelle 3 angegeben. Dem gegenübergestellt sind die Daten des ursprünglichen kanamycinresistenten Stamms *E. coli* BLLiu p7(A)T3rG-K und die Daten des ampicillinresistenten Stamms BL49 p7(A)T3TG mit ebenfalls erhöhter GDH-Aktivität

25 Aus der Tabelle lässt sich entnehmen, dass der neue Stamm *E. coli* BLLiu p7(A)T3TG-K über deutlich höhere 7 β -HSDH-Aktivitäten verfügt als die jeweiligen Vergleichsstämme (Faktor 2,4-2,7). Die 3 α -HSDH-Aktivität ist auf dem Niveau des höchsten Wertes unter den Vergleichsstämmen. Die GDH-Aktivität ist hingegen um den Faktor 4-10 höher als die des kanamycinresistenten Stamms *E. coli* BLLiu p7(A)T3rG-K, beträgt jedoch nur 70 % der GDH-Aktivität des ampicillinresistenten Stamms BL49 p7(A)T3TG. Die erzielte Zellkonzentration zum Erntezeitpunkt war durchgehend höher als bei den Vergleichsstämmen.

35 **Tabelle 3:** Vergleich der Wachstums und Expressionsdaten des Stamms *E. coli* BLLiu p7(A)T3TG-K mit den Stämmen *E. coli* BLLiu p7(A)T3rG-K und *E. coli* BL49 p7(A)T3TG

Stamm	BLLiu p7(A)T3rG-K	BL49	BLLiu
-------	-------------------	------	-------

				p7(A)T3TG	p7(A)T3TG-K
$T_{\text{Expression}}$, °C	20	25	30	20	25
OD, -	69	64	66	62	78
BTM, g L ⁻¹	33	34	37	37	40
7 β -HSDH, U g _{BTM} ⁻¹	565	509	556	490	1360
3 α -HSDH, U g _{BTM} ⁻¹	111	135	74	70	135
GDH, U g _{BTM} ⁻¹	343	184	127	1900	1300

b) Biotransformation des Ganzzellbiokatalysators *E. coli* BLLiu p7(A)T3TG-K

- 5 Der im Rührkesselbioreaktor kultivierte neue Stamm *E. coli* BLLiu p7(A)T3TG-K wurde hinsichtlich der Ganzzellbiokatalyseleistung.

Für die Evaluation der Ganzzellbiokatalyseleistung wurden sowohl bei -20 °C gelagerte Zellen als auch bei Raumtemperatur und 4 °C gelagerte verwendet. Im Gegensatz zu vorherigen Stämmen reichte bei diesem Stamm eine Lagerdauer von 1 d bei Raumtemperatur nicht aus, um die volle Aktivität der Zellen zu erhalten. Deswegen wurde der Stamm nach 1 d Lagerung bei Raumtemperatur und 3 d Lagerung bei 4 °C erneut 3 d bei Raumtemperatur gelagert und anschließend für die Biotransformation verwendet.

- 15 Die Reaktionsbedingungen für die Ganzzellbiotransformationen waren: 70 mM DHCA, 350 mM Glucose, OD 2 Zellen, 50 μ M NAD, 10 μ M NADP, 1 mM MgCl₂, 50 mM KPi-Puffer (pH 7,0), 30 °C. Zusätzlich wurde bei den bei Raumtemperatur gelagerten Zellen ein Versuch mit der doppelten NAD-Konzentration von 100 μ M durchgeführt. Der pH wurde halbstündlich manuell mit NaOH-Lösung (5 M) auf den Ausgangswert eingestellt. Die Verläufe der Biotransformationen sind in Figur 11 dargestellt.

Bei Vergleich der Biotransformationen bei standardmäßigen NAD-Konzentrationen (50 μ M) waren die Reaktionen nach 4 h (bei -20 °C gelagerte Zellen) bzw. 4,5 h (bei RT/4 °C gelagerte Zellen) beendet. Die Dauer der Biotransformationen liegt damit im Rahmen bzw. leicht unterhalb der Zeiten, die mit anderen Biokatalysatorstämmen erzielt wurden (4,5 h-6 h). Erkennbar ist jedoch die ungleichmäßige Nebenproduktbildung. Bei beiden Ansätzen akkumuliert das Zwischenprodukt der 7 β -HSDH (3,12-diketo-UDCA) stärker als das Zwischenprodukt der 3 α -HSDH. Dies ist auf die deutlich erhöhte 7 β -HSDH-Aktivität dieses Stammes im Vergleich zu anderen Ganzzellbiokatalysatorstämmen zurückzuführen. Wird die NAD-Konzentration – und somit die Kofaktorkonzentration für die 3 α -HSDH-Umsetzung – erhöht,

so resultiert das in einer Angleichung der Reaktionsgeschwindigkeiten beider HSDH, was in einer gleichmäßigen Bildung beider Zwischenprodukte zu erkennen ist. Zudem verringert sich die Dauer der Biotransformation von 4,5 h auf 4,0 h.

5

C. 7 β -HSDH-Mutanten

Beispiel C.1: Herstellung von 7 β -HSDH Mutanten mit NADH Spezifität

10

Hierin werden Enzymmutanten der 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens* beschrieben, die mittels Protein Engineering hergestellt wurden, und die NADH anstelle von NADPH als Kofaktor akzeptieren.

15

Die erfindungsgemäßen 7 β -HSDH-Mutanten unterscheiden sich gegenüber der publizierten Sequenz des nativen Enzyms in ihrer Aminosäuresequenz an den Positionen 39, 40, 41 und/oder 44, und von den bekannten 7 β -HSDH-Mutanten an den Positionen 40, 41 und 44.

20

Die Mutante 7 β -HSDH DF enthält gegenüber der Wildtypsequenz die Aminosäuresubstitutionen G39D R40F, die Mutante 7 β -HSDH DFK enthält gegenüber der Wildtypsequenz die Aminosäuresubstitutionen G39D R40F R41K und die Mutante 7 β -HSDH DFKG enthält gegenüber der Wildtypsequenz die Aminosäuresubstitutionen G39D R40F R41K K44G (vgl. Figur 8)).

25

C.1.2 Herstellung der NADH-abhängigen Einfachmutante G39D

30

Die G39D-Mutante der 7 β -HSDH wurde wie in der WO 2012/080504 beschrieben hergestellt. Das Protein wurde mit N-terminalem His-Tag exprimiert und über IMAC aufgereinigt. Ein erster Aktivitätsassay zeigte nur sehr geringe NADPH-Aktivität ($0,040 \pm 0,005$ U mg⁻¹ bei 10 mM DHCA, 0,5 mM NADPH und pH 8,0). Dafür war eine deutliche NADH-Aktivität zu beobachten.

C.1.3 Gerichtete Evolution der NADH-abhängigen 7 β -HSDH

35

a) Herstellung des Wirtsstamms für die Mutantenbibliothek

Die weitere Mutagenese soll nach dem Prinzip der iterativen Sättigungsmutagenese erfolgen (Reetz et al., *Mol. Biosyst.*, 5(2):115-22, 2009). Für die Herstellung einer Mutantenbibliothek wird hierzu ein *E. coli*-Wirtsstamm benötigt, der über eine hohe Transformationseffizienz verfügt und gleichzeitig gut für eine Durchmusterung mit Zellysat geeignet ist. Da *E. coli* über eine genomisch codierte 7β -HSDH verfügt, welche in der Durchmusterung eine Nebenreaktion katalysiert und somit Messdaten verfälschen kann, muss auf einen Wirtsstamm zurückgegriffen werden, bei dem dieses Gen ausgeschaltet ist. Die beiden vorhandenen Knockout-Stämme BL49 und BLLiu sind jedoch beides *E. coli*-BL21(DE3)-Derivate, die über eine geringe Transformationseffizienz verfügen. Somit musste zunächst ein geeigneter Wirtsstamm hergestellt werden, indem die genomische 7α -HSDH ausgeschaltet wird.

Als Ausgangsstamm für den Knockout wurde *E. coli* NovaBlue(DE3) gewählt, einem K-12-Derivat mit hoher Transformationseffizienz. Gleichzeitig ermöglicht die DE3-Kassette eine Expression von Fremdprotein mit dem T7-Expressionssystem, wodurch sich dieser von *E. coli* DH5 α unterscheidet. Die erfolgreiche Ausschaltung des Gens für die 7α -HSDH und das anschließende Ausschleusen des Knockout-Plasmids wurden durch Kultivierung auf entsprechenden Selektionsantibiotika, PCR und Sequenzierung bestätigt. Dieser Stamm trägt die Bezeichnung *E. coli* NB13.

20 b) Auswahl der zu mutierenden Positionen

Zu den konservierten Bereichen in NADPH-bindenden SDR (short chain dehydrogenase reductase) zählen vor allem basische Aminosäurereste in der Kofaktorbindetasche, welche die NADP(H)-Bindung durch Säure-Base-Interaktion mit der 2'-Phosphatgruppe an der Adenosinribose des NADP(H) stabilisieren (Carugo, O. & Argos, P., *Proteins*, 28(1):10-28, 1997a + *Proteins*, 28(1): 29-40, 1997b; Woodyer et al., *Biochemistry*, 42(40):11604-14, 2003). Allen voran ist die zur Position 39 benachbarte Position 40 zu betrachten, an der sich bei NADPH-bindenden SDR in der Regel ein Arginin oder ein Lysin befindet (Bellamacina, C. R., *FASEB J.*, 10(11):1257-69, 1996; Kallberg et al., *Eur. J. Biochem.*, 269(18):4409-4417, 2002; Persson, B., *Chem. Biol. Interact.*, 143-144:271-278, 2003).

Bei der 7β -HSDH befindet sich an der zur G39 benachbarten Position mit R40 ebenfalls eine basische Aminosäure. Zusätzlich wurden mit R41 und K44 zwei weitere basische Aminosäuren in unmittelbare Nähe zur Bindetasche identifiziert. Diese drei Positionen wurden als Zielpositionen für die iterative Sättigungsmutagenese festgelegt.

c) Durchführung der gerichteten Evolution

Verwendete Primer:**7 β -HSDH G39D R40F (DF).**

- 5 7beta mut G39D R40F fwd: CGTCGTCATGGTCGACTTTCGCGAGG (SEQ ID NO: 14)
 AntiMid rev: CCGCCGCATCCATACCGCCAGTTGTTTACCC (SEQ ID NO: 15)

7 β -HSDH G39D R40F R41K (DFK)

- 7beta DF mut R41K fwd: CGTCGTCATGGTCGACTTTAAAGAGGAGAAGCTG (SEQ ID NO:16)
 10 AntiMid rev: CCGCCGCATCCATACCGCCAGTTGTTTACCC (SEQ ID NO: 15)

7 β -HSDH G39D R40F R41K K44G (DFKG)

7beta DFK mut K44NDT fwd: GTCGACTTTAAAGAGGAGNDTCTGAACGTGCTC (SEQ ID NO:17)

- 15 Dieser Primer enthält ein degeneriertes Codon, so dass auch andere Aminosäure als G an Position 44 entstehen können.

AntiMid rev: CCGCCGCATCCATACCGCCAGTTGTTTACCC (SEQ ID NO: 15)

- 20 Die gerichtete Evolution wurde in drei Mutageneserunden durchgeführt, bei der jeweils eine Position mutiert wurde. Die Mutante jeder Runde, die bei der Durchmusterung die höchste NADH Aktivität zeigte, wurde zur Identifikation der Mutation sequenziert und diente bei der darauffolgenden Runde als Ausgangsmutante. Die Mutagenese erfolgte ausgehend von 7 β -HSDH G39D (D) zunächst an Position R40. Die hierbei beste Mutante war 7 β -HSDH G39D
 25 R40F (DF). Danach erfolgte die Mutagenese an der Position R41 mit 7 β -HSDH G39D R40F R41K (DFK) als beste Mutante und zum Schluss an der Position K44 mit 7 β -HSDH G39D R40F R41K K44G (DFKG) als beste Mutante.

30 ***Beispiel C.2: Enzymkinetische Untersuchung der 7 β -HSDH-Mutanten mit NADH Spezifität***

- Die Bewertung der erstellten Mutanten erfolgt mittels enzymkinetischer Untersuchungen. Für die Untersuchung der DHCA-Kinetik wurden 0,5 mM NADH als Kofaktor eingesetzt (Figur 9), während für die Untersuchung der NADH-Kinetik 10 mM DHCA als Substrat eingesetzt wurde (Figur 10). Aus den Auftragungen der DHCA-Kinetiken lassen sich für die 7 β -
 35 HSDH Mutanten die charakteristischen Kurvenverläufe der Michaelis-Menten-Kinetik erkennen, dabei wurde keine Substratinhibition beobachtet. Dementsprechend wurde das klassische Michaelis-Menten-Modell (Gleichung 1) für die Auswertung der kinetischen Parameter

verwendet. Die NADH-Kinetiken zeigen hingegen einen linearen Verlauf und lassen keine Sättigung bei der Kofaktorkonzentration erkennen, deshalb konnten hierfür keine kinetischen Parameter bestimmt werden.

5 Gleichung 1: Michaelis-Menten-Gleichung.

$$EA_X = v_{\max} \cdot \frac{c_s}{K_m + c_s}$$

EA_X : spezifische Enzymaktivität, $\text{U mg}^{-1} = \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

v_{\max} : maximale spezifische Enzymaktivität, $\text{U mg}^{-1} = \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

c_s : Substrat- bzw. Kofaktorkonzentration, mol L^{-1}

10 K_m : Halbsättigungskonzentration, mol L^{-1}

Die ermittelten kinetischen Parameter der neuen 7β -HSDH-Mutanten sind in **Tabelle 4** aufgeführt, zusätzlich enthält die Tabelle Vergleichswerte für die bereits berichteten Mutanten G39D und G39D R40I. Darin ist zu erkennen, dass die neuen Mutanten 7β -HSDH DFK und 7β -HSDH DFKG mit $5,91 \pm 0,23 \text{ U mg}^{-1}$ bzw. $5,72 \pm 0,19 \text{ U mg}^{-1}$ eine um 23 - 27 % höhere maximale spezifische Enzymaktivität zeigen als die bislang aktivste Mutante G39D R40I.

15

Tabelle 4: Enzymkinetische Parameter der neuen 7β -HSDH-Mutanten DF, DFK und DFKG mit NADH als Kofaktor. Als Referenz sind die zuvor hergestellten Mutanten G39D und G39D R40I angegeben.

20

	$K_m, \text{DHCA}, \mu\text{M}$	$v_{\max}, \text{U mg}^{-1}$
G39D	660 ± 120	$2,90 \pm 0,16$
G39D R40I	920 ± 170	$4,64 \pm 0,27$
DF	420 ± 60	$3,70 \pm 0,13$
DFK	290 ± 50	$5,91 \pm 0,23$
DFKG	380 ± 50	$5,72 \pm 0,19$

Beispiel C.3: Einstufige Biotransformation mit NADH-abhängigen 7β -HSDH-Mutanten

25 Zum Vergleich der NADH-abhängigen 7β -HSDHs wurden einstufige Biotransformationen von 50 mM DHCA zu 3,12-Diketo-UDCA im 2 mL-Maßstab im Dreifachansatz durchgeführt.

Dabei wurden aufgereinigte Enzyme eingesetzt und als Kofaktor lediglich NAD zugegeben. Zur Kofaktorregenerierung wurde eine GDH verwendet. Von den untersuchten 7 β -HSDH- (Wildtyp (WT), Mutanten: D, DF, DFK und DKFG) wurden jeweils 0,2 mg mL⁻¹ Enzym eingesetzt. Die restlichen Reaktionsbedingungen waren: 10 U mL⁻¹ GDH, 0,5 mM NAD, 50 mM DHCA, 200 mM Glucose, 500 mM Kaliumphosphat, pH 8,0. Die Reaktionen wurden im Dreifachansatz in geschüttelten DeepWell-Platten bei 30 °C als Satzverfahren ohne pH-Kontrolle im stark gepufferten System durchgeführt.

Die Ergebnisse der Biotransformation sind in Figur 12 gezeigt. Mit sämtlichen NADH-abhängigen Mutanten konnte mehr 3,12-Diketo-UDCA gebildet werden als mit dem Wildtyp-Enzym. Mit der Mutante DFKG konnte nach 16 h ein vollständiger Umsatz von DHCA zu 3,12-Diketo-UDCA erzielt werden.

15 **Beispiel C.4 Zweistufige Biotransformation mit NADH-abhängigen 7 β -HSDH-Mutanten**

Weiterhin wurden mit den NADH-abhängigen 7 β -HSDH-Mutanten DFK und DFKG zweistufige Biotransformationen von 50 mM DHCA zu 12-Keto-UDCA im 2 mL-Maßstab im Dreifachansatz durchgeführt.

20

Dabei wurden aufgereinigte Enzyme eingesetzt und als Kofaktor lediglich NAD zugegeben. Neben der 7 β -HSDH kamen eine 3 α -HSDH aus *Comomonas testosteroni* und eine GDH zur Kofaktorregenerierung zum Einsatz. Von den untersuchten 7 β -HSDH-Mutanten wurden jeweils 0,2 mg mL⁻¹ Enzym eingesetzt. Die restlichen Reaktionsbedingungen waren: 1 U mL⁻¹ 3 α -HSDH, 10 U mL⁻¹ GDH, 0,5 mM NAD, 50 mM DHCA, 200 mM Glucose, 500 mM Kaliumphosphat, pH 8,0. Die Reaktionen wurden im Dreifachansatz in geschüttelten DeepWell-Platten bei 30 °C als Satzverfahren ohne pH-Kontrolle im stark gepufferten System durchgeführt.

30 Die Reaktionsverläufe der jeweiligen Ansätze sind in Figur 13 gezeigt. Mit beiden 7 β -HSDH-Mutanten konnten ohne Zusatz von NADP vollständige Umsetzungen von DHCA zu 12-Keto-UDCA erzielt werden.

Tabelle 5: Zuordnung von SEQ ID NOs:

SEQ ID NO:	Beschreibung	Typ
1	7 β -HSDH (<i>C. aerofaciens</i>)	NS
2	7 β -HSDH(<i>C. aerofaciens</i>)	AS
3	3 α -HSDH (<i>C. testosteroni</i>)	NS
4	3 α -HSDH (<i>C. testosteroni</i>)	AS
5	7 α -HSDH	NS
6	7 α -HSDH	AS
7	GDH, (<i>B. subtilis</i>)	NS
8	GDH (<i>B. subtilis</i>)	AS
9	7 β -HSDH G39D	AS
10	7 β -HSDH G39D R40I	AS
11	7 β -HSDH G39D R40F	AS
12	7 β -HSDH G39D R40F R41K	AS
13	7 β -HSDH G39D R40F R41K K44G	AS
14	PCR Primer	NS
15	PCR Primer	NS
16	PCR Primer	NS
17	PCR Primer	NS
18	Plasmid p7(A)T3rG-A	NS
19	Plasmid p7(A)T3rG-K	NS
20	Plasmid p7(A)T3TG-A	NS
21	Plasmid p7(A)T3TG-K	NS

AS = Aminosäuresequenz

NS = Nukleinsäuresequenz

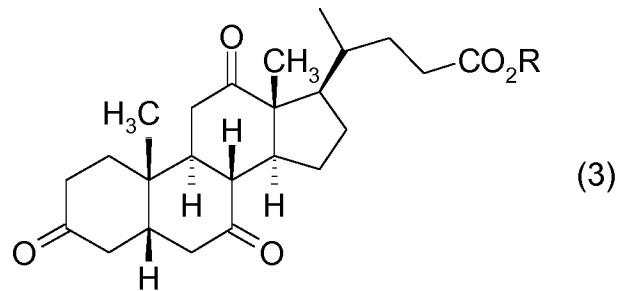
5

Auf die Offenbarung der hierin erwähnten Druckschriften wird ausdrücklich Bezug genommen.

10

Patentansprüche

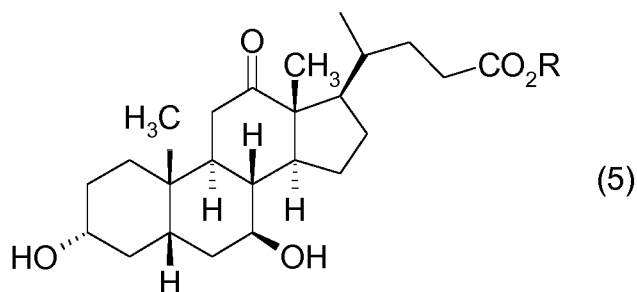
1. Verfahren zur biokatalytischen Reduktion einer Dehydrocholsäureverbindung
5 (DHCS) der allgemeinen Formel 3:



worin

- R für Alkyl, H, ein Alkalimetallion oder $N(R^3)_4^+$ steht, worin die Reste R^3 gleich oder verschie-
10 den sind und für H oder Alkyl stehen, oder die Gruppe $-CO_2R$ durch die Säureamid-Gruppe
 $-CONR^1R^2$, ersetzt ist, worin R^1 und R^2 unabhängig voneinander für einen Alkylrest stehen;

zur korrespondierenden 12-Keto-Ursodesoxycholsäureverbindung (12-Keto UDCS) der
Formel (5)



15

worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe $-CO_2R$ durch die
Säureamid-Gruppe $-CONR^1R^2$, wie oben definiert ersetzt ist,

- wobei man einen oder mehrere gleiche oder verschiedene Ganzzellbiokatalysatoren in ei-
20 nem flüssigen Reaktionsmedium, umfassend NAD(H) und/oder NADP(H), Glucose und ggf.
weitere Hilfsstoffe, sowie wenigstens ein Substrat der Formel (3) mit dem (den) Ganzzellbi-
okatalysator(en) in Kontakt bringt, und ggf. das Reaktionsprodukt aus dem Reaktionsmedi-
um isoliert; wobei die Reaktion in Gegenwart von 7β -Hydroxysteroiddehydrogenase (7β -
HSDH), (NADH- und/oder NADPH-abhängig); 3α -Hydroxysteroiddehydrogenase (3α -HSDH)
25 (NADH- und/oder NADPH-abhängig) und Glucosedehydrogenase (GDH) (NADH- und/oder
NADPH-abhängig) erfolgt; und wobei

der Ganzzellbiokatalysator oder die verschiedenen Ganzzellbiokatalysatoren zusammen gleichzeitig die Enzymaktivitäten

- (1) 7 β -HSDH und
 5 (2) 3 α -HSDH exprimieren, und gegebenenfalls
 (3) GDH exprimieren, wenn GDH dem flüssigen Reaktionsmedium nicht zugesetzt wird;

und wobei die Konzentrationen von Ganzzellbiokatalysator, NAD(H), NADP(H) und Substrat der Formel (3) im Reaktionsansatz in folgendem mathematischen Zusammenhang stehen:

10

$$X < Y \cdot 200$$

mit

$$Y = c_{\text{DHCS}} / 70$$

und

15

$$X = c_{\text{Kat}} \cdot 40 + c_{\text{NAD(H)}} \cdot 300 + c_{\text{NADP(H)}} \cdot 1200$$

worin die Parameter wie folgt definiert sind:

- c_{DHCS} = anfängliche Substratkonzentration [mM] einer Verbindung der Formel (3)
 c_{Kat} = Ganzzellbiokatalysator-Konzentration [$g_{\text{BTM}} L^{-1}$]
 20 $c_{\text{NAD(H)}}$ = Konzentration NAD(H) [mM]
 $c_{\text{NADP(H)}}$ = Konzentration NADP(H) [mM].

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Ganzzellbiokatalysator ein rekombinanter
 25 Mikroorganismus ist.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die

30

a) die 7 β -HSDH eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 oder eine davon abgeleitete Aminosäuresequenz mit wenigstens 60% Sequenzidentität aufweist;

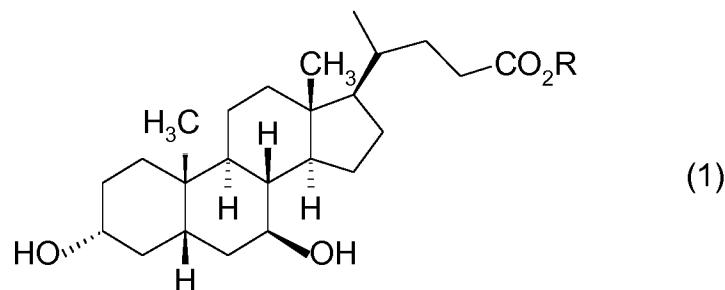
b) die 3 α -HSDH eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:4 oder eine davon abgeleitete Aminosäuresequenz mit wenigstens 60% Sequenzidentität aufweist; und/oder

35

c) die GDH eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:6 oder eine davon abgeleitete Aminosäuresequenz mit wenigstens 60% Sequenzidentität

aufweist;

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Biokatalysator ein rekombinanter Stamm von Mikroorganismen der Gattung *Escherichia*, insbesondere ein *E. coli* Stamm, ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die 7 β -HSDH, 3 α -HSDH und GDH gleiche oder verschiedenen Cofaktoren, ausgewählt unter NAD(H) und NADP(H), nutzen.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man die Reaktion in einem gepufferten wässrigen Reaktionsmedium, bei pH = 6 -8 durchführt.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei Glucose in einer anfänglichen Konzentration von 10 mM bis 3000 mM eingesetzt wird.
8. Verfahren zur Herstellung einer Ursodesoxycholsäure-Verbindung(UDCS) der Formel (1)



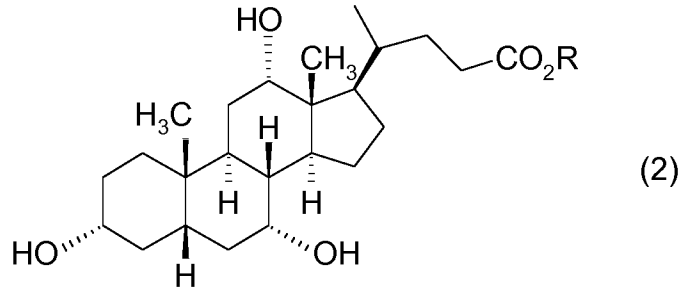
worin

R für Alkyl, H, ein Alkalimetallion oder $N(R^3)_4^+$ steht, worin die Reste R^3 gleich oder verschieden sind und für H oder Alkyl stehen, oder die Gruppe $-CO_2R$ durch die Säureamid-Gruppe $-CONR^1R^2$, ersetzt ist, worin R^1 und R^2 unabhängig voneinander für einen Alkylrest stehen;

wobei man

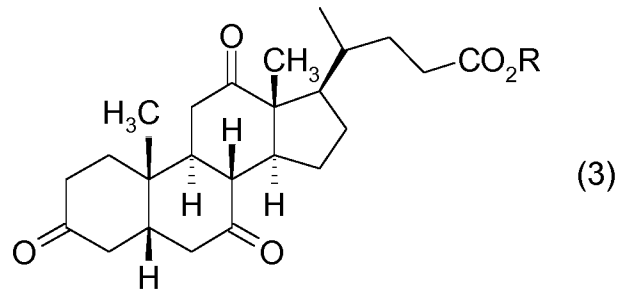
a) gegebenenfalls eine Cholsäure (CS) der Formel (2)

82



worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wie oben definiert ersetzt ist,

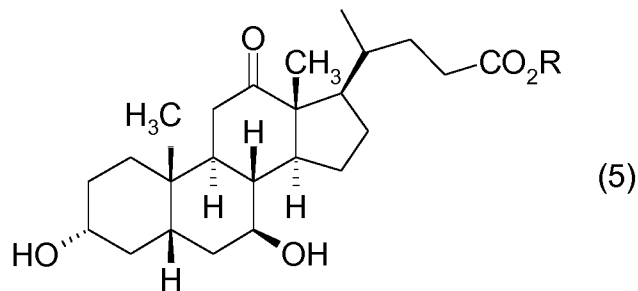
5 zur Dehydrocholsäure-Verbindung (DHCS) der Formel (3)



worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wie oben definiert ersetzt ist, insbesondere chemisch, oxidiert;

10

b) DHCS mittels eines biokatalytischen Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur korrespondierenden 12-Keto-ursodesoxycholsäure-Verbindung (12-Keto UDCS) der Formel (5)



15

worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wie oben definiert ersetzt ist, reduziert und anschließend

20 c) 12-Keto-UDCS der Formel (5) chemisch zur UDCS-Verbindung reduziert; und

d) das Reaktionsprodukt gegebenenfalls weiter aufreingt.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Enzymaktivitäten
5 in folgenden Konzentrationsbereich enthalten sind
- (1) 7 β -HSDH: 100 bis 1500 U/g_{BTM}
 - (2) 3 α -HSDH: 50 bis 500 U/g_{BTM}
 - (3) GDH: 100 bis 2000 U/g_{BTM}
- 10 10. 7 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (7 β -HSDH), welche wenigstens die stereospezifische enzymatische Reduktion eines 7-Ketosteroids zum korrespondierenden 7-Hydroxysteroid katalysiert, wobei das Enzym je eine Mutation in den Positionen G39 und R40 von SEQ ID NO:2 sowie gegebenenfalls in der Positionen R41 und/oder der Position K44 von SEQ ID NO:2 oder in den jeweils korrespondierenden Sequenzpositionen einer
15 davon abgeleiteten Aminosäuresequenz mit wenigstens 80% Sequenzidentität zu SEQ ID NO:2 umfasst.
11. 7 β -HSDH nach Anspruch 10, umfassend die Doppelmutation G39D/R40F.
- 20 12. 7 β -HSDH nach Anspruch 10 oder 11, umfassend die Dreifachmutation G39D/R40F/R41X₁, wobei X₁ für einen beliebigen andere Aminosäurerest, insbesondere für K, Q, S oder R und vor allem für K steht.
- 25 13. 7 β -HSDH nach Anspruch 10 bis 12, umfassend die Vierfachmutation G39D/R40F/R41X₁/K44X₂, wobei X₁ für einen beliebigen andere Aminosäurerest, insbesondere für K, Q, S oder R und vor allem K steht, und X₂ für einen beliebigen andere Aminosäurerest, insbesondere für G, N oder Q, und vor allem G steht.
- 30 14. Nukleotidsequenz kodierend für eine 7 β -HSDH nach einem der Ansprüche 10 bis 13.
15. Expressionskassette, umfassend unter der Kontrolle wenigstens einer regulatoriver Sequenz wenigstens eine Nukleotidsequenz nach Anspruch 14.
16. Expressionsvektor, umfassend wenigstens eine Expressionskassette nach Anspruch
35 15.
17. Rekombinanter Mikroorganismus, der wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß

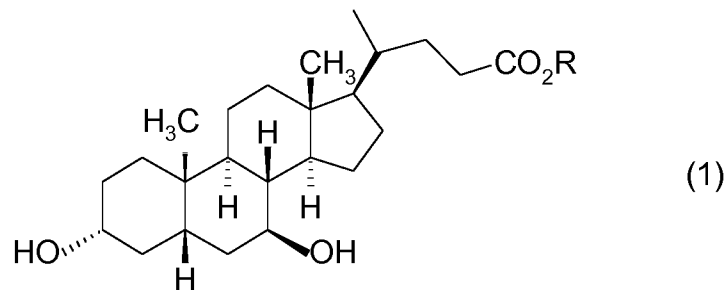
Anspruch 14 oder wenigstens eine Expressionskassette nach Anspruch 15 oder wenigstens einen Expressionsvektor nach Anspruch 16 trägt.

18. Rekombinanter Mikroorganismus nach Anspruch 17, der zusätzlich gegebenenfalls die kodierende Sequenz für wenigstens ein weiteres Enzym, ausgewählt unter Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSDH) und zur Cofaktorregenerierung geeignete Dehydrogenasen, trägt.

19. Rekombinanter Mikroorganismus nach Anspruch 18, wobei die weitere HSDH ausgewählt ist unter 3α -HSDHs; und die Dehydrogenase ausgewählt ist unter NADH-regenerierenden Enzymen, wie NADH Dehydrogenasen, Alkoholdehydrogenasen (ADH), und NADH regenerierenden Formiatdehydrogenasen (FDH), sowie Glucosedehydrogenase (GDH)-, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH), oder Phosphit-Dehydrogenasen (PtDH), oder sowie NADH regenerierenden Glucosedehydrogenasen (GDH).

20. Rekombinanter Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 16 bis 19 welcher ein 7α -HSDH knock-out Stamm ist.

21. Verfahren zur Herstellung von Ursodesoxycholsäure (UDCS) der Formel (1)



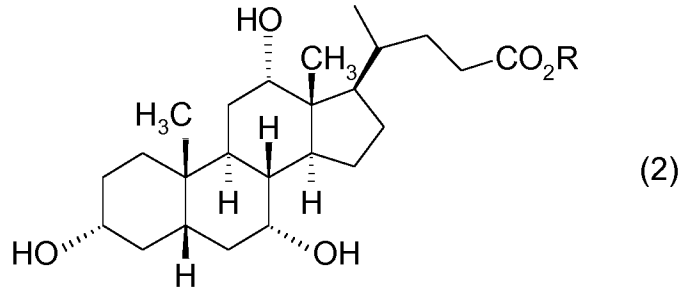
worin

R für Alkyl, H, ein Alkalimetallion oder $N(R^3)_4^+$ steht, worin die Reste R^3 gleich oder verschieden sind und für H oder Alkyl stehen, oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, ersetzt ist, worin R^1 und R^2 unabhängig voneinander für einen Alkylrest stehen;

wobei man

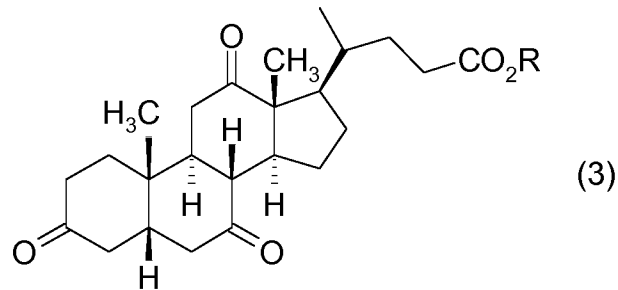
a) gegebenenfalls eine Cholsäure (CS) der Formel (2)

85



worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wie oben definiert ersetzt ist,

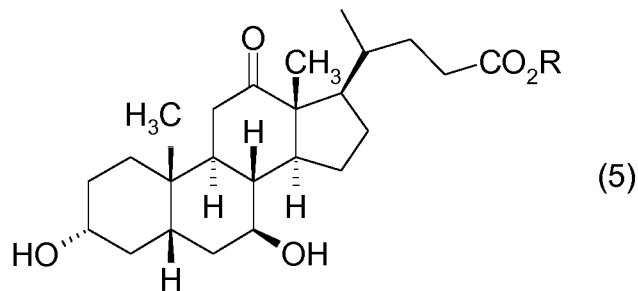
5 zur Dehydrocholsäure (DHCS) der Formel (3)



worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wie oben definiert ersetzt ist, insbesondere chemisch, oxidiert;

10

b) DHCS in Gegenwart wenigstens einer 7β -HSDH-Mutante gemäß der Definition in einem der Ansprüche 10 bis 13 und in Gegenwart wenigstens einer 3α -HSDH zur korrespondierenden 12-Keto-ursodesoxycholsäure (12-Keto UDCS) der Formel (5)



15

worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wie oben definiert ersetzt ist, insbesondere in Gegenwart und unter Verbrauch von NADH und /oder NADPH

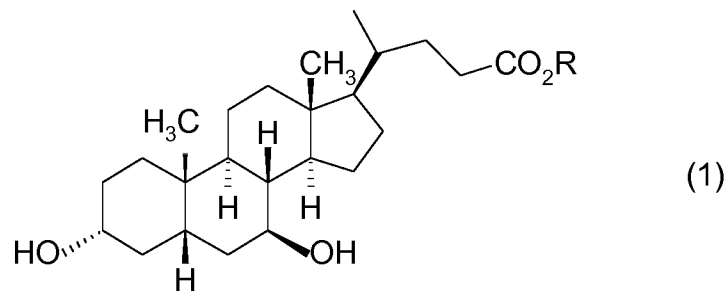
20 reduziert und anschließend

c) 12-Keto-UDCS der Formel (5) chemisch zu UDCS reduziert; und

d) das Reaktionsprodukt gegebenenfalls weiter aufreingt.

5

22. Verfahren zur Herstellung von UDCS der Formel (1)



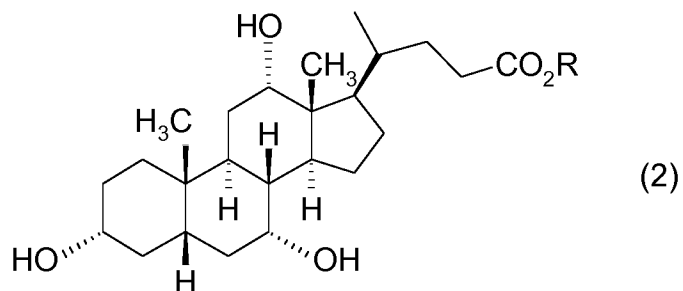
worin

10 R für Alkyl, NR^1R^2 , H, ein Alkalimetallion oder $\text{N}(\text{R}^3)_4^+$ steht, worin die Reste R^3 gleich oder verschieden sind und für H oder Alkyl stehen oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wie oben definiert ersetzt ist

wobei man

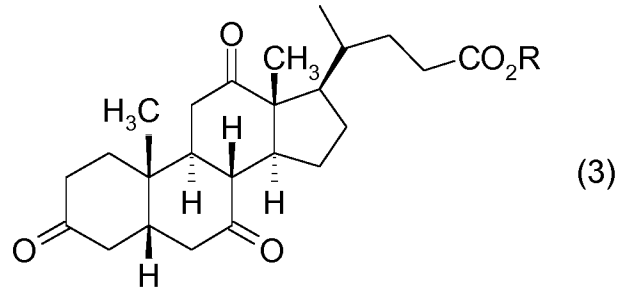
15

a) gegebenenfalls eine CS der Formel (2)



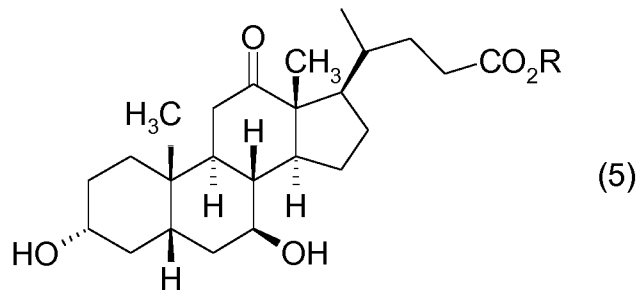
20 worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe $-\text{CO}_2\text{R}$ durch die Säureamid-Gruppe $-\text{CONR}^1\text{R}^2$, wie oben definiert ersetzt ist, zur DHCS der Formel (3)

87



worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe –CO₂R durch die Säureamid-Gruppe -CONR¹R² wie oben definiert ersetzt ist, insbesondere chemisch oxidiert;

- 5 b) DHCS in Gegenwart wenigstens einer 7β-HSDH und in Gegenwart wenigstens einer 3α-HSDH zur korrespondierenden 12-Keto UDCS der Formel (5)



- 10 worin R die oben angegebenen Bedeutungen besitzt, oder die Gruppe –CO₂R durch die Säureamid-Gruppe -CONR¹R² wie oben definiert ersetzt ist, insbesondere in Gegenwart und unter Verbrauch von NADH und/oder NADPH, reduziert und anschließend

c) 12-Keto-UDCS der Formel (5) chemisch zu UDCS reduziert; und

- 15 d) das Reaktionsprodukt gegebenenfalls weiter aufreingt;

wobei die Umsetzungen des Schritts b) in Gegenwart eines rekombinanten Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 17 bis 20 erfolgen.

7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens*

Accession: ZP_01773061

```
1  mnlrekygew glilgategv gkafcekaa ggmnvvmvgr reeklnvlag eiretygvvet
61 kvvradfsqp gaaetvfaat egldmgfmsy vaclhsfgki qdtpwekhea minvnnvtfl
121 kcfhhymrif aaqdrgevav vssmtgiss pwnqyqgagk afilkmteav acecegtgvd
181 vevitlgttl tpsllsnlpg gpqgeavmki altpeecvde afeklgkels viagqrnkds
241 vhdwkanhte deyirymsf yrd
```

Fig. 1a**Nukleinsäuresequenz codierend für 7 β -HSDH aus *Collinsella aerofaciens***

Accession NO: NZ_AAVN02000010, Region: 52005..52796

```
1  atgaacctga gggagaagta cggtagtggt ggctgatcc tgggcgcgac cgagggcgctc
61  ggcaaggcgt tctgcgagaa gatcgccgcc ggcgcatga acgctcgcat ggtcggccgt
121 cgcgaggaga agctgaacgt gctcgcaggc gagatccgcg agacctacgg cgtggagacc
181 aaggctcgtc gcgccgactt tagccagccc ggcgctgcc agaccgtctt cgccgcgacc
241 gagggcctgg acatgggctt catgagctac gtggcctgcc tgcacagctt cggtaagatc
301 caggacaccc cctgggagaa gcacgaggcc atgatcaacg tcaacgctcg gaccttcctc
361 aagtgcttcc accactacat gcggatcttt gccgccagc accgcggcgc cgtgatcaac
421 gtctcgtcga tgaccggcat cagctccagc cctggaacg gccagtacgg cgcgggcaag
481 gccttcatcc tcaagatgac cgaggccgtg gcctgcgagt gcgagggcac cggcgtcgac
541 gtcgaggtca tcaccctcgg caccacccta acccccagcc tgctgtccaa cctccccggc
601 ggccccgagg gcgaggccgt catgaagatc gccctcacc cggaggagtg cgttgacgag
661 gcctttgaga agctgggtaa ggagctctcc gtcacgccg gccagcgcaa caaggactcc
721 gtccacgact ggaaggcaaa ccacaccgag gacgagtaca tccgctacat ggggtcgttc
781 taccgcgact ag
```

Fig.1b

3 α -HSDH

Quelle: *Comamonas testosteroni* ATCC 11996

```
1 msiivisgca tgigaatrkv leaaghqivg idirdaevia dlstaegrkq aiadvlakcs
61 kgmdgglvlca glgpqtkvlq nvsvnyfqa telmdaflpa lkkghqpaav vissvasahl
121 afdknplala leageeakar aivehagegg gnlayagskn altvavrkra aawgeagvrl
181 ntiapgatet pllqagldp rygesiakfv ppmgrraeps emasviaflm spaasyvhga
241 qividggida vmrptqf
```

Fig.1c

Nukleinsäuresequenz codierend für 3 α -HSDH

Quelle: *Comamonas testosteroni* ATCC 11996

Accession: AF092031, Region: 158..931

```
1 atgtccatca tcgtgataag cggctgcgcc accggcattg gtgctggctac gcgcaaggtc
61 ctggaggcgg ccggtcacca gatcgtaggc atcgatatac gcgatgcgga agtgattgcc
121 gatctctcga cggccgaagg tcgaaagcag gcgattgccg atgtactggc gaagtgcagc
181 aagggcatgg acggcctggt gctgtgcgcc ggctgggac cgcagaccaa ggtgcttggc
241 aatgtggttt cggcaatta ttttggcgcg accgagctga tggatgcctt tttgccagcg
301 ctgaaaaaag gccatcagcc cgcagccgtc gtcactcctg ccgtggcttc cgcgcatctg
361 gcttttgaca agaaccact ggctgtggca ctggaagccg gcgaggaagc caaggcccg
421 gccattgtcg aacatgcggg agagcagggc ggaaatctgg cctatgcggg cagcaagaat
481 gctttgacgg tggctgtgcg caaacgcgcc gccgcctggg gcgaggctgg cgtgcgcctg
541 aacaccatcg cccccggtgc aaccgagact cccttgcctg aggcgggctc gcaggaccgc
601 cgctatggcg aatccattgc caagtctgtt cctcccatgg gccgccgtgc cgagccgtcc
661 gagatggcgt cggatcatcg cttttgatg agcccggccg caagctatgt gcatggcgcg
721 cagatcgtca ttgatggcgg cattgatgcg gtgatgcgcc cgacacagtt ctga
```

Fig.1d

Wildtyp:

MNLREKYGEWGLILGATEGVVKAFCEKIAAGGMNVVMVGRREEKLNVLAGEIR
ETYGVETKVVVRADFSQPGAAETVFAATEGLDMGFMSYVACLHSFGKIQDTPWE
KHEAMINNVNVVTFLLKCFHHYMRIFAAQDRGAVINVSSMTGISSSPWNGQYGAG
KAFILKMTEAVACECEGTGVDVEVITLGTTLTPSLLSNLPGGPQGEAVMKIAL
TPEECVDEAFEKLGKELSUIAGQRNKDSVHDWKANHTEDEYIRYMGSFYRD*

G39D:

MNLREKYGEWGLILGATEGVVKAFCEKIAAGGMNVVMVDRREEKLNVLAGEIR
ETYGVETKVVVRADFSQPGAAETVFAATEGLDMGFMSYVACLHSFGKIQDTPWE
KHEAMINNVNVVTFLLKCFHHYMRIFAAQDRGAVINVSSMTGISSSPWNGQYGAG
KAFILKMTEAVACECEGTGVDVEVITLGTTLTPSLLSNLPGGPQGEAVMKIAL
TPEECVDEAFEKLGKELSUIAGQRNKDSVHDWKANHTEDEYIRYMGSFYRD*

G39D R40F:

MNLREKYGEWGLILGATEGVVKAFCEKIAAGGMNVVMVDFREEKLNVLAGEIR
ETYGVETKVVVRADFSQPGAAETVFAATEGLDMGFMSYVACLHSFGKIQDTPWE
KHEAMINNVNVVTFLLKCFHHYMRIFAAQDRGAVINVSSMTGISSSPWNGQYGAG
KAFILKMTEAVACECEGTGVDVEVITLGTTLTPSLLSNLPGGPQGEAVMKIAL
TPEECVDEAFEKLGKELSUIAGQRNKDSVHDWKANHTEDEYIRYMGSFYRD*

G39D R40F R41K:

MNLREKYGEWGLILGATEGVVKAFCEKIAAGGMNVVMVDFKEEKLNVLAGEIR
ETYGVETKVVVRADFSQPGAAETVFAATEGLDMGFMSYVACLHSFGKIQDTPWE
KHEAMINNVNVVTFLLKCFHHYMRIFAAQDRGAVINVSSMTGISSSPWNGQYGAG
KAFILKMTEAVACECEGTGVDVEVITLGTTLTPSLLSNLPGGPQGEAVMKIAL
TPEECVDEAFEKLGKELSUIAGQRNKDSVHDWKANHTEDEYIRYMGSFYRD*

G39D R40F R41K K44G:

MNLREKYGEWGLILGATEGVVKAFCEKIAAGGMNVVMVDFKEEGLNVLAGEIR
ETYGVETKVVVRADFSQPGAAETVFAATEGLDMGFMSYVACLHSFGKIQDTPWE
KHEAMINNVNVVTFLLKCFHHYMRIFAAQDRGAVINVSSMTGISSSPWNGQYGAG
KAFILKMTEAVACECEGTGVDVEVITLGTTLTPSLLSNLPGGPQGEAVMKIAL
TPEECVDEAFEKLGKELSUIAGQRNKDSVHDWKANHTEDEYIRYMGSFYRD*

Fig.1e

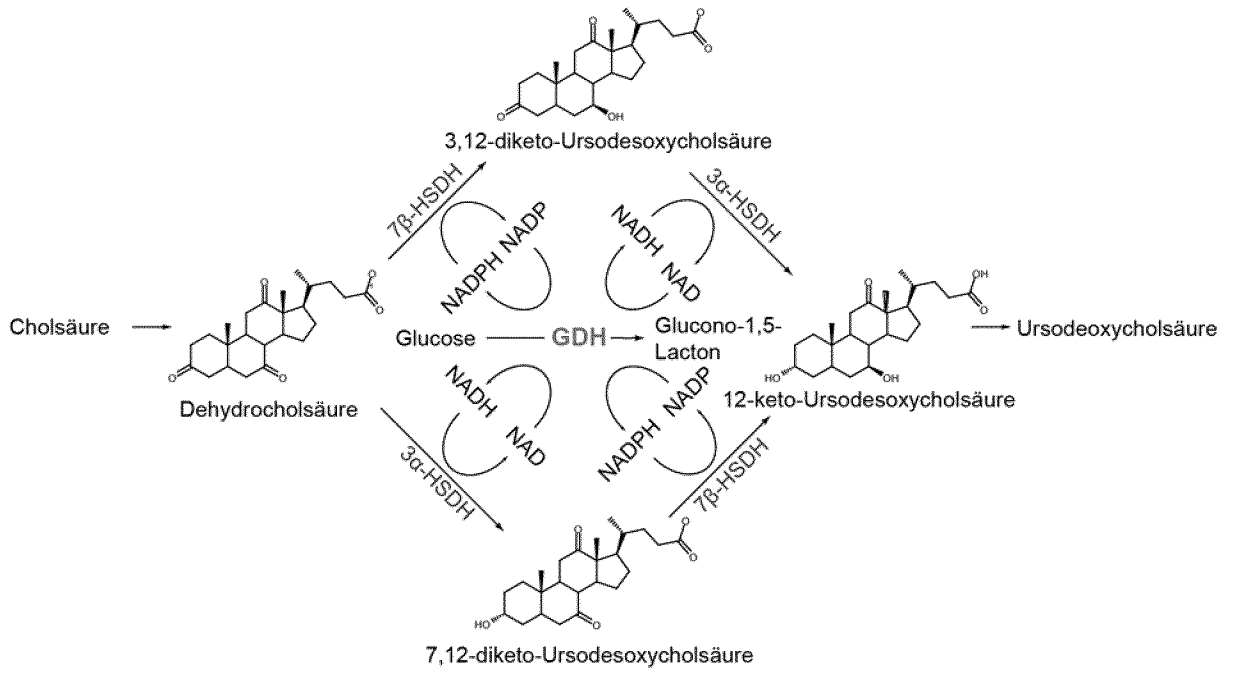


Fig. 2

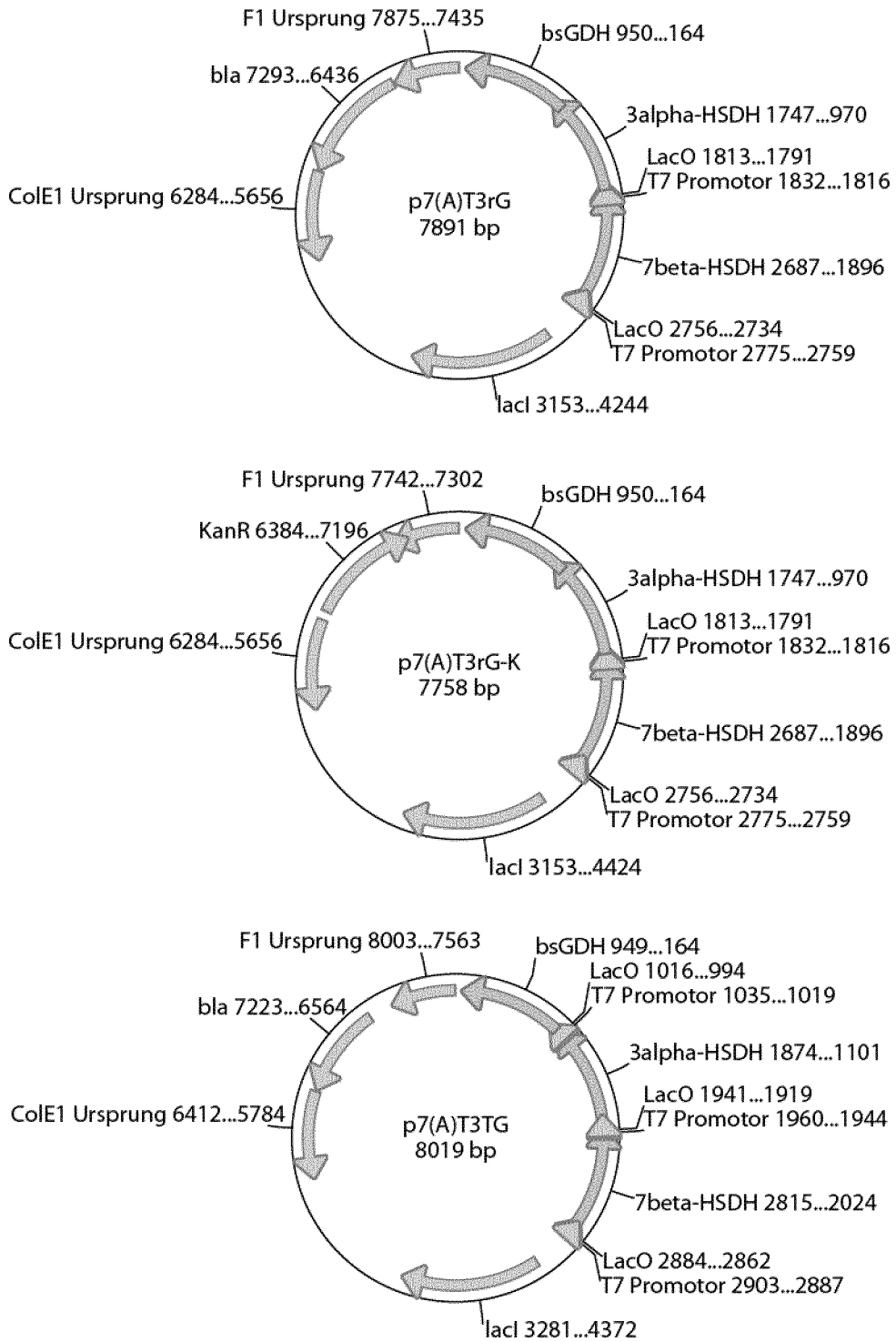


Fig.3

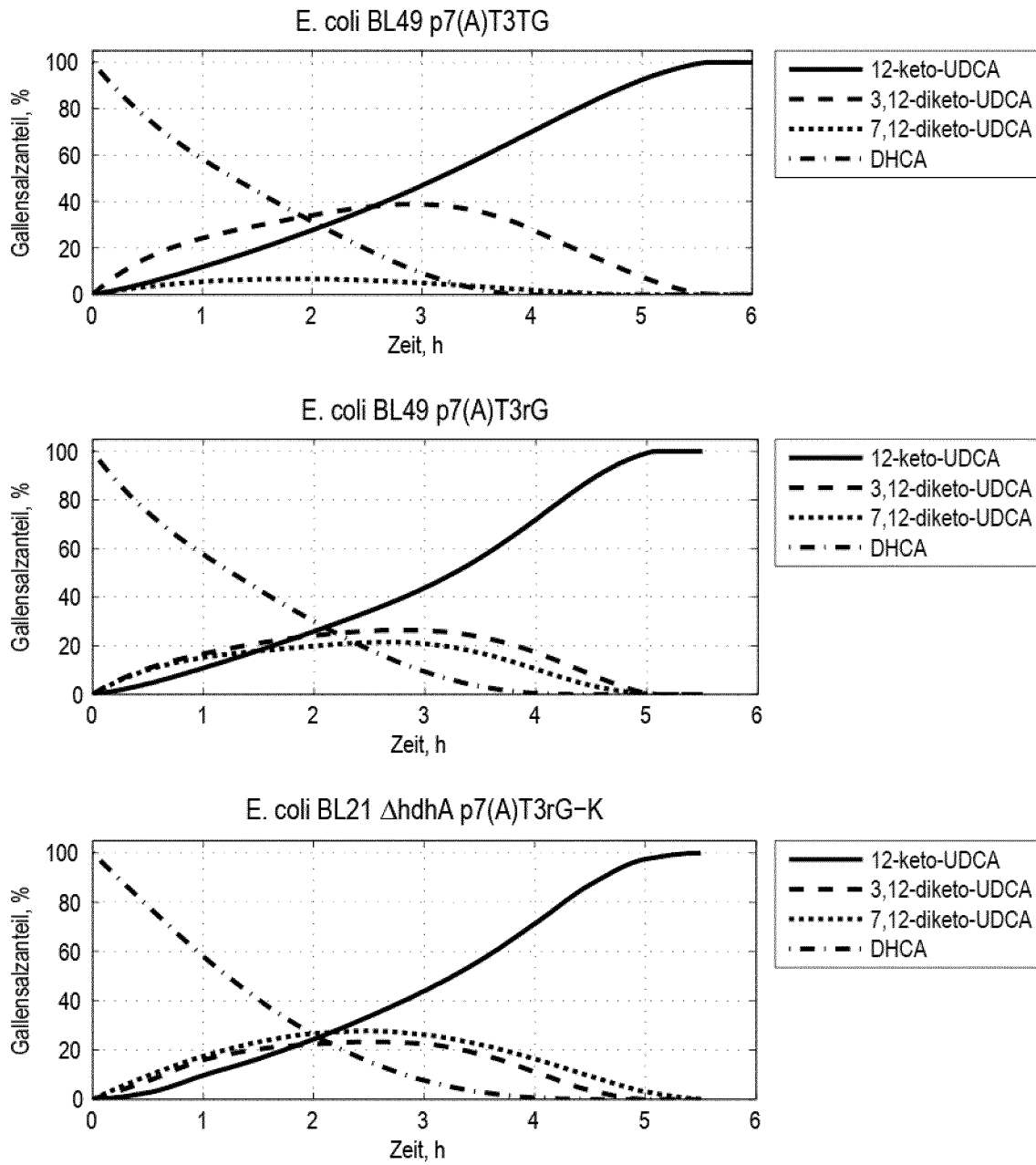


Fig. 4

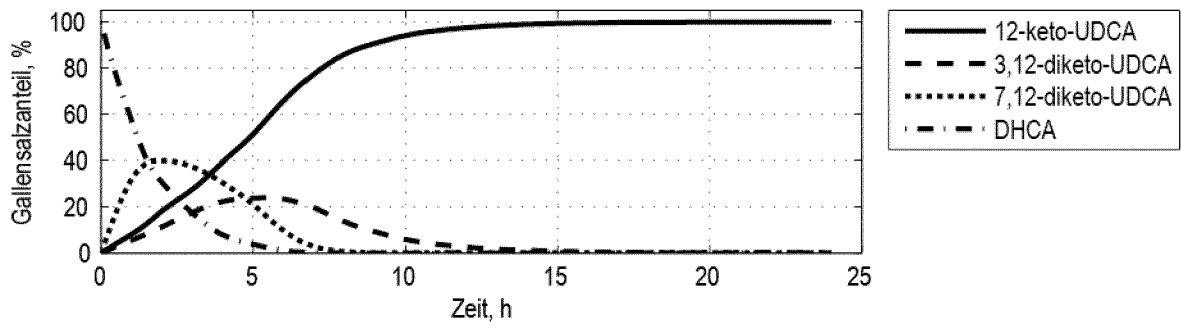


Fig. 5

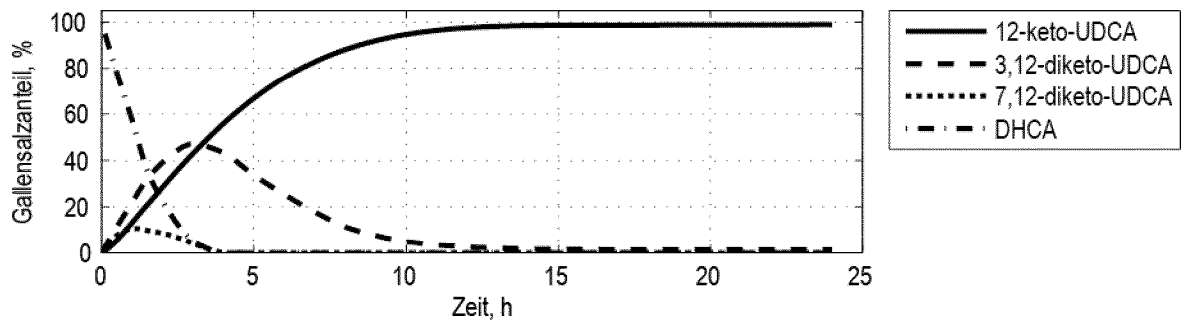


Fig. 6

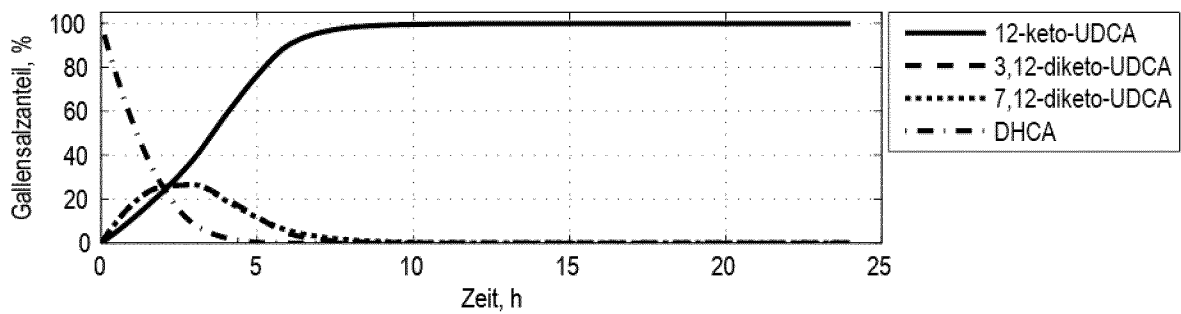


Fig. 7

7beta-HSDH wildtyp	MNLREKYGEW	GLILGATEGV	GKAFCEKIAA	GGMNVVMVGR	REEKLNVLG
7beta-HSDH G39D	MNLREKYGEW	GLILGATEGV	GKAFCEKIAA	GGMNVVMVDR	REEKLNVLG
7beta-HSDH G39D R40I	MNLREKYGEW	GLILGATEGV	GKAFCEKIAA	GGMNVVMVDI	REEKLNVLG
7beta-HSDH DF	MNLREKYGEW	GLILGATEGV	GKAFCEKIAA	GGMNVVMVDF	REEKLNVLG
7beta-HSDH DFK	MNLREKYGEW	GLILGATEGV	GKAFCEKIAA	GGMNVVMVDF	KEEKLNVLG
7beta-HSDH DFKG	MNLREKYGEW	GLILGATEGV	GKAFCEKIAA	GGMNVVMVDF	KEEGLNVLG
7beta-HSDH wildtyp	EIRETYGVET	KVVRADFSQP	GAAETVFAAT	EGLDMGFMSY	VACLHSFGKI
7beta-HSDH G39D	EIRETYGVET	KVVRADFSQP	GAAETVFAAT	EGLDMGFMSY	VACLHSFGKI
7beta-HSDH G39D R40I	EIRETYGVET	KVVRADFSQP	GAAETVFAAT	EGLDMGFMSY	VACLHSFGKI
7beta-HSDH DF	EIRETYGVET	KVVRADFSQP	GAAETVFAAT	EGLDMGFMSY	VACLHSFGKI
7beta-HSDH DFK	EIRETYGVET	KVVRADFSQP	GAAETVFAAT	EGLDMGFMSY	VACLHSFGKI
7beta-HSDH DFKG	EIRETYGVET	KVVRADFSQP	GAAETVFAAT	EGLDMGFMSY	VACLHSFGKI
7beta-HSDH wildtyp	QDTPWEKHEA	MINVNVVTF	KCFHHYMRIF	AAQDRGAVIN	VSSMTGISS
7beta-HSDH G39D	QDTPWEKHEA	MINVNVVTF	KCFHHYMRIF	AAQDRGAVIN	VSSMTGISS
7beta-HSDH G39D R40I	QDTPWEKHEA	MINVNVVTF	KCFHHYMRIF	AAQDRGAVIN	VSSMTGISS
7beta-HSDH DF	QDTPWEKHEA	MINVNVVTF	KCFHHYMRIF	AAQDRGAVIN	VSSMTGISS
7beta-HSDH DFK	QDTPWEKHEA	MINVNVVTF	KCFHHYMRIF	AAQDRGAVIN	VSSMTGISS
7beta-HSDH DFKG	QDTPWEKHEA	MINVNVVTF	KCFHHYMRIF	AAQDRGAVIN	VSSMTGISS
7beta-HSDH wildtyp	PWNGQYGAGK	AFILKMTEAV	ACECEGTGVD	VEVITLGTTL	TPSLLSNLPG
7beta-HSDH G39D	PWNGQYGAGK	AFILKMTEAV	ACECEGTGVD	VEVITLGTTL	TPSLLSNLPG
7beta-HSDH G39D R40I	PWNGQYGAGK	AFILKMTEAV	ACECEGTGVD	VEVITLGTTL	TPSLLSNLPG
7beta-HSDH DF	PWNGQYGAGK	AFILKMTEAV	ACECEGTGVD	VEVITLGTTL	TPSLLSNLPG
7beta-HSDH DFK	PWNGQYGAGK	AFILKMTEAV	ACECEGTGVD	VEVITLGTTL	TPSLLSNLPG
7beta-HSDH DFKG	PWNGQYGAGK	AFILKMTEAV	ACECEGTGVD	VEVITLGTTL	TPSLLSNLPG
7beta-HSDH wildtyp	GPQGEAVMKI	ALTPEECVDE	AFEKLGKELS	VIAGQRNKDS	VHDWKANHTE
7beta-HSDH G39D	GPQGEAVMKI	ALTPEECVDE	AFEKLGKELS	VIAGQRNKDS	VHDWKANHTE
7beta-HSDH G39D R40I	GPQGEAVMKI	ALTPEECVDE	AFEKLGKELS	VIAGQRNKDS	VHDWKANHTE
7beta-HSDH DF	GPQGEAVMKI	ALTPEECVDE	AFEKLGKELS	VIAGQRNKDS	VHDWKANHTE
7beta-HSDH DFK	GPQGEAVMKI	ALTPEECVDE	AFEKLGKELS	VIAGQRNKDS	VHDWKANHTE
7beta-HSDH DFKG	GPQGEAVMKI	ALTPEECVDE	AFEKLGKELS	VIAGQRNKDS	VHDWKANHTE
7beta-HSDH wildtyp	DEYIRYMGSF	YRD			
7beta-HSDH G39D	DEYIRYMGSF	YRD			
7beta-HSDH G39D R40I	DEYIRYMGSF	YRD			
7beta-HSDH DF	DEYIRYMGSF	YRD			
7beta-HSDH DFK	DEYIRYMGSF	YRD			
7beta-HSDH DFKG	DEYIRYMGSF	YRD			

Fig. 8

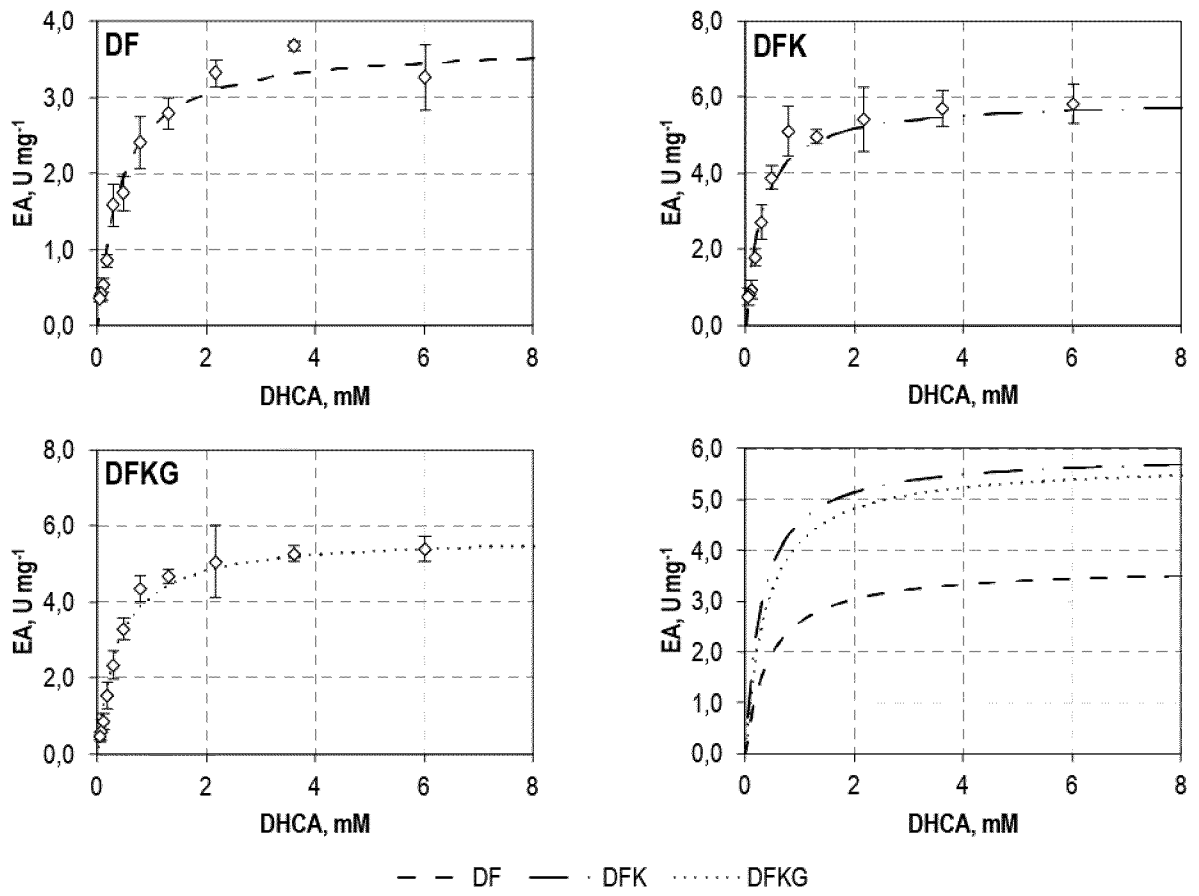


Fig. 9

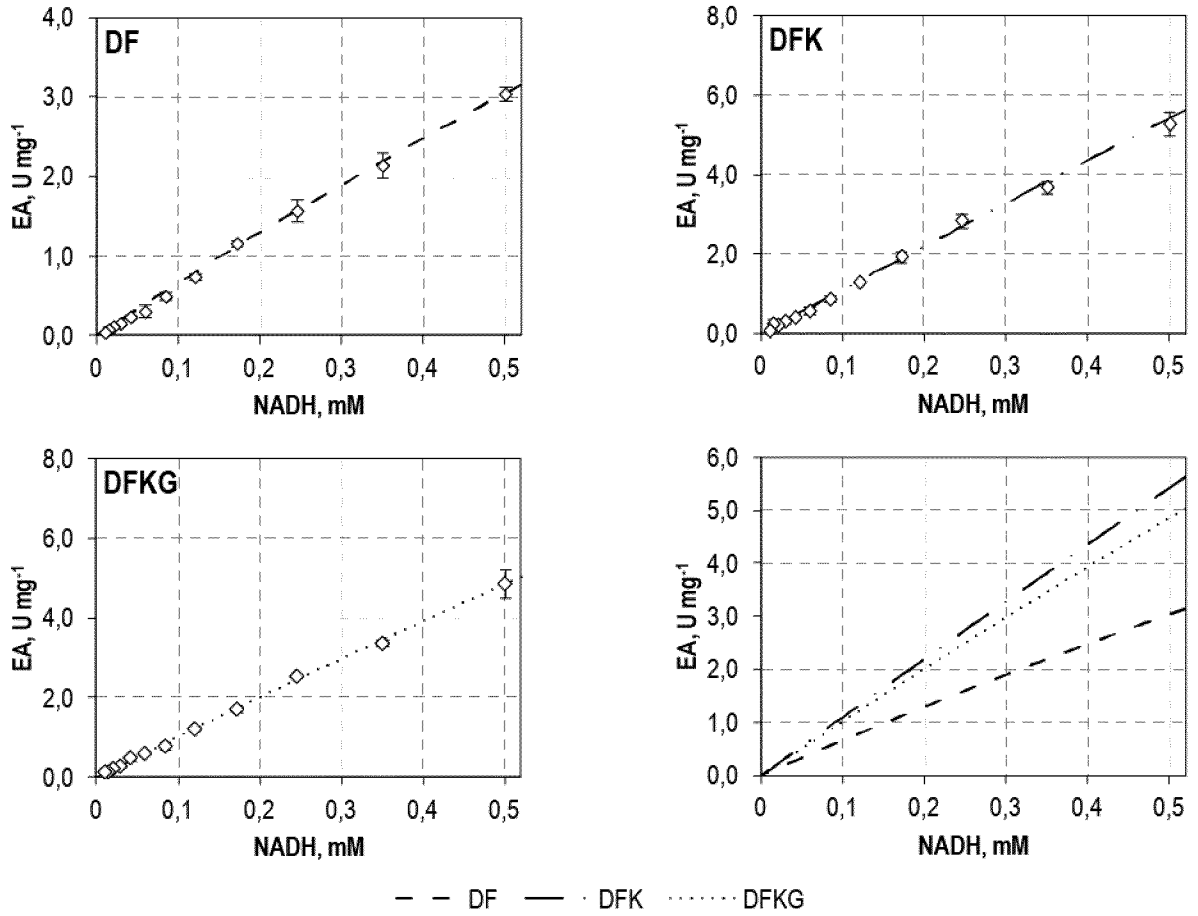


Fig. 10

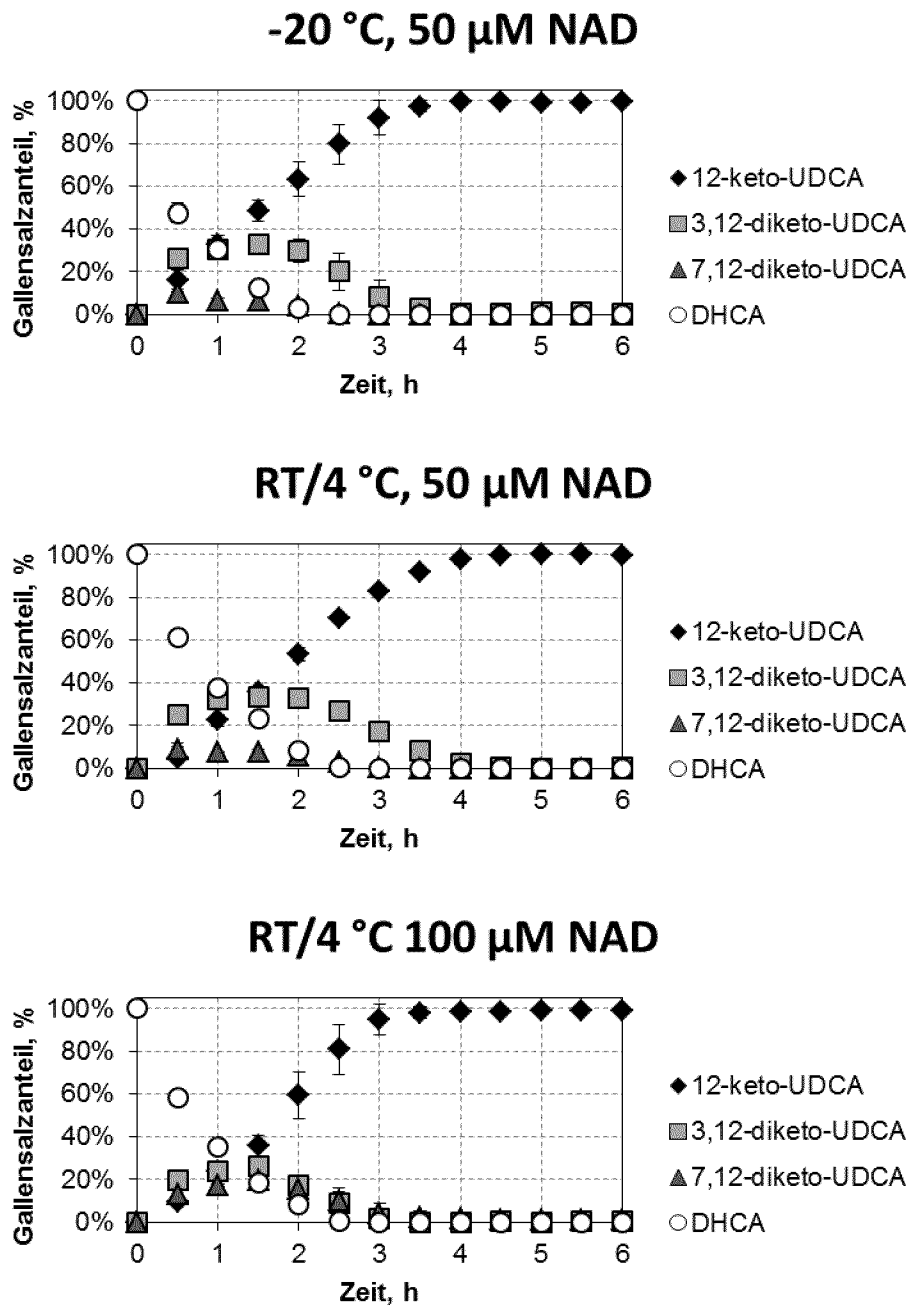


Fig. 11

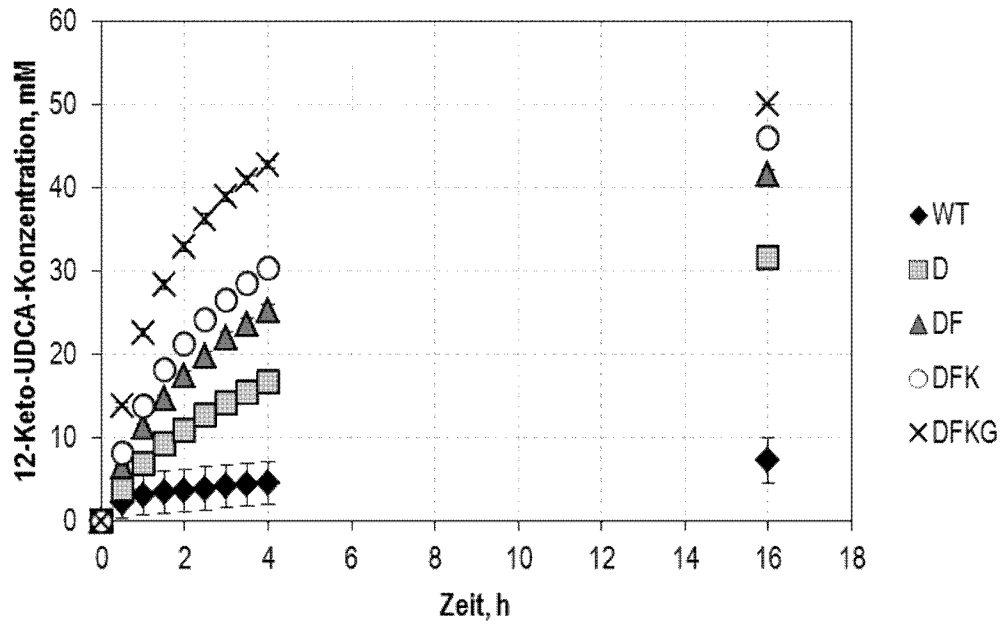


Fig. 12

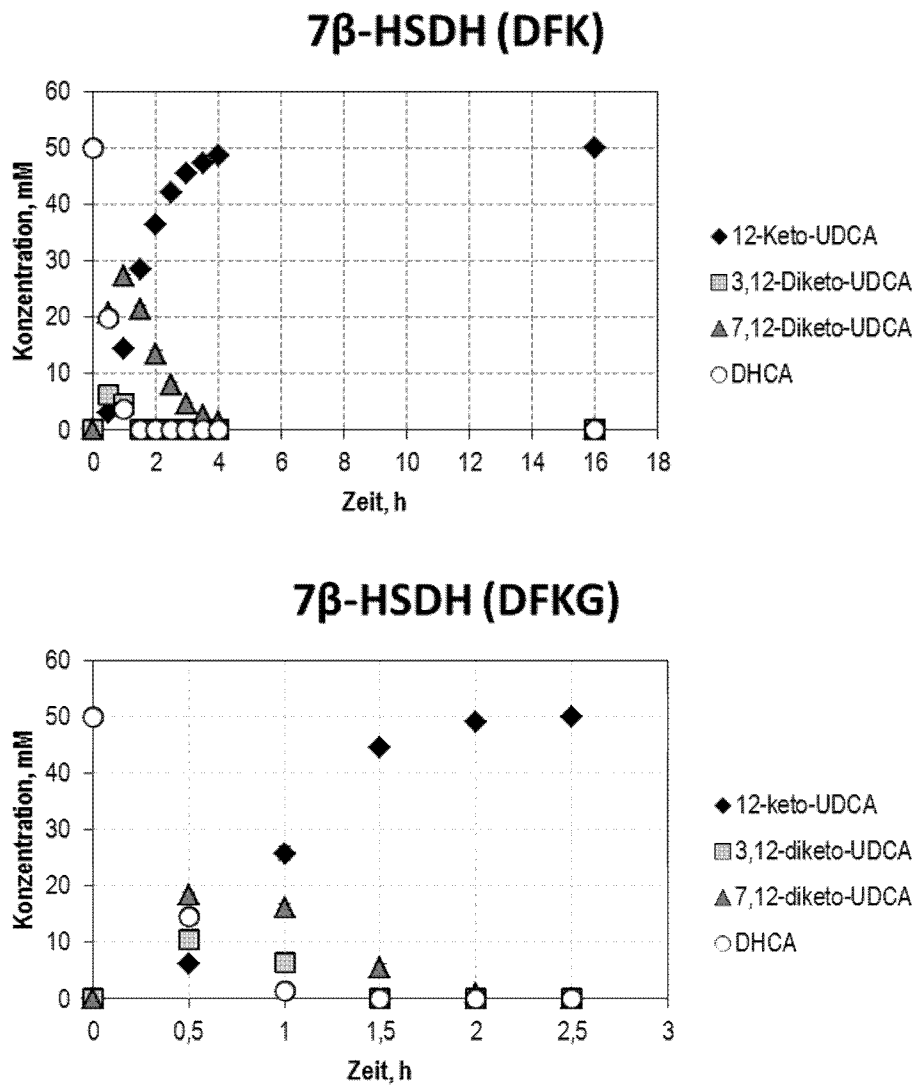


Fig. 13