

**Bindungseigenschaften der
17 β -Hydroxysteroiddehydrogenasen 1 und 2**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von
Christina Fischer
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2007
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Volker Dötsch, Prof. Dr. Heinrich Rüterjans

Datum der Disputation: 19.10.2007

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Volker Dötsch und Herrn Prof. Dr. Heinz Rüterjans möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, die vorliegende Arbeit in ihren Arbeitsgruppen durchführen zu dürfen. Weiterhin danke ich für ihre besondere Unterstützung und die ausgesprochen gute Arbeitsatmosphäre.

Herrn PD. Dr. Ulrich Günther danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, seine Unterstützung, für die Anregungen, die er mir gab, und für die Einblicke in die NMR-Spektroskopie.

Der Firma Solvay Pharmaceuticals in Hannover danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit im Rahmen eines Kooperationsprojektes.

Mein Dank gilt den Kollegen der Arbeitsgruppen Dötsch/Rüterjans für die schöne gemeinsame Zeit, für angeregte Diskussionen, ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre. Im Besonderen möchte ich Herrn Dr. Frank Löhr für die Überwindung einiger Hürden bezüglich der NMR-Messungen danken, ebenso Dr. Frank Bernhard für neue Impulse bei molekularbiologischen und proteinbiochemischen Fragestellungen.

Meinen Kollegen Tanja Mittag, Alexander Koglin, Wesley McGinn-Straub, Florian Durst, Christian Klammt und Marc-Michael Blum danke ich für gute Gespräche, viele heitere Momente, schlechte Musik und nicht zuletzt für ihre Freundschaft, die über den Laboralltag hinausging.

Bei Nils Hanekop, Matthias Hofacker, Peter Lamken, Susanne Schrodtt und Katharina Strube möchte ich mich für die gemeinsame Studien- und Promotionszeit und die daraus hervorgegangenen Freundschaften ganz herzlich bedanken.

Bei meinen Eltern und meiner ganzen Familie bedanke ich mich für die immerwährende Unterstützung während des Studiums und der Promotion im Besonderen für die regelmäßige und liebevolle Betreuung meiner Tochter Elena, um mir genug Freiraum zu verschaffen, die vorliegende Arbeit fertig zu stellen.

Mein innigster Dank gilt meinem Mann Daniel, der mich durch seine Liebe fortwährend unterstützt, stets so wundervoll auf mich eingeht und durch den ich immer wieder neue Kraft für diese Arbeit gewinnen konnte.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen	1
1.2	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ1	7
1.2.1	Struktur	7
1.2.2	Katalytischer Mechanismus	12
1.3	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen Typ2	15
1.3.1	Inhibitoren	17
1.4	Beteiligung der 17 β -HSD 1 und 2 an der Pathogenese verschiedener Krankheiten	18
1.4.1	Brustkrebs	18
1.4.2	Prostatakrebs	19
1.4.3	Dickdarmkrebs	19
1.5	NMR-Spektroskopie im pharmazeutischen Screening	21
1.6	Zielsetzung	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Material	26
2.2	Methoden	37
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	37
2.2.2	Konstruktion der Expressionsplasmide	41
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	44
2.2.4	NMR-Methoden	59
2.2.5	Docking	62
3	Ergebnisse und Diskussion	64
3.1	Expression, Aufreinigung und Kinetik	64
3.1.1	Fusion mit Löslichkeitsvermittlern	65
3.1.2	C-terminale Deletion	70
3.1.3	in vitro-Expression	72
3.1.4	Kinetische Messungen	74
3.1.5	Schlussfolgerungen	76
3.2	Ligandenbindung	80
3.2.1	Steroide und Steroid-Derivate	82
3.2.2	Phytoestrogene	92

3.2.3	Nicht-steroidale synthetische Liganden	98
3.2.4	Cosubstrat NAD(P) ⁺	102
3.2.5	Kompetitionsexperimente	103
3.2.6	Schlussfolgerungen	105
4	Zusammenfassung	111
5	Anhang	113
5.1	Pulsprogramme	116
5.2	Chemische Verschiebungen der Liganden	117
5.2.1	Steroidale Liganden	117
5.2.2	Phytoestrogene	119
5.2.3	Nicht-steroidale Liganden	120
5.3	Abkürzungen	121
6	Literaturverzeichnis	123

1 Einleitung

Bereits im Jahre 1935 wies der französische Professor Antoine Lacassagne vom Pariser Institute du Radium bei der jährlichen Tagung der American Association of Cancer Research auf die Möglichkeit hin, die Entstehung und Entwicklung von Brustkrebs durch eine gezielte Blockade der Estrogen-Wirkung zu verhindern (Lacassagne, 1936). Seither ist die Beeinflussung der Hormonsituation und -wirkung ins Augenmerk der Brustkrebsforschung gerückt. 17β -Estradiol spielt bei der Entstehung und Entwicklung von Brustkrebs eine entscheidende Rolle (Reed, 1991; Reed *et al.*, 1991; Thomas, 1984). Mit Tamoxifen kam das erste Antiestrogen zur Behandlung von Brustkrebs auf den Markt, das als Estrogenrezeptorantagonist die Wirkung von 17β -Estradiol unterbindet (Jordan, 1988).

Die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ1 gehört zur Familie der 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen und katalysiert die reversible Umsetzung von 17β -Estron zu dem biologisch aktiven 17β -Estradiol (Luu-The *et al.*, 1995). Somit stellt die spezifische Hemmung dieses Enzyms einen höchst interessanten Ansatz für die Krebstherapie dar. Ein möglicher Inhibitor sollte dabei allerdings nicht als Agonist auf den Estradiolrezeptor wirken und auch die Funktion der 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 nicht beeinträchtigen.

Kenntnisse über die räumliche Struktur des Enzym-Substrat-Komplexes (bzw. des Enzym-Inhibitor-Komplexes) erlauben eine Charakterisierung und Klassifikation der vorhandenen Inhibitoren und ermöglichen aufgrund der Bestimmung bindender Gruppen eine gezielte Verbesserung dieser Inhibitoren.

1.1 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen

Weibliche und männliche Geschlechtshormone, Estrogene und Androgene, sind essentiell für die Fortpflanzung. Ihnen kommt außerdem eine große Bedeutung bei allgemeinen Stoffwechselprozessen in einer Vielzahl peripherer Gewebe zu. Desweiteren spielen sie in der Entwicklung von hormonabhängigem Krebs wie z.B. Brust- oder Prostata-Krebs eine entscheidene Rolle (Vihko *et al.*, 2002; Vihko *et al.*, 2004).

Bei Frauen im gebärfähigen Alter stellen die Ovarien die Hauptquelle für Estradiol, dem wirksamsten weiblichen Geschlechtshormon, dar. Nach den Wechseljahren verlagert sich die

Tabelle 1.1: Übersicht über die Eigenschaften der bisher bekannten humanen 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (Adamski und Jakob, 2001; Mindnich et al., 2004; Peltoketo et al., 1999)

E2: Estradiol, T: Testosteron, DHT: Dehydrotestosteron, P: Progesteron

17 β -HSD Typ	zelluläre Lokalisation	Gewebe-verteilung	Aktivität <i>in vivo</i>	Substrat-spezifität	Cofaktor	Funktion	Krankheit oder Beteiligung an der Pathologie	Referenz
1	Cytosol	Ovarien, Plazenta, Brust	Reduktase	Estrogene	NADPH	E2-Produktion	Brust- und Prostata-Krebs	(Luu The et al., 1989; Luu-
2	Microsomen	Placenta, Leber, Gastrointestinaltrakt, Niere, Uterus, Brust, Prostata	Dehydrogenase	Estrogene, Androgene	NAD ⁺	E2-, T-Inaktivierung, P-Produktion	Endometriose, Dickdarm- und Prostata-Krebs	(Labrie et al., 1995; Wu et al., 1993)
3	Microsomen	Hoden	Reduktase	Estrogene, Androgene	NADPH	T-Produktion	Androgynie	(Geissler et al., 1993)
4	Peroxisomal	weiträumig verteilt	Dehydrogenase	L3-Hydroxyacyl-CoA, Estrogene	NAD ⁺	β -Oxidation von Fettsäuren, E2-Inaktivierung, Androgen-Metabolismus	Stiff-man – Syndrom	(Adamski et al., 1995; Leenders
5	Cytosol	Leber, Niere, Hoden, Prostata, Nebenniere, Knochen	Reduktase	Sterioide, Gallensäure, Xenobiotica	NADPH	T-Produktion, Gallensäure-Produktion, Detoxifikation, DHT-Inaktivierung	unbekannt	(El-Alfy et al., 1999)
6	bisher nur in der Ratte gefunden							
7	endoplasmatisches Retikulum	Ovarien, Brust, Placenta, Hoden, Prostata, Leber/DHT	Reduktase	Estrogene, Androgene		E2-Produktion, DHT-Inaktivierung, Cholesterin Synthese	unbekannt	(Krazeisen et al., 1999)
8	unbekannt	Leber, Pankreas, Niere, Skelettmuskeln	Dehydrogenase	Estrogene, Androgene	NADH	Estrogen-/ Androgen-Inaktivierung	unbekannt	(Ando et al., 1996)
9	bisher nur in der Maus gefunden							(Su et al., 1999)
10	Mitochondrien, Microsomen	Gehirn	Oxidation	Estrogene, Androgene	NAD ⁺	Estrogen-/ Androgen-Inaktivierung, β -Oxidation von Fettsäuren, Gallensäure-Isomerisierung	Alzheimer-Krankheit,	(He et al., 1999; He et al., 2002)
11	unbekannt	Pankreas, Lunge, Niere, Leber, Nebennierenrinde, Ovarien, Endometrium, Leydig-Zellen, Gehirn	unbekannt	unbekannt	unbekannt	Estrogen-/ Androgen-Inaktivierung	unbekannt	(Brereton et al., 2001; Chai et al., 2002)
12	Microsomen	unbekannt	Reduktase	3-Ketoacyl-CoA	NADPH	3-Ketoacyl-CoA Reduktase, Fettsäuresynthese	unbekannt	(Moon und Horton, 2003)

Estrogen-Biosynthese in die peripheren Gewebe wobei Estrogene aus Vorläufer-Steroiden der Nebenniere entstehen (Labrie, 1991). Auch bei Männern entsteht eine erhebliche Menge der im Körper gebildeten Androgene in peripheren Geweben (Labrie *et al.*, 1997). Testosteron zirkuliert im Körper, wohingegen Dihydrotestosteron das wirksamste Androgen in der Prostata zu sein scheint.

Eine Enzymgruppe, die die Verfügbarkeit von biologisch aktiven Estrogenen und Androgenen beeinflusst, ist die Familie der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (Moghrabi und Andersson, 1998).

Es handelt sich dabei um NAD(H)⁺-/NADP(H)-abhängige Enzyme, die die Oxidation und Reduktion von 17 β -Hydroxy- bzw. 17 β -Ketosteroiden katalysieren. Sowohl Estrogene als auch Androgene weisen in der Hydroxy-Form die höchste Affinität zum jeweiligen Rezeptor auf, folglich sind 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen an der Regulation der biologischen Aktivität von Sexualhormonen maßgeblich beteiligt. Seit der 50er Jahre wurde eine Reihe von 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen aus verschiedenen Geweben und Spezies gereinigt (Blomquist, 1995; Bogovich und Payne, 1980; Inano und Tamaoki, 1986; Langer und Engel, 1958; Martel *et al.*, 1992; Milewich *et al.*, 1985; Murdock *et al.*, 1986; Tait *et al.*, 1989) und deren Aktivität charakterisiert (Ryan und Engel, 1953). Bisher wurden zwölf verschiedene 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen beschrieben, die sich in ihrer Gewebeverteilung, ihren katalytischen Eigenschaften und ihrer Substratspezifität unterscheiden. Viele dieser Enzyme spielen bei der Pathogenese verschiedenster Krankheiten wie z.B. Androgynie (Andersson *et al.*, 1996; Geissler *et al.*, 1994), Polyzystischer Nieren (Maxwell *et al.*, 1995) oder Alzheimer-Krankheit (Yan *et al.*, 1997) eine Rolle. 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 6 wurde bisher nur in der Ratte identifiziert, das humane Ortholog wurde bisher noch nicht beschrieben. Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Eigenschaften der humanen 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen.

17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität konnte nicht nur in klassischen steroidogenen Geweben wie Plazenta (Luu-The *et al.*, 1990), Ovarien (Pittaway *et al.*, 1983) und Hoden (Geissler *et al.*, 1994; Inano und Tamaoki, 1986) gefunden werden, sondern auch in einer großen Anzahl peripherer Gewebe, wie z.B. Fettgewebe (Bleau *et al.*, 1974), Endometrium (Casey *et al.*, 1994; Tseng *et al.*, 1972), Ileum (Inano und Tamaoki, 1986), Leber (Breuer *et al.*, 1966), Lunge (Milewich *et al.*, 1982), Haut und Vaginalschleimhaut (Weinstein *et al.*, 1968), roten

Blutkörperchen (Jacobsohn und Hochberg, 1968) und Brust- (Poulin *et al.*, 1989; Poutanen *et al.*, 1990; Theriault und Labrie, 1991) und Prostata- (El-Alfy *et al.*, 1999) Krebszellen.

Entsprechend der meisten Dehydrogenasen geht man davon aus, dass es sich bei den 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen um reversible Enzyme handelt, die die gegenseitige Umwandlung von Substrat und Produkt unter Zugabe von oxidierten (NAD⁺/NADP⁺) bzw. reduzierten (NADH/NADPH) Cofaktoren katalysieren. Wird der Aktivitätstest in intakten Zellen ohne Zugabe von Cofaktoren durchgeführt, zeigen alle untersuchten Enzyme eine eindeutige Präferenz für eine Katalyse-Richtung (Luu-The, 2001). Trotz ihrer großen chemischen Ähnlichkeit, sind NADH und NADPH (bzw. NAD⁺ und NADP⁺) nicht unbedingt austauschbar. NADPH wird im Pentosephosphatweg erzeugt und wird hauptsächlich in reduktiven, biosynthetischen Reaktionen umgesetzt. NADH hingegen spielt bei der Synthese von ATP in der oxidativen Phosphorylierung als Äquivalent für die freie Energie aus der Metabolit-Oxidation eine Rolle. Darüber hinaus ist die Konzentration von reduzierten und oxidierten Cofaktoren im Cytoplasma verschieden, die Konzentration von NADPH ist höher als die von NADP⁺ (Veech *et al.*, 1969), wohingegen die Konzentration von NAD⁺ höher ist als die von NADH (Williamson *et al.*, 1967). Enzyme, die das phosphorylierte Cofaktoren-Paar bevorzugen (17 β -HSD Typ 1,3,5,7) werden folglich in die reduzierende Richtung getrieben, 17 β HSD's die hingegen NAD⁺/NADH bevorzugen (Typ 2,4,6,8), eher oxidierend wirken.

Abbildung 1.1 stellt die enzymatische Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen Typ 1, 2, 3, 5, 7 und 8 in intakten, mit der entsprechenden cDNA-transfizierten HEK 293 Zellen unter Zugabe verschiedener Substrate dar.

Khan *et al.* (Khan *et al.*, 2004) konnte zeigen, dass sich bei ausgiebiger Inkubation der HEK-293-Zellen mit dem 17 β -Hydroxy- oder 17-Ketosteroid ein Gleichgewicht zwischen Hydroxy- und Ketoform aufbaut, das im Fall von 17 β -HSD1 und 3 ein Verhältnis von 92:8 und im Fall von 17 β -HSD2 5:95 beträgt. Werden kinetische Untersuchungen auf der Basis dieser Gleichgewichte durchgeführt, so sind die Geschwindigkeiten für die Hin- und Rückreaktion gleich.

Von den zwölf bekannten 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen gehören die meisten zur Familie der Short-chain-Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR). Nur 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 5 bildet eine Ausnahme, sie ist Mitglied der Aldoketoreduktasen-Familie (AKR). Die Gruppe der SDR stellt eine sehr heterogene Protein-Familie dar, die durch einige wenige aber eindeutige Sequenzmotive definiert ist. Bisher wurden rund 3000 Primärstrukturen als Mitglied der SDR-Familie charakterisiert. Innerhalb des menschlichen Genoms wurden bereits 63 SDR-

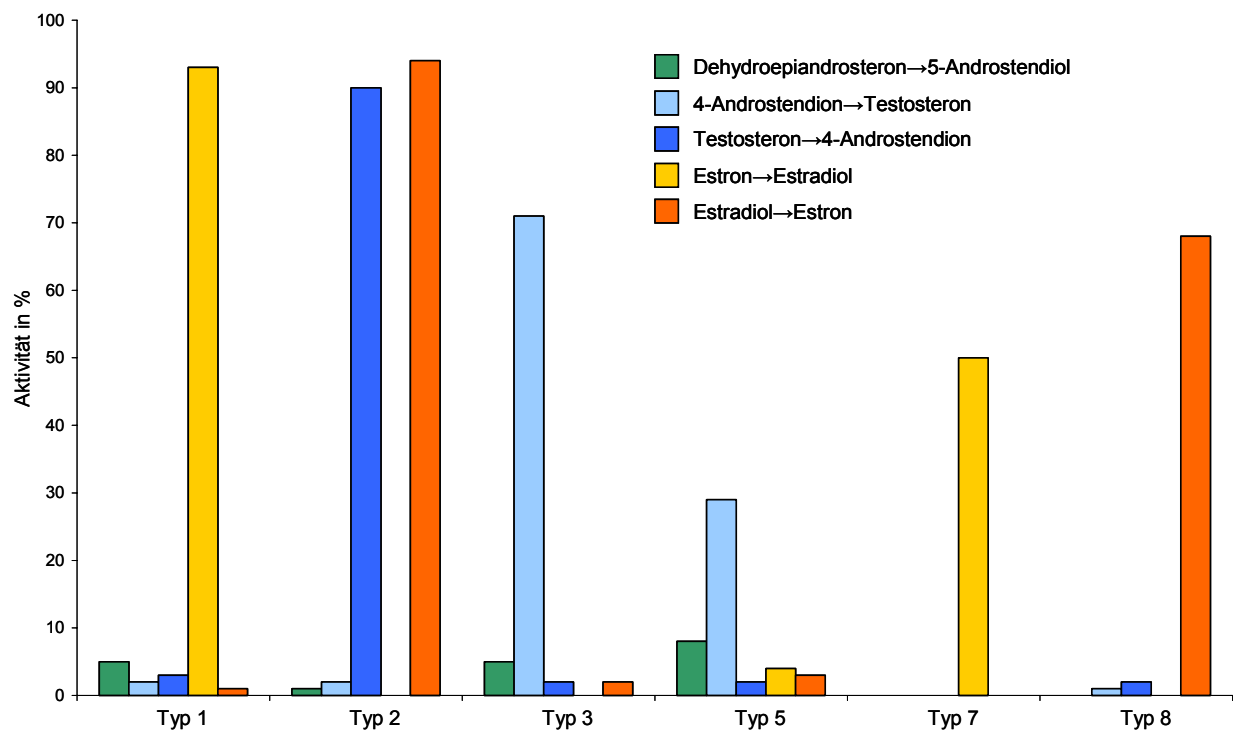


Abbildung 1.1: Vergleich der enzymatische Aktivität von 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen Typ 1,2,3,5,7,8 in intakten transfizierten HEK 293 Zellen ohne Zugabe von exogenen Cofaktoren nach (Luu-The, 2001)

Gene identifiziert. Paarweise Sequenzvergleiche ergaben eine durchschnittliche Identität von nur etwa 15-30%. Alle verfügbaren dreidimensionalen Strukturen weisen jedoch ein sehr ähnliches Faltungsmuster auf, das Rossmann-Faltungsmotiv, bestehend aus einem zentralen β -Faltblatt und flankierenden α -Helices. Die meisten SDR-Enzyme umfassen eine Kernstruktur von etwa 250-300 Aminosäuren Länge, häufig mit N- oder C-terminalen Transmembran-Domänen oder Signalpeptiden. Die Coenzym-Bindungsmotiv TGxxxGxG ist hochkonserviert und befindet sich zwischen Position 12 und 19 (bezüglich der 17 β HSD1). Die bisher beschriebene katalytische Triade der SDR-Familie (Jornvall *et al.*, 1995), die aus den Aminosäuren S138-Y151-K155 besteht, wurde von Filling *et al.* (Filling *et al.*, 2002; Oppermann *et al.*, 2003) zu einer katalytischen Tetrade, bestehend aus N111- S138-Y151-K155 erweitert. Tyrosin fungiert dabei als katalytische Base, während Serin das Substrat stabilisiert und Lysin mit der Nicotinamid-Ribose interagiert und den pK_a-Wert der Hydroxyl-Gruppe des Tyrosins senkt.(Utsunomiya *et al.*, 2003)

Abbildung 1.2 gibt einen Überblick über die Beteiligung der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen an den letzten Reaktionen im Estrogen- und Androgen-Metabolismus.

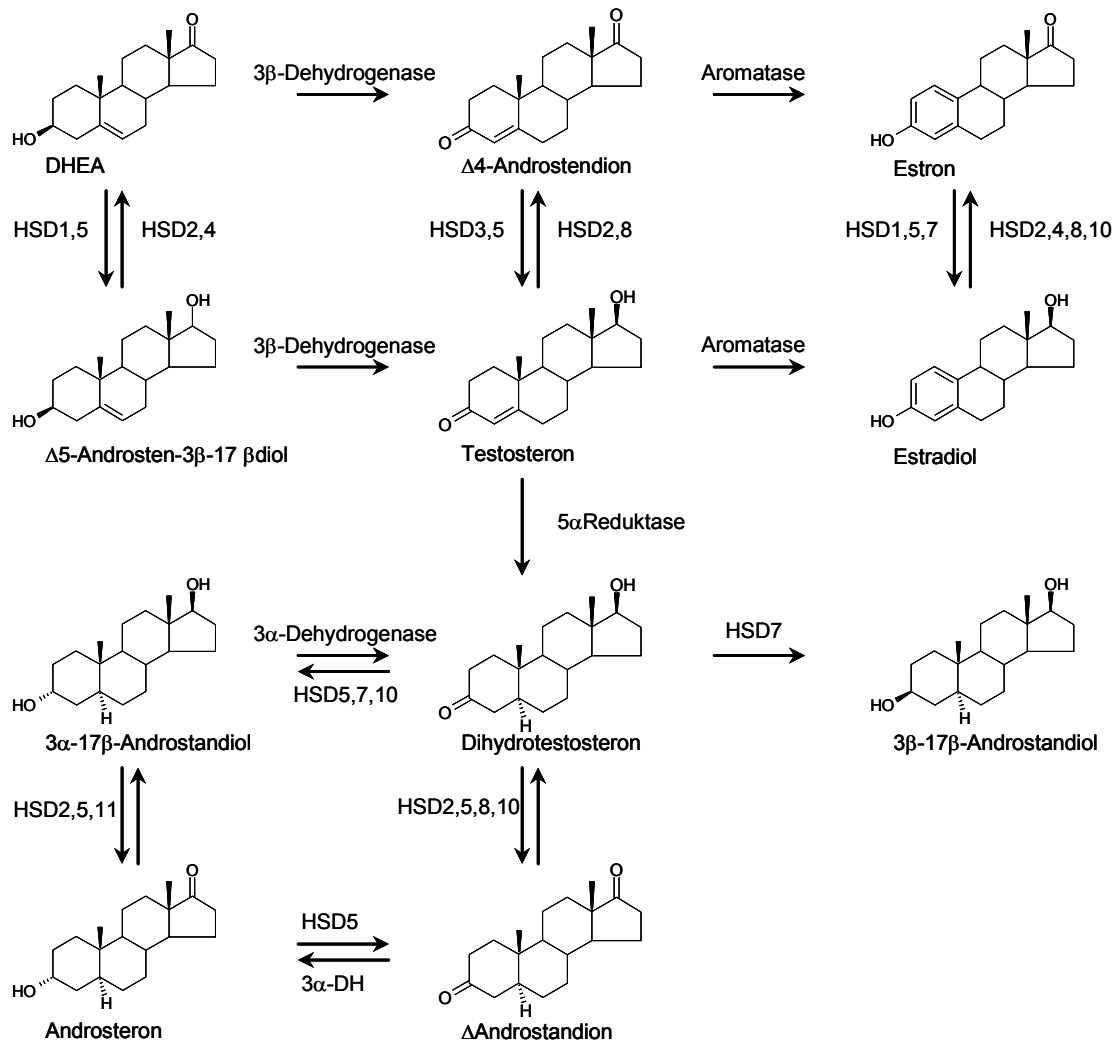


Abbildung 1.2: Übersicht über die letzten Reaktionen im Estrogen- und Androgen-Metabolismus nach (Mindnich *et al.*, 2004)

1.2 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ1

Die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ1 wurde ursprünglich aus humaner Plazenta gereinigt (Jarabak *et al.*, 1962; Langer und Engel, 1958). Das aus 327 Aminosäuren bestehende Enzym liegt in der aktiven Form als Homodimer vor (Lin *et al.*, 1992) und hat eine molekulare Masse von 35kDa. 17 β HSD1 katalysiert vorwiegend die Reduktion von Estron zu Estradiol in Gegenwart von NADPH.

Das aus sechs Exons und fünf Introns bestehende Gen *hsd17b1* konnte durch Hybridisierungsexperimente auf Chromosom 17q21 lokalisiert werden (Luu The *et al.*, 1989). Zwei mRNA-Transkripte mit 1,3kb und 2,2kb liegen in der Zelle vor. Primer Extension Untersuchungen zeigten, dass das kleinere Transkript neun Nucleotide nach dem ersten ATG-Start-Codon beginnt, während das größere Transkript 814 nicht-codierende Nucleotide am N-Terminus aufweist. In Northern-Blot-Analysen konnte die weite Verbreitung sowohl in steroidogenen (Ovarien, Plazenta, Brust, Gebärmutterschleimhaut, Prostata) als auch in peripheren Geweben (Haut, Fettgewebe) gezeigt werden. Beim Menschen ist die Expression von 17 β HSD Typ1 mRNA in der Plazenta, den Ovarien, den Follikeln und im Gelbkörper übereinstimmend mit deren Funktion in der Estradiol-Synthese besonders hoch (Luu-The *et al.*, 1990).

Aufgrund der biologischen Potenz des Hormons Estradiol ist die Regulation der 17 β HSD1-Expression von großer Bedeutung. In peripheren Geweben beeinflussen Progestin und Retinolsäure die Expression, während Wachstumsfaktoren, Gonadotropine und Steroidhormone die Expression in den Granulosazellen der Ovarien regulieren (Peltoketo *et al.*, 1996).

1.2.1 Struktur

Die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase besteht aus einem zentralen, siebensträngigen, parallelen β -Faltblatt, das von sechs α -Helices, drei auf jeder Seite, umgeben wird. Dabei wechseln sich α -Helices und β -Stränge regelmäßig ab. β A und β F bilden das Rossmann-Faltungsmotiv, die an der Bindung des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Cofaktors beteiligt ist. Verglichen mit anderen Oxidoreduktasen (Ghosh *et al.*, 1994) befindet sich in der 17 β HSD1 zwischen β F und α G eine zusätzliche lange Helix α G. Zwei Helix-Turn-Helix-Motive (Ghosh *et al.*, 1995) bestehend aus den Helices α G'' (200-206) und α G''' (209-2226) bzw. α H (273-284) und α H' (260-266) sind in der 17 β HSD1 zu finden. In diesem Teil des Proteins (190-229 und 259-284) befindet sich die Substrat-Bindungstasche. Aufgrund der diffusen Elektronendichte

konnte die Struktur der letzten 43 Aminosäuren (284-327) nicht bestimmt werden. Dies deutet darauf hin, dass dieser Teil des Proteins entweder unstrukturiert ist oder eine hohe Beweglichkeit aufweist (Ghosh *et al.*, 1995).

Die 17 β HSD1 liegt in der aktiven Form als Dimer vor (Lin *et al.*, 1992), wobei die Struktur der beiden Monomere eine zweizählige Symmetrieachse aufweist. An der Dimerisierungsstelle bilden die Helices α E und α F der beiden Monomere ein Bündel aus vier Helices.

1.2.1.1 Bindungsstelle für den Cofaktor

Breton *et al.* (Breton *et al.*, 1996), dem es als erster gelang, den Komplex aus 17 β HSD mit Estradiol und NADP⁺ zu kristallisieren, konnte die Bindungsstelle für den Cofaktor näher charakterisieren (Abbildung 1.3). Der Nicotinamid-Ring liegt in der *syn*- und der Adenin-Ring in der *anti*-Konformation vor. Der B-Ring des Nicotinamids weist zum D-Ring des Steroids, der Abstand zwischen dem Nicotinamid C4-Atom und dem Estradiol C17 beträgt 3,62 Å. Der Cofaktor wird durch den hydrophoben Kontakt mit zwei Resten (Gly9 und Ala91) und durch das Ausbilden von Wasserstoffbrücken mit einer Reihe von Aminosäureresten in der Cofaktor-Bindungsstelle stabilisiert.

Die Carbamid-Gruppe des Nicotinamidrings bildet zur Hydroxylgruppe von Thr190 (Sawicki *et al.*, 1999) und im Fall der Struktur aus 17 β HSD1 im Komplex mit Estradiol und NADP⁺ auch zur Amid-Gruppe von Val188 Wasserstoffbrücken aus. Die Nicotinamid-Ribose wird hauptsächlich durch Wasserstoffbrücken zwischen Lys159, Tyr155 und O2' bzw. Asn90, Gly92

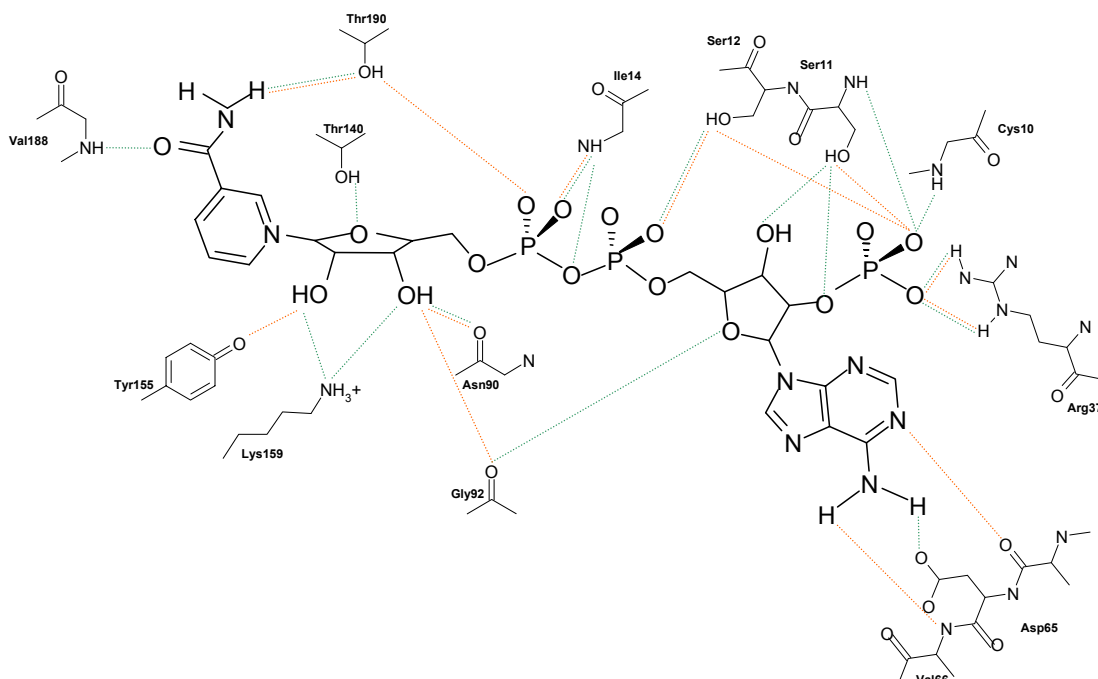


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen NADPH und 17 β HSD1

und O3' sowie einer Wasserstoffbrücke zwischen O5' und der Hydroxylgruppe von Thr140 stabilisiert (Breton *et al.*, 1996; Sawicki *et al.*, 1999). Die von Ghosh (Ghosh *et al.*, 1995) postulierte erhöhte Beweglichkeit der Seitenkette von Lys159, die als Folge davon eine Wasserstoffbrücke zum Tyr155 der katalytischen Triade ausbilden soll, konnte von Breton *et al.* nicht bestätigt werden. Zur Pyrophosphatgruppe des NADP⁺ wurden Wasserstoffbrücken sowohl zu den Seitenketten von Ser12, Asn90 und Thr190 als auch zur Hauptkette der Aminosäuren Ile14, Gly15 und Phe192 beobachtet. (Breton *et al.*, 1996; Sawicki *et al.*, 1999).

Aufgrund enzymatischer Untersuchungen wird für die 17 β HSD1 angenommen, dass ihre Affinität für NADP⁺ höher ist als für NAD⁺ (Luu-The *et al.*, 1995), obwohl eine der beiden basischen Aminosäuren fehlt, die das Phosphat am Adenosin in NADPH-bevorzugenden Enzymen stabilisieren. Die Aminosäure Arg37 bildet zum Phosphat am Adenosin eine Salzbrücke aus, die eine der beiden negativen Ladungen kompensiert. Arg37 ist Teil des Rossmann-Faltungsmotivs und ist in 26 von 46 NADP⁺-bevorzugenden Enzymen konserviert (Bairoch und Boeckmann, 1993). Die zweite basische Aminosäure, meist lokalisiert an der vierten Position der Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Gly Konsensus-Sequenz des Dinucleotid-Bindungs-Motiv, fehlt in der 17 β HSD. Sequenz-Vergleiche zwischen 17 β HSD1, 2 und 3 zeigen, dass bei Typ1 und 3, die als NADP⁺-bevorzugend bekannt sind, das Leu36 konserviert ist, wohingegen sich in 17 β HSD2 als NAD⁺-bevorzugendem Enzym an dieser Stelle ein Glutamat befindet. Negative Ladungen an dieser Stelle fördern die Bindung von NAD⁺ während polare oder hydrophobe Aminosäuren die Bindung von NADP⁺ ermöglichen.

Kinetische Untersuchungen mit NADPH als Cofaktor lassen eine deutliche Substrathemmung durch Estron, nicht aber durch DHT oder DHEA erkennen. Wird NADH anstatt von NADPH verwendet ist keine Hemmung zu beobachten. Da auch die Mutation Leu36Asp in der Cofaktor-Bindungsstelle diese Substrathemmung beseitigt, wird die NADPH-Abhängigkeit dieses Phänomens bestätigt. Da Estron auch die Oxidation von Estradiol kompetitiv hemmt, kann von der Bildung eines Enzym/NADP⁺/Estron-Dead-End-Komplexes ausgegangen werden (Gangloff *et al.*, 2001).

In der Struktur der H221L-Mutante im Komplex mit Estradiol und NADP⁺ war Lys195 durch die Ausbildung einer Salzbrücke zum Phosphat des Adenosins an einem Ladungsausgleich beteiligt (Mazza *et al.*, 1998), wohingegen in der Struktur des Wildtyps mit Equilin und NADP⁺ dieser Kontakt nicht beobachtet werden konnte (Sawicki *et al.*, 1999).

Desweiteren wird das an das Adenosin gebundene Phosphat über Wasserstoffbrücken zu Cys10, Ser11 und Ser12 stabilisiert während die Ribose selbst Kontakt zur Amid-Gruppe von Gly92 und

zur Hydroxyl-Gruppe von Ser111 herstellt. Das zum Lösungsmittel exponierte Adenin interagiert nur mit der Seitenkette von Asp90.

In der Apoenzym-Struktur (Ghosh *et al.*, 1995) nimmt der Substrat-Eingangs-Loop eine „offene“ Konformation ein und lässt damit unbeschränkten Zugang zu den Substrat- und Cofaktor-Bindestellen zu. Dieser Loop verändert seine Konformation sowohl im Komplex mit Equilin und NADP⁺ als auch bei der Mutante H221L im Komplex mit Estradiol und NADP⁺, dabei bewegen sich die Aminosäuren 186-201 in Richtung der *active site*. In dieser geschlossenen Konformation interagieren Phe192 und Met193 über van-der-Waals-Kontakte mit der Nicotinamid-Gruppe und dem Substrat und schirmen NADP⁺ vom Lösungsmittel ab. In anderen Dehydrogenasen sind ähnliche flexible Loops nahe der Dinucleotid-Bindungsstelle bekannt (Ghosh *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1992), alle werden durch zwei Prolin-Reste (in 17 β HSD1 Pro187 und Pro200) flankiert.

1.2.1.2 Substratbindungsstelle

Die dreidimensionalen Strukturen aus Co-Kristallisationsexperimenten mit Estradiol (Breton *et al.*, 1996; Mazza *et al.*, 1998), Equilin (Sawicki *et al.*, 1999) und Dehydroepiandrosteron sowie Dihydrotestosteron (Han *et al.*, 2000) geben ein umfangreiches, molekulares Bild der Substratbindungstasche, die sich zwischen den Helices α G` (209-227), α H` (274-284) und α H` (251-271) befindet. Sie kann in drei Regionen untergliedert werden. Ein Teil erkennt den phenolischen A-Ring in Estrogenen und enthält die konservierten Aminosäuren His221 und Glu282, die Wasserstoffbrücken zum O3 des Steroids bilden können. Hydrophobe Aminosäuren tragen zu 79% zur Oberfläche der Substratbindungstasche bei. Dieser zweite und hydrophobe Bereich (Val143, Met147, Leu149, Pro 187, Tyr218, Val225, Phe226, Phe259 und Met279) umgibt den Kern des Steroids und begünstigt die Bindung des Substrats thermodynamisch. Die katalytische Region umgibt den D-Ring und enthält die konservierten Aminosäuren Tyr155 und Ser142, wobei Tyr155 β -ständig ist und der Nicotinamid-Rest zur α -Seite des Steroids weist, um den Hydrid-Transfer zu ermöglichen. Das Substrat wird dabei durch zwei Wasserstoffbrücken zwischen O17 und Tyr155 und Ser142 stabilisiert. Die Hydroxylgruppen von Tyr155 und Ser142 scheinen zueinander ebenfalls eine Wasserstoffbrücke auszubilden, dabei entsteht ein dreieckiges Wasserstoffbrücken-Netzwerk zum O17. Abbildung 1.4 gibt einen schematischen Überblick über die Substrat-Bindungstasche mit 17 β -Estradiol.

Da sowohl Androgene als auch Estrogene 3- und 17-Hydroxyl- bzw. Ketogruppen besitzen können, muss die Spezifität der 17 β HSD1 für Estrogene durch bestimmte Reste innerhalb des hydrophoben Bereichs vermittelt werden. Eine sterische Hinderung der C-19-Methylgruppe in Androgenen, wie z.B. zwischen Leu149 und der Methylgruppe an der Position C10 in DHEA

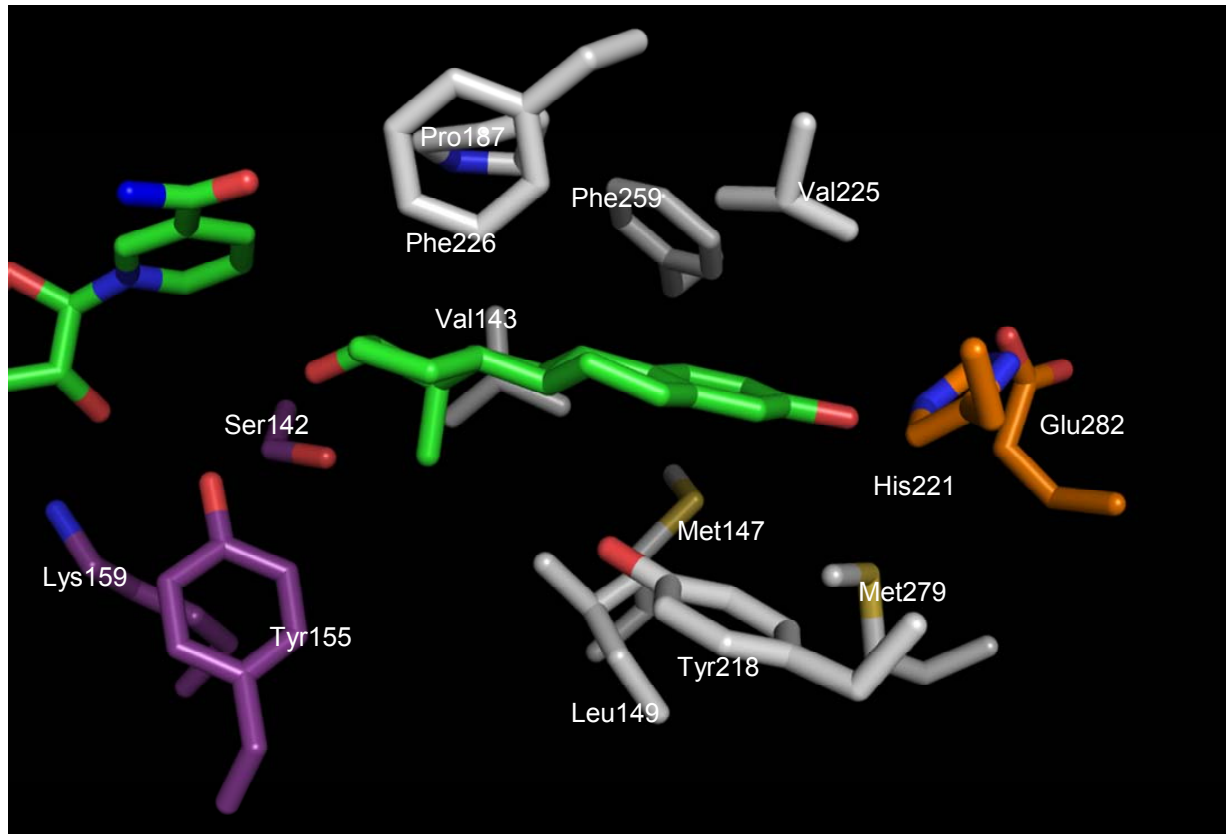


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der an der Wechselwirkung mit Estradiol beteiligten Reste aus der Substrat-Bindungstasche der 17 β HSD1
 17 β -Estradiol und NADP (grün), katalytische Triade (violett), Substraterkennungsstelle (orange), Aminosäuren des hydrophoben Inneren (grau)

und DHT (Han *et al.*, 2000), kann das Steroid in eine unvorteilhafte Position zwingen, die eine Bindung erschwert oder sogar verhindert. Leu149 bildet zusammen mit Val225 und dem A-Ring von C18-Steroiden eine stapelförmige Anordnung, die typisch ist für estrogenspezifische Proteine (Nahoum *et al.*, 2003). Kinetische Untersuchungen zeigten, dass die katalytische Spezifität der 17 β HSD1 ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) um Faktor Tausend abnimmt, wenn Androgene anstatt Estrogenen als Substrat verwendet werden (Gangloff *et al.*, 2001; Murdock *et al.*, 1988). Bei weiteren kinetischen Untersuchungen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass 17 β HSD1 bei Zugabe von DHT sowohl die 3 β -Reduktion als auch die 17 β -Oxidation mit ähnlichen K_{m} -Werten katalysieren kann. Die Vermutung, dass 17 β HSD1 Androgene in umgekehrter Orientierung binden kann, wurde dann durch die Ergebnisse von Cokristallisationsexperimenten mit Testosteron (Gangloff *et al.*, 2003) und Δ Androstandion sowie Δ 4-Androstendion (Shi und Lin, 2004) untermauert.

Die Bedeutung von His221 und Glu282 bei der Substraterkennung ist nach wie vor noch nicht vollständig geklärt. *In vitro* Aktivitätsmessungen an der Mutanten H221A zeigen einen

deutlichen Abfall der katalytischen Aktivität um das 20 fache für die Oxidation und das 11 fache für die Reduktion (Puranen *et al.*, 1994) wohingegen in vivo Aktivitätsmessungen in sf9-Zellen weder die Mutanten H221A, E282A/Q noch die entsprechenden Doppelmутanten deutliche Abweichungen vom Wildtyp zeigen (Puranen *et al.*, 1997). Bei Sequenzvergleichen zwischen 17 β HSD1-3 lassen sich nicht eindeutig äquivalente Reste finden, die die Rolle von His221 (17 β HSD1) in der Substraterkennung einnehmen könnten. Die Ergebnisse aus den Kristallisationsexperimenten lassen jedoch auf eine Beteiligung von His221 und Glu282 an der Substraterkennung schließen, da beide Reste Wasserstoffbrücken zur 3-Hydroxylgruppe des Steroids ausbilden (Breton *et al.*, 1996; Gangloff *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2000; Mazza *et al.*, 1998; Sawicki *et al.*, 1999; Shi und Lin, 2004).

1.2.2 Katalytischer Mechanismus

Basierend auf strukturellen und Mutationsuntersuchungen wird die Beteiligung der innerhalb der SDR-Familie konservierten Aminosäuren Tyr155, Lys159 und Ser142 am katalytischen Mechanismus vorgeschlagen, der in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt ist (Azzi *et al.*, 1996; Breton *et al.*, 1996; Ghosh und Vihko, 2001; Puranen *et al.*, 1997; Puranen *et al.*, 1994). Die Seitenkette von Lys159 senkt, möglicherweise verbunden mit einer leichten konformationellen Änderung, den pK_a-Wert des Tyr155 Hydroxyl-Protons ab und stabilisiert den Cofaktor durch Wasserstoffbrücken zur 2`und 3`-Hydroxylgruppe der Nicotinamid-Ribose. Die Hydroxyl-Gruppe von Tyr155 kann im Folgenden aufgrund der Wasserstoffbrücke die C17-Keto-Gruppe des Steroids elektrophil angreifen. Das Steroid und der Nicotinamid-Ring befinden sich in Folge dessen in einer optimalen Orientierung zueinander um den direkten Pro-S-Hydrid-Transfer zu ermöglichen. Ser142 könnte ebenfalls als Protonen-Donator fungieren aber aufgrund des höheren

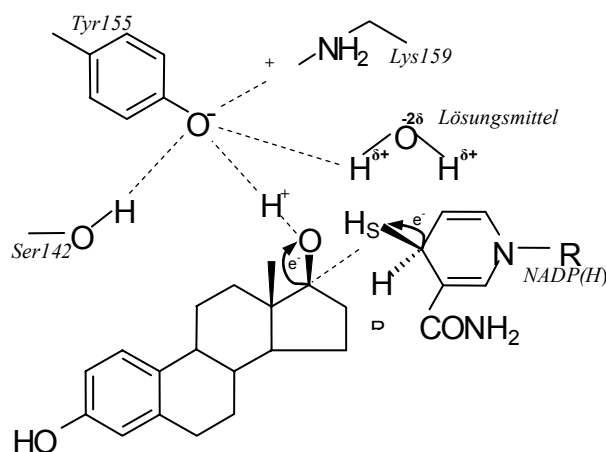


Abbildung 1.5: Katalytischer Mechanismus der 17 β HSD1

pK_a-Werts und des größeren Abstands scheint es wahrscheinlicher, dass die Funktion von Ser142 in der Stabilisierung der negativen Ladung des Oxianionen-Übergangszustands von Tyr155 besteht.

Nach Filling *et al.* (Filling *et al.*, 2002), die die möglichen Reaktionsmechanismen anhand der verfügbaren Kristallstrukturen von SDR-Enzymen verglichen haben, muss

der Reaktionsmechanismus um die

Aminosäure Asn114 erweitert werden. Asn114 ist in der Helix αE lokalisiert, die an der Dimerisierung beteiligt ist. Aufgrund der Wasserstoffbrückenbindungen der Seitenkette von Asn114 bildet die Helix an dieser Stelle einen scharfen Knick, der die Carbonylgruppe von Asn114 zwingt, ein Wassermolekül zwischen dem Rückgrat und dem Lysin des aktiven Zentrums zu binden. Der Verlust des Protons wird durch den Austausch mit diesem fest gebundenen Wassermolekül regeneriert.

1.2.2.1 Substratinhibition

Bei Kinetik-Untersuchungen an der 17 β HSD1 wurde für die Reduktion unter Verwendung von NADPH als Cofaktor und Estron als Substrat bei hohen Estron-Konzentrationen ein Substrat-Inhibitions-Phänomen festgestellt (Gangloff *et al.*, 2001). Wird hingegen NADH als Cofaktor verwendet, so wird keine Substratinhibition mehr beobachtet und die kinetischen Konstanten sind deutlich verändert. Die Mutation der Aminosäure in der Cofaktor-Bindungsregion, die bei den meisten NADPH-bevorzugenden SDR's die 2'-Phosphatgruppe in NADPH stabilisiert (meist Arginin, bei 17 β HSD1 Leu36) in eine negativ geladene Aminosäure (L36D), lässt die Substratinhibition gänzlich verschwinden, was eine NADPH-Abhängigkeit dieses Phänomens bestätigt.

Mit anderen Substraten wie Dehydroepiandrosteron oder Dihydrotestosteron in Gegenwart von NADPH wurde keine Substratinhibition festgestellt. Gleichzeitig wurde eine kompetitive Inhibition der Estradiol-Oxidation durch Estron beobachtet.

All diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass ein Enzym-NADP⁺-Estron *dead-end* Komplex gebildet wird.

NADPH ist demnach nicht nur für die hoch-spezifische Reduktion von Estron durch die 17 β HSD1 erforderlich, sondern stellt zusätzlich eine Voraussetzung für die Kontrolle der Aktivität durch Substratinhibition dar.

1.2.2.2 Inhibitoren

Die entscheidende Bedeutung der 17 β HSD bei Brustkrebs konnte von Miyoshi *et al.* anhand des gesteigerten mRNA Niveaus in postmenopausalem Brustkrebs im Vergleich zu prämenopausalem Brustkrebs gezeigt werden (Miyoshi *et al.*, 2001). Die alleinige Inhibition des Estrogen-Rezeptors durch einen Antagonisten (antiestrogene Wirkung) würde zu einer Akkumulation des aktiven Steroids führen, die die Wirkung des Antagonisten verringern könnte. Die gleichzeitige Hemmung der Steroid-Biosynthese einerseits durch eine Inhibition der

17 β HSD oder Aromatase und die Bindung an den Estrogen-Rezeptor andererseits durch sog. „dual-site“-Inhibitoren ist folglich wünschenswert.

Das Design von 17 β HSD Inhibitoren steht seit vielen Jahren im Fokus der Brust-Krebs-Forschung, allerdings mit wenig Erfolg bezüglich der Anwendbarkeit als Therapeutikum. Die Untersuchungen konzentrierten sich zuerst hauptsächlich auf die Veränderung des Steroid-Teils. Eine Reihe von Inhibitoren wie z.B. 16 α -(Halogenalkyl)Estradiol wurden entwickelt (Auchus und Covey, 1986; Levesque *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1983; Tobias *et al.*, 1982; Tremblay *et al.*, 1995; Tremblay und Poirier, 1998), die jedoch alle die Eigenschaft haben, die 17 β HSD durch kovalente Bindungen irreversibel zu inhibieren und gleichzeitig estrogene Aktivität aufweisen. Im Folgenden gelang es, reversible Inhibitoren zu entwickeln, wie C16, C17 und C18 Estron-Derivate (Allan *et al.*, 2006; Owen und Ahmed, 2004; Poirier *et al.*, 2006; Sweet *et al.*, 1991) sowie C6, C7, C16, Estradiol-Derivate (Labrie *et al.*, 1992; Poirier *et al.*, 2006; Poirier *et al.*, 1998) mit Aliphaten, Aromaten und Heterocyclen, bei denen die antiestrogene Wirkung teilweise gezeigt wurde. 16-Oxoestron nimmt eine Sonderstellung ein, da es bei neutralem pH 7,2 reversibel und bei basischem pH 8,5 irreversibel inhibiert (Inano und Tamaoki, 1983). Aber auch Secoestradiol, einem Steroid-Derivat ohne D-Ring, mit aliphatischen C13-Substituenten zeigt eine deutliche Hemmung der 17 β HSD1 (Lawate und Covey, 1990). Im Weiteren wurde die Suche nach Inhibitoren ausgedehnt auf Estradiol-Adenosin-Hybride, die gleichzeitig die Steroid- und die Cofaktor-Bindungsstelle inhibieren (Qiu *et al.*, 2002).

Aber auch nicht-steroidale Inhibitoren konnten entdeckt werden. Coumestrol und einige Flavonoide sind als 17 β HSD und/oder Aromatase Inhibitoren bekannt (Le Bail *et al.*, 1998; Le Bail *et al.*, 2001; Owen und Ahmed, 2004). Aber auch Inhibitoren, die ausschließlich am Rossmann- Faltungsmotiv angreifen, also die Bindung von NADPH verhindern, konnten gefunden werden (Brown *et al.*, 2003).

Eine völlig neue Gruppe unter den nicht-steroidalen Inhibitoren stellen die auf einem Pyrimidon-Gerüst basierenden Liganden dar, die mit einem IC₅₀ von bis zu 5 nM die 17 β HSD1 sehr effizient hemmen (Messinger *et al.*, 2006).

1.3 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen Typ2

Das Vorkommen der 17 β HSD Typ 2, früher auch „human placenta microsomal 17 β HSD“ genannt, wurde zuerst von Blomquist *et al.* beschrieben (Blomquist *et al.*, 1983; Blomquist *et al.*, 1985). Bei der 17 β HSD Typ2 handelt es sich um ein Transmembran-Protein des endoplasmatischen Retikulums (Puranen *et al.*, 1999). Nach der Isolierung und Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass es sich bei der 17 β HSD2 um ein Homodimer von 387 Aminosäuren Länge und einem Molekulargewicht von 42kDa handelt (Andersson, 1995; Durocher *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 1993).

Das sieben Exons und ca. 40 bp umfassende Gen *hsl17b2* befindet sich auf dem Chromosom 16q24 (Casey *et al.*, 1994; Durocher *et al.*, 1995). Zwei durch alternatives Spleißen entstehende Transkripte liegen in der Zelle vor, nur die 1,5 kb mRNA codiert für das aktive Enzym (Labrie *et al.*, 1995).

N-Terminal befindet sich ein Signalanker-Motiv, bestehend aus einer Reihe von Lysin-Resten (KYKK) in Verbindung mit einem 32 Aminosäure umfassenden hydrophoben Bereich, gefolgt von einer Reihe negativ geladener Reste (ELLPVD). Die Eigenschaft der als Typ II bekannten Signal-Anker-Motive zeichnet sich durch aus, dass sie sich in einer N_{cyto}/C_{exo} Orientierung in die Membran einlagern (High *et al.*, 1991). N-terminale Deletionen (N29, N38, N52, N61 und N80) lassen den Schluß zu, dass die erste der beiden vermuteten Transmembran-Helices weniger bedeutend, die zweite hingegen für die Funktion des Enzyms erforderlich ist. (Lu *et al.*, 2002; Puranen *et al.*, 1999).

Der C-Terminus umfasst ein ER-Retentionssignal (Jackson *et al.*, 1990), das aus drei aufeinander folgenden Lysin-Resten besteht.

Unter Verwendung von NAD als Cofaktor (Luu-The *et al.*, 1995; Miettinen *et al.*, 1996) bevorzugt die 17 β HSD2 die oxidative Aktivität und wandelt die biologisch aktiven Hydroxysteroiden wie Estradiol, Testosteron und Dihydrotestosteron in ihre inaktiven Ketoformen um. Desweiteren können auch C²⁰-Steroide als Substrat fungieren, so kann z.B. 20 α Dihydroprogesteron zu Progesteron oxidiert werden (vgl. Abbildung 1.6).

17 β HSD2 wird hauptsächlich in Plazenta, Leber, Dünndarm sowie in geringerem Maße in Endometrium, Niere, Pankreas und Dickdarm exprimiert. (Casey *et al.*, 1994; Moghrabi *et al.*, 1997; Mustonen *et al.*, 1998). 17 β HSD2 mRNA konnte auch in Krebszelllinien der Brust, des Endometriums und der Prostata sowie bei Meningeomen nachgewiesen werden. (Carsol *et al.*, 1994; Elo *et al.*, 1996; Miettinen *et al.*, 1996). Die 17 β HSD2 scheint demnach für die

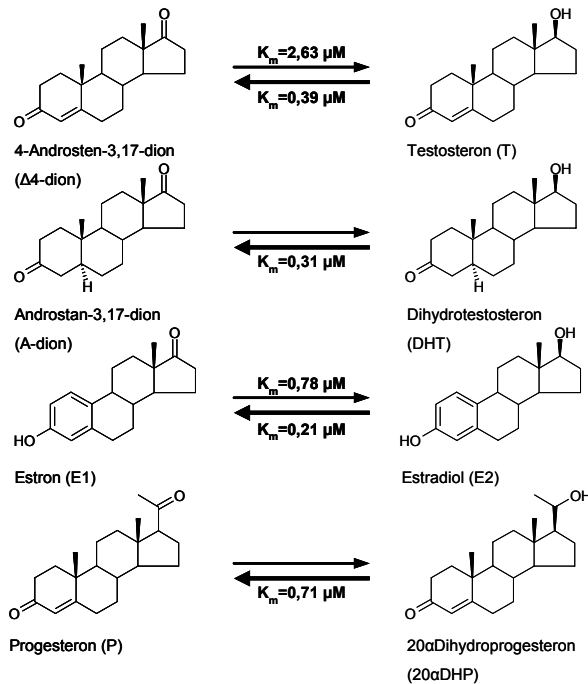


Abbildung 1.6: Reaktionen, die von 17βHSD2 katalysiert werden, K_m -Werte nach Wu et al. (Wu et al., 1993)

damit als Barriere zwischen Fötus und Mutter (Mustonen *et al.*, 1998). Dazu befindet sich das Enzym nur in den Endothelzellen der fötalen Kapillaren, nicht aber in den Syncytioblasten der Plazenta (Moghrabi *et al.*, 1997).

Mit der Aufrechterhaltung eines hohen Progesteronspiegels durch die 20αHSD-Aktivität wird der 17βHSD2 eine weitere Rolle während der Schwangerschaft zugeschrieben (Wu *et al.*, 1993). Auch ein Zusammenhang zwischen 17βHSD2 und Dickdarmkrebs wurde beschrieben (English *et al.*, 2001; Oduwole *et al.*, 2002).

Kinetische Untersuchungen *in vitro* ergaben für die Oxidationsreaktionen K_M -Werte zwischen 0,21 und 0,71 μM, vgl. Abbildung 1.6. Für die Oxidation von Estradiol, Testosteron und 20α-Dihydroprogesteron konnte ein pH-Optimum von 9,5 ermittelt werden, während die Reduktion bei 6,5 begünstigt wird. (Wu *et al.*, 1993).

Weder die dreidimensionale Struktur noch der katalytische Mechanismus konnten bisher aufgeklärt werden. 17βHSD1 und 2 weisen nur 23% Sequenzidentität auf. Der Vergleich der beiden Primärstrukturen (vgl. Abbildung 1.7) legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den konservierten Aminosäuren N192, S219, Y232 und K236 um die für die SDR-Familie typische katalytische Triade handelt. Die Konsensus Sequenz des Dinucleotid-Bindungs-Motivs Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Gly (Pos. 88-95) ist ebenfalls konserviert.

Inaktivierung der biologisch aktiven, oxidierten Steroide in peripheren Geweben verantwortlich zu sein und damit eine schützende Funktion auszuüben. In endokrinen Geweben wie Plazenta oder Endometrium wird vermutet, dass das Verhältnis zwischen aktiven und inaktiven C18 und C19 Steroiden durch das Zusammenspiel der Isoenzyme Typ1 und 2 während der Schwangerschaft reguliert wird (Beaudoin *et al.*, 1995; Blomquist *et al.*, 1994; Takeyama *et al.*, 1998).

In der Plazenta limitiert die 17βHSD2 den Zugang fötaler Androgene zu mütterlichen Geweben und umgekehrt den Zugang mütterlicher Estrogene zum Fötus und agiert

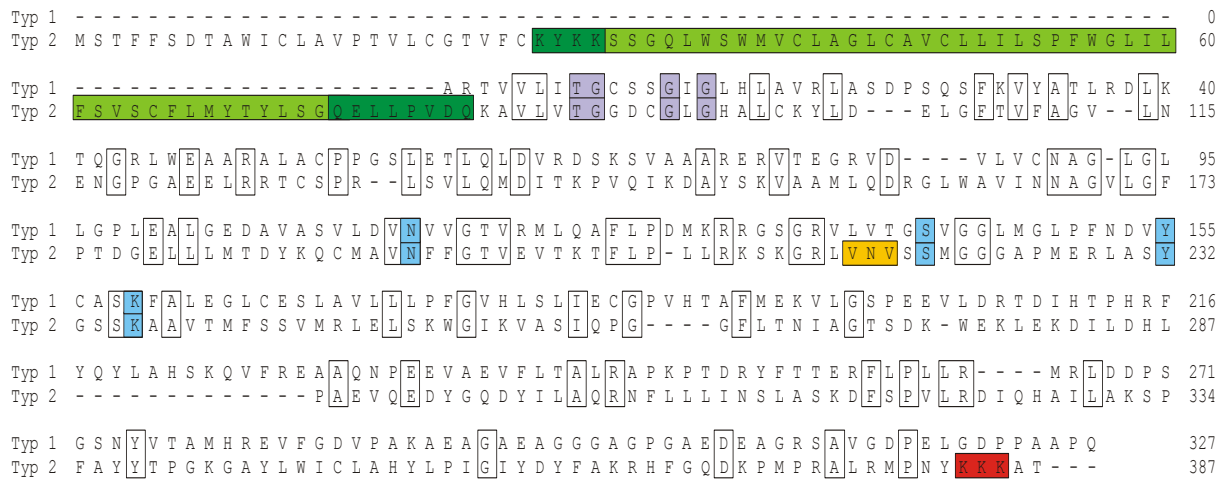


Abbildung 1.7: Aminosäuresequenzen der 17β HSD Typ 1 und Typ 2; **grün:** N-terminales Typ II Ankermotiv, **rot:** C-terminales „ER-retention“ Motiv, **blau:** katalytische Tetrade der SDR Dehydrogenasen, **violett:** Cofaktorbindemotiv der SDR Dehydrogenasen

1.3.1 Inhibitoren

1984 wurden die ersten Inhibitoren für die 17βHSD2 von Blomquist et al. (Blomquist *et al.*, 1984; Blomquist *et al.*, 1985) beschrieben. Dabei handelte es sich um natürliche Steroide, synthetische Steroid-Derivate und eine Reihe von nicht-steroidalen Agonisten und Antagonisten des Estrogen-Rezeptors. Für die 17βHSD2 wurde ähnlich wie für Typ 1 eine starke Inhibition durch die eigenen Substrate festgestellt werden. Die Umsetzung von Testosteron wurde durch 17βEstradiol, 5α-DHT, 5β-DHT und 20α.DHP zu 90-100% inhibiert.

Beim Vergleich der K_i -Werte (0,3-47μM) der getesteten Inhibitoren, heben sich Ethynylestradiol (0,3μM), Estradiol (0,8μM) und Danazol (0,6μM) besonders hervor. Ethynylestradiol und Estradiol sind jedoch Agonisten für den Estrogen-Rezeptor während Danazol androgene Eigenschaften ausweist.

17βDihydroequilin, 2Hydroxyestradiol und Coumestrol können bei einer Konzentration von 10μM die Oxidation von Estradiol durch die 17βHSD2 um 88, 67 bzw. 50% hemmen (Puranen *et al.*, 1999).

Poirier et al. konnte eine Reihe von Substanzen mit einem Spiro-γ-Lactone an der Position 17 von Estradiol synthetisieren, die sich als potente Inhibitoren herausgestellt haben. Einige dieser steroidalen Spirolactone weisen außerdem keine androgene oder estrogen Wirkung auf (Bydal *et al.*, 2004; Poirier *et al.*, 2001; Sam *et al.*, 2000; Sam *et al.*, 1995; Tremblay *et al.*, 1999).

1.4 Beteiligung der 17 β -HSD 1 und 2 an der Pathogenese verschiedener Krankheiten

In Deutschland erkranken jährlich rund 400.000 Menschen an Krebs. Die Abbildung 1.8 gibt dabei einen Überblick über die prozentuale Verteilung der Krebsneuerkrankungen auf die verschiedenen Krebstypen bei Männern und Frauen. Es wird deutlich, dass Prostata- und Brustkrebs (22,3% bzw. 26,8%) die häufigsten auftretenden Krebsarten sind.

Epidemiologische und endokrine Hinweise machen deutlich, dass Estrogene eine Schlüsselrolle in der Ätiologie von Brust-Krebs einnehmen, während Androgene an der Wachstumskontrolle von normalen und malignen Prostata-Zellen beteiligt sind. Zusätzlich zu typischen Geweben, die durch Geschlechtshormone beeinflusst werden, spielen Estrogene und Androgene auch in nicht-steroidalen Geweben eine Rolle bei der Entstehung von Krebs, so z.B. bei Dickdarmkrebs.

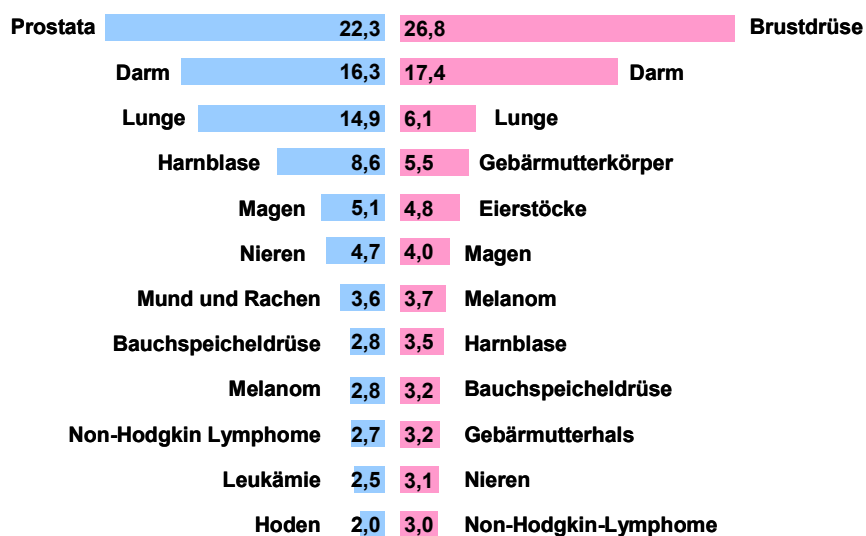


Abbildung 1.8:

Prozentualer Anteil an der geschätzten Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2002; Gesamtzahl: Männer 218.250, Frauen 206.000 (Gesellschaft *et al.*, 2006)

1.4.1 Brustkrebs

Sowohl 17 β HSD Typ 1 als auch Typ 2 werden in gesundem Brustgewebe exprimiert, die oxidative Aktivität, folglich die Bildung von Estron aus Estradiol, überwiegt hier die reduktive Aktivität in den Brustepithelzellen um bis zu Faktor 50 (Miettinen *et al.*, 1999; Soderqvist *et al.*, 1998).

In malignen Brustkrebszellen dominiert die Expression und Aktivität der 17 β HSD1 (Miettinen *et al.*, 1996; Sasano *et al.*, 1996; Speirs *et al.*, 1998). Das Verhältnis Estradiol/Estron und die Expression von 17 β HSD 1 nicht aber die von Sulfatase und Aromatase sind in Brustkrebszellen postmenopausaler Frauen höher als bei prämenopausalen Frauen (Miyoshi *et al.*, 2001). Dies läßt

den Schluß zu, dass nur 17 β HSD1 alleine für die intrazelluläre Akkumulation von Estradiol in Brustkrebszellen verantwortlich ist.

Drei verschiedene Wirkmechanismen für die Karzinogenität von Estrogenen werden in Betracht gezogen sind aber nach wie vor noch nicht endgültig bewiesen (Russo *et al.*, 2003).

Estrogene können über eine Rezeptor-vermittelte Aktivität als Tumor-Promotoren wirken, indem die Zellproliferation stimuliert wird, so dass eine Anhäufung von DNA-Schäden zur Krebsentstehung beitragen kann. Auch eine Cytochrom-P450-vermittelte metabolische Wirkung wird erwogen. Die Cytochrom P450-Isoenzyme können Estrogene zu Catechol-Estrogenen hydroxylieren, die weiter zu Semichinonen bzw. Chinonen oxidiert werden. Diese Elektrophile können kovalente Bindungen mit der DNA eingehen, die direkt die Mutationsrate erhöhen oder indirekt über das DNA-Reparatur-System wirken. Aber auch die direkte Induktion von Aneuploidie durch Estrogene kommt in Betracht.

1.4.2 Prostatakrebs

Sowohl in benignen als auch malignen Prostata-Zellen wird die Wirkung der Androgene durch zwei Enzyme beeinflusst, 17 β HSD2 und 5 α Reduktase, allerdings ist in bösartigen Prostatazellen die Expression von 17 β HSD2 geringer (Elo *et al.*, 1996). Bei Untersuchungen mit LNCaP Zellen, einer Prostatakrebszelllinie, konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit DHT zu einer Bildung von Interleukin 6 führt, das dosisabhängig als autokriner Wachstumsfaktor fungiert (Okamoto *et al.*, 1997). Eine verringerte Aktivität der 17 β HSD2 hat folglich eine verringerte Inaktivierung der Androgene DHT und T zur Folge und verschiebt das Gleichgewicht in Richtung Zellproliferation. Die Oxidation der Androgene DHT und T zu ihren weniger aktiven 17-Keto-Formen A und stellt demnach eine Schutzfunktion durch die 17 β HSD2 dar (Vihko *et al.*, 2002; Vihko *et al.*, 2004). In bösartigen Prostatazellen konnte die verringerte 17 β HSD2-Aktivität auf diverse Deletionen in drei bevorzugten Regionen des Chromosoms 16, die das Gen der 17 β HSD2 beinhalten, zurückgeführt werden (Elo *et al.*, 1997; Elo *et al.*, 1999).

1.4.3 Dickdarmkrebs

Epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass bei Frauen unter 55 ein höheres Dickdarmkrebsrisiko besteht als bei gleichaltrigen Männern. Nach der Menopause kehrt sich dieses Verhältnis um (McMichael und Potter, 1982). Daraus kann geschlossen werden, dass der Einfluß von Estradiol zu einem häufigeren Auftreten von Dickdarmkrebs führt. Gleichzeitig senkt die Behandlung mit Hormonersatz-Präparaten das Krebsrisiko, dabei muß betont werden,

dass diese Präparate Estron, nicht aber Estradiol enthalten (Calle *et al.*, 1995). Übereinstimmend dazu konnte gezeigt werden, dass die oxidative Aktivität der 17 β HSD in Dickdarntumoren deutlich verringert ist (English *et al.*, 2000; English *et al.*, 1999). Dies könnte auf die verminderte Expressionsrate der 17 β HSD2 in Dickdarmkrebszellen verglichen mit normalen Darmzellen zurückzuführen sein. 17 β HSD1 ist weder in normalem noch in kanzerösem Dün- und Dickdarmgewebe nachzuweisen (Oduwole *et al.*, 2002; Oduwole *et al.*, 2003). Die natürliche Funktion der 17 β HSD2 könnte demnach darin bestehen, Teil eines Schutzmechanismus zu sein, der den Darm vor von außen zugeführten oder bakteriell synthetisierten Steroiden zu schützen, die 17 β HSD2 ist folglich mit der einwandfreien Funktion des Darms verbunden.

1.5 NMR-Spektroskopie im pharmazeutischen Screening

In der pharmazeutischen Industrie werden neuartige Substanzen meist mit Hilfe der Hochdurchsatz-Screening-Methoden (HTS high-throughput-screening-method) auf ihre Affinität getestet. Solche Methoden erfordern eine zeit- und kostenintensive Entwicklung geeigneter Assays. Beim fokussierten Screening werden die als konkurrierend geltenden Ansätze der kombinatorischen Chemie mit HTS auf der einen Seite und dem rationalen Drug Design andererseits in einem Hybridansatz kombiniert. Die HTS-Methode ist auf eine hohe Diversität und die Entwicklung einer Bibliothek verschiedener bindender Liganden ausgelegt, während ein rein rationaler Ansatz mit Hilfe der 3-D-Struktur einen passenden Liganden berechnen soll.

Wurde ein Erfolg versprechender Kandidat gefunden, muss die Leitstruktur neben einer hohen Bindungsaffinität weitere Voraussetzungen erfüllen. Dabei spielen die Verteilung in lipo- bzw. hydrophilem Milieu, die Möglichkeit zur Herstellung im großen Maßstab (Upscaling) und vor allem die zu erreichende Bioverfügbarkeit (Konzentration des Wirkstoffes am Wirkort) eine Rolle. In der Pharmakokinetik werden die die Bioverfügbarkeit beeinflussenden Faktoren unter dem Akronym ADME (adsorption, distribution, metabolism, excretion), also die Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung zusammengefasst. Diese Faktoren können nur durch die chemische Modifikation der Leitstruktur erreicht werden, die somit die zentrale Rolle darstellt.

Für die Optimierung der Leitstruktur sind demnach Informationen über das Bindungssepiotop des Liganden von großer Bedeutung. Nicht direkt an der Bindung beteiligte Ligandengruppen können dann selektiv modifiziert oder entfernt werden

Die Verwendung der NMR-Spektroskopie als Screening Methode hat in den letzten Jahren auch in der pharmazeutischen Industrie an Bedeutung gewonnen (Gunther *et al.*, 2004). NMR-basierte Screening Verfahren dauern ungleich länger als HTS-Verfahren, liefern aber auch detailliertere Ergebnisse. Im Wesentlichen existieren zwei Ansätze: Der erste basiert auf Effekten, die bei der Protein-Liganden-Wechselwirkung am Liganden zu beobachten sind, und beruht damit zumeist auf NOE-Effekten (z.B. Saturation Transfer Difference STD) der zweite konzentriert sich auf die Änderung der chemischen Verschiebung von Protein-Signalen aufgrund der Ligandenbindung, structure-activity-relationship SAR by NMR (Hajduk *et al.*, 1997; Shuker *et al.*, 1996).

NOE-Effekte ändern sich drastisch bei der Bindung von Liganden an Rezeptoren, was zur Beobachtung sog. Transfer-NOE-Effekte (trNOE) führt. Kleine Moleküle haben kurze Korrelationszeiten τ_c und als Konsequenz daraus positive oder schwach negative NOEs. Große Moleküle hingegen liefern stark negative NOEs. Wenn ein kleines Molekül (Ligand) an ein

großes Molekül (Rezeptor) bindet, verhält es sich als Teil des großen Moleküls und übernimmt dessen NOE Verhalten, d.h. es zeigt stark negative NOEs, die sog trNOEs.

Dabei muß der Ligand eine reversible Wechselwirkung mit dem Rezeptor eingehen und ein hinreichender Austausch mit dem ungebundenen Zustand stattfinden. Ist die k_{off} -Rate zu groß, bindet der Ligand zu schwach und es können nur die Resonanzen des freien Liganden detektiert werden. Ist k_{off} hingegen sehr klein, wird die Bindungsstelle irreversibel blockiert und man beobachtet nur noch die gelösten Liganden. Der gebundene Ligand kann in der Regel wegen seiner großen Linienbreite nicht vermessen werden. Diese Methode gibt nicht nur Auskunft darüber, ob die Substanz bindungsaktiv ist, sondern sie kann unter geeigneten Bedingungen sogar die 3D-Struktur des Liganden im gebundenen Zustand liefern. Es besteht keine obere Molekulargewichtsgrenze, sondern die Signifikanz der Methode steigt mit der Proteingröße sogar an.

STD-Experimente beruhen auf dem Transfer der Sättigung vom Protein zum gebundenen Liganden. Nicht bindende Moleküle werden nicht angeregt und sind im Spektrum daher nicht sichtbar. Aufgrund der großen Linienbreite der Proteinsignale ist eine selektive Sättigung durch ein sog. „on-resonance“-Experiment außerhalb des spektralen Fensters der kleinen Ligandenmoleküle möglich. Eine selektive Sättigung einiger Protonenresonanzen im Protein führt aufgrund der effizienten Spindiffusion in Makromolekülen innerhalb von 50-200 ms zu einer Sättigung aller Protonenresonanzen im Protein. Durch intermolekulare Spindiffusion wird diese Sättigung auf gebundene Liganden übertragen, so dass sie ebenfalls wie das Protein negative NOEs (transferNOEs) aufweisen. Die Effizienz der Sättigungsübertragung hängt von der Austauschrate und der Bindungsaffinität gebundener Liganden ab.

Da eine Abnahme der Signalintensität nur schlecht beobachtet werden kann, wird in einem zweiten Experiment die Einstrahlfrequenz weit außerhalb des spektralen Bereichs gewählt („off-resonance“) und ein Differenzspektrum gebildet. Das resultierende Spektrum enthält nur Signale, die durch den Sättigungstransfer abgeschwächt wurden. Diese Subtraktion wird zur Vermeidung von Subtraktionsartefakten durch einen Phasen Zyklus erreicht.

Liegt der Ligand in hohem Überschuss vor und ist die Dissoziationsgeschwindigkeit hoch, so kann während der Sättigungszeit eine Vielzahl von Ligandenmolekülen gesättigt werden. Da die Zeitkonstante der T1/T2-Relaxation für kleine Moleküle hoch ist, nimmt der Anteil gesättigter Liganden in der Lösung zu, was eine Verstärkung des Effektes und eine geringere erforderliche Proteinkonzentration zur Folge hat.

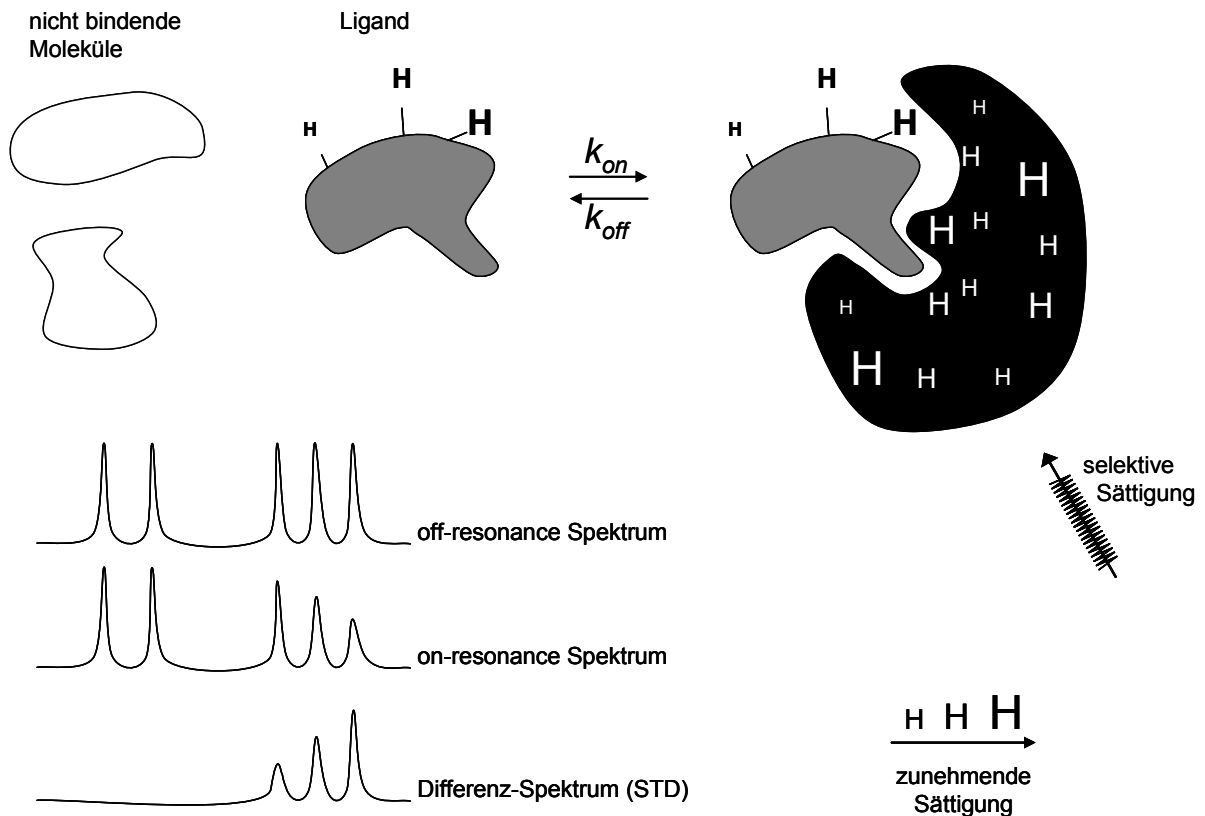


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Prinzipien der STD-NMR-Spektroskopie. Es liegt eine Mischung bindender und nicht bindender Moleküle mit einem Protein vor. Durch die Einstrahlung des *on-resonance* Pulses auf die Protonenresonanzen wird das Protein gesättigt, die Sättigung überträgt sich durch intermolekulare Spindiffusion auf den gebundenen Liganden, der Ligand dissoziiert und wird in der freien Lösung detektiert. Durch die Sättigung treten die Resonanzen im *on-resonance* Spektrum mit verringerter Intensität auf. Beim *off-resonance* Spektrum wird weit außerhalb des spektralen Fensters eingestrahlt, so dass das resultierende Spektrum einem „normalen“ NMR-Spektrum entspricht. Das Differenzspektrum enthält nur Signale, die durch den Sättigungstransfer abgeschwächt wurden. Die Intensität der Signale lässt Rückschlüsse auf die Nähe der Ligandenprotonen zum Protein zu (*epitope mapping*). nach (Mayer und Meyer, 2001)

Das WaterLOGSY (water-ligand observed via gradient spectroscopy) ist ein Experiment das auf der Nutzung des Wassersignals basiert. Das an den Protein-Ligand-Komplex gebundene Wasser wird genutzt um Magnetisierung vom Wasser über den Protein-Ligand-Komplex zum freien Liganden zu übertragen. Dabei ist einerseits Wasser, das an Wasserstoffbrücken zwischen dem Ligand und dem Protein beteiligt ist, und andererseits Hydratwasser der Proteinoberfläche in den Magnetisierungstransfer involviert. Die Verweilzeit des Wassers in der Bindungstasche beträgt zwischen einigen ns bis zu einigen Hundert μ s und ist somit gerade lange genug, um NOE's auszubilden und ausreichend kurz, um die Ausbildung der chemischen Verschiebung zu verhindern.

Ein Ligand, der an das Protein bindet, erfährt die Rotationskorrelationszeit des Proteins und zeigt daher negative NOE's für die Übertragung der Magnetisierung von Wassermolekülen, die an die Oberfläche der Protein-Bindungstasche gebunden sind. Im Gegensatz dazu erfahren Moleküle, die nicht an das Protein sondern nur an freies Wasser binden, deutlich schnellere Rotationskorrelationszeiten und zeigen daher positive NOE's für die Wechselwirkung mit Wasser. Das Prinzip dieser Methode ist in Abbildung 1.10 beschrieben. Teile eines gebundenen Liganden zeigen ebenfalls positive NOE's wie ungebundene Moleküle, sofern der direkte Zugang zum Lösungsmittel die Spin-Diffusion vom Protein überwiegt (Ludwig *et al.*, 2007).

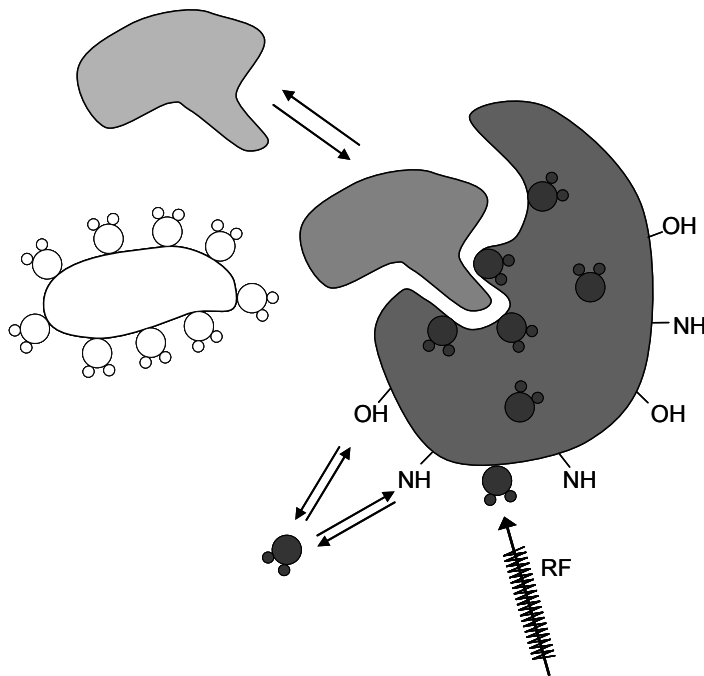


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der Grundlagen des ePHOGSY-NMR-Experiments. Selektive Anregung des Wassers führt zu einem NOESY Transfer mit negativen NOE's für Liganden, die an das Protein gebunden sind (grau) und positiven NOE's für ungebundene Moleküle. Der Magnetisierungstransfer wird vermittelt durch Wassermoleküle, die entweder direkt in der Liganden-Bindungstasche oder an der Proteinoberfläche binden oder durch Protonenaustausch zwischen Wasser und Protonen an der Proteinoberfläche, nach (Dalvit *et al.*, 2001)

1.6 Zielsetzung

Das humane Estrogen, 17β Estradiol, stellt einen potenten Stimulator von hormon-abhängigem Brustkrebs dar. Die 17β HSD1, mit ihrer Estrogen-Spezifität und der Bevorzugung der reduktiven Reaktion von Estron zu Estradiol, ist damit maßgeblich an der Estradiol-Biosynthese in Gonaden und peripheren Geweben beteiligt. Die 17β HSD1 bietet damit einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung von Inhibitoren der Estrogen-Produktion und des Tumor-Wachstums.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst versucht werden, unter Verwendung verschiedener bakterieller Expressionssysteme die 17β HSD1 heterolog und in löslicher Form in *E. coli* zu exprimieren. Anschließend sollte ein Isolationsverfahren entwickelt werden, das die Darstellung von homogenem Protein mit möglichst hohen Ausbeuten für weitere funktionelle Untersuchungen erlaubt.

Die Analyse der Bindungseigenschaften der 17β HSD1 sollte einerseits durch ligandenbasierte NMR-Spektroskopie andererseits durch Docking erfolgen. Mit Hilfe der STD-NMR-Methode (saturation transfer difference) ist es nicht nur möglich, festzustellen, ob ein Ligand an das Zielprotein bindet, sondern zusätzlich detaillierte Aussagen über das Bindungsepitop zu machen. Ergänzend dazu zeigen ePHOGSY-NMR-Ergebnisse die spezifische Bindung der untersuchten Liganden an des Zielprotein. Die für die Bindung verschiedener Liganden der 17β HSD1 aus diesen Messungen erhaltenen Daten sollten zusätzlich mit STD-NMR- und ePHOGSY-Ergebnissen der 17β HSD2 verglichen und anschließend mit den Ergebnissen des Dockings derselben Liganden in die 17β HSD1-Kristallstruktur gegenübergestellt werden. Mittels dieser Ergebnisse sollten die Bindungsepitope der Liganden charakterisiert und die Liganden klassifiziert werden.

Aufgrund des hohen Molekulargewichtes der 17β HSD1 sind NMR-spektroskopische Untersuchungen des Proteins schwierig und erfordern die Anreicherung mit stabilen Isotopen. Aus diesem Grund sollte versucht werden, die Expressions- und Isolationsbedingungen dahingehend zu optimieren, dass eine Anreicherung mit stabilen Isotopen sowohl aller Aminosäuren als auch selektiv eines Aminosäuretyps möglich ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Primer

Nummer	Name	Sequenz
1	HSD Bgl II	CCA GAT CTG GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGT GCC CGC ACC GTG
2	HSD His up	GGC AGA TCT TCT AGA CAC CAT CAC CAT CAC CAT GCC CGC ACC GTG GTG CTC ATC
3	HSD Hydr. up	GGC AGA TCT GAT AGC CCG GGC AGC GGC GCC CGC ACC GTG GTG CTC ATC
4	HSD Hydro low	GCC AAG CTT TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG CTG CGG TGC GGC CGG AGG ATC
5	HSD up	GCC AGA TCT GCC CGC ACC GTG GTG CTC ATC
6	HSD low	GCC AAG CTT TTA CTG CGG GGC GGC CGG AGG
7	HSD Nde up	GC CAT ATG GCC CGC ACC GTG GTG CTC ATC
8	HSDt1 Xho low	GC CTC GAG TTA CTG CGG GGC GGC CGG AGG ATC GCC GAG CTC
9	MalE up	GGT CGT CAG ACT GTC GAT GAA GCC
10	HSD kurz Hind His low	GC AAG CTT TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG GAA CAC TTC CCG GTG CAT GGC GGT
11	HSD Strep Xho low	GC CTC GAG TTA CTT TTC AAA CTG CGG ATG GCT CCA CTG CGG GGC GGC CGG AGG ATC
12	T7 Promotor up	TAATACGACTCACTATA
13	T7 Terminator low	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Plasmide

pBUF1	Dr. F. Bernhard
pBUF1bl	Dr. F. Bernhard
pET30G	Dr. F. Bernhard
pET43.1	Novagen
pIVEXMCS	Roche
pQE60	Qiagen

Enzyme

T4 DNA Ligase	NEB
SAP, Alkalische Phosphatase aus Shrimp	Promega
Vent Polymerase	NEB
Restriktionsendonuclease <i>Bgl</i> III	NEB
Restriktionsendonuclease <i>Bam</i> HI	NEB
Restriktionsendonuclease <i>Hind</i> III	NEB
Restriktionsendonuclease <i>Kpn</i> I	NEB
Restriktionsendonuclease <i>Nde</i> I	NEB
Restriktionsendonuclease <i>Xho</i> I	NEB
Thrombin	Amersham Biosciences

Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Nucleobond Midipräp Kit	Macherey & Nagel
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden

DNA-Längenstandard "smart ladder" (Eurogentec)

Größe des DNA-Fragments in bp	ng DNA/Bande	Größe des DNA-Fragments in bp	ng DNA/Bande
10 000	100	2 000	20
8 000	80	1 500	15
6 000	60	1 000	100
5 000	50	800	80
4 000	40	600	60
3 000	30	400	40
2 500	25	200	20

Transformationspuffer TF-B₁

RbCl ₂	100 mM
MnCl ₂	50 mM
CaCl ₂	10 mM
Kaliumacetat	30 mM
Glycerin	15 % (v/v)
pH-Wert mit Essigsäure auf 5,8 einstellen	

Transformationspuffer TF-B₂

MOPS	10 mM
RbCl ₂	10 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerin	15 % (v/v)
pH-Wert mit Essigsäure auf 5,8 einstellen	

DB-Salt-Lösung

(NH ₄)H ₂ PO ₄	5,22 mM
MgSO ₄	0,049 mM
KCl	0,161 mM
Glycerin	50%v/v

LB-Medium

LB-Medium	25 g/l
pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen, mit demineralisiertem Wasser auf 1 l auffüllen und autoklavieren	

LB-Agarplatten

LB-Medium	25 g/l
Agar-Agar	15 g/l
pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen, mit demineralisiertem Wasser auf 1 l auffüllen und autoklavieren. Das Medium wird in einem auf 50°C vorgeheizten Wasserbad auf 50°C abgekühlt, mit 100µg/ml sterilfiltriertem Ampicillin versetzt und die Platten gegossen.	

5x M9-Minimalmedium

Na ₂ HPO ₄	30 g/l
KH ₂ PO ₄	15 g/l
NaCl	2,5 g/l
NH ₄ Cl	5 g/l
pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen, mit H ₂ O auf 1 l auffüllen und autoklavieren	

²H und ¹⁵N-Minimalmedium für die Isotopenanreicherung

Na ₂ HPO ₄	6 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
NaCl	0,5 g/l
¹⁵ NH ₄ Cl	1 g/l
1 M MgSO ₄ in D ₂ O	1 ml/l
CaCl ₂	111 mg/l
1 M FeCl ₃ in D ₂ O	100 µl/l
Thiamin	2 mg/l
Biotin	5 mg/l
100 mg/ml Ampicillin in D ₂ O (sterilfiltriert)	1 ml/l
Glucose	1 g/l
Glycerin (wasserfrei)	2,5 ml/l

Minimalmedium für die Anreicherung mit ¹⁵N-Lysin

Na ₂ HPO ₄	6 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
NaCl	0,5 g/l
NH ₄ Cl	1 g/l
1 M MgSO ₄ in H ₂ O	1ml/l
CaCl ₂	111mg/l
1 M FeCl ₃ in H ₂ O	100µl/l
Thiamin	2 mg/l
Biotin	5 mg/l
20% Glucose in H ₂ O	5ml/l
50%Glycerin in H ₂ O	5ml/l
¹⁵ N-Lysin	75 mg
100mg/ml Ampicillin in H ₂ O sterilfiltriert	1ml/l

Resuspendierungspuffer P1

Tris/HCl	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml

Lyse-Puffer P2

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)

Neutralisationspuffer N3

Kaliumacetat	3 M
pH 5,5	

6 x Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylen Cyanol	0,25 % (w/v)
Glycerin	30 % (v/v)
EDTA	50 mM

10 x TAE-Puffer

Tris/Acetat	400 mM
EDTA	10 mM
pH 7,5	

Puffer Q1

Na ₂ HPO ₄	50 mM
DTT	1 mM
EDTA	1 mM
Glycerin	20 %
pH = 7,5	

Puffer Q2

Na ₂ HPO ₄	50 mM
NaCl	1 M
DTT	1 mM
EDTA	1 mM
Glycerin	20 %
pH = 7,5	

Puffer A1

Na ₂ HPO ₄	50 mM
NaCl	200mM
DTT	0,2 mM
EDTA	1 mM
Glycerin	10 %
pH = 7,5	

Puffer A2

Na ₂ HPO ₄	50 mM
NaCl	200 mM
DTT	0,2 mM
EDTA	1 mM
Glycerin	10 %
Maltose	10 mM
pH = 7,5	

Lösung A3

SDS	0,1%
-----	------

Puffer D1

Na ₂ HPO ₄	50 mM
NaCl	200 mM
pH = 7,5	

Puffer D2

Na ₂ HPO ₄	50 mM
NaCl	200 mM
Maltose	10 mM
pH = 7,5	

Puffer GF

Na ₂ HPO ₄	50 mM
NaCl	100 mM
DTT	1 mM
EDTA	1 mM
pH = 7,5	

NiNTA-SpinColumn Lyse-Puffer

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
pH 8,0	

NiNTA-SpinColumn Wasch-Puffer

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM
pH 8,0	

NiNTA-SpinColumn Elutions-Puffer

NaH ₂ PO ₄	50 mM	
NaCl	300 mM	
Imidazol	pH 8,0	250 mM

Puffer N1

Na ₂ HPO ₄	pH 8,0	50 mM
NaCl		200 mM

Puffer N2

Na ₂ HPO ₄	50 mM
NaCl	200 mM
Imidazol	300 mM
pH 8,0	

Stripping-Buffer

Tris	50 mM
NaCl	500 mM
EDTA	100 mM

NiSO₄-Lösung

NiSO ₄	50 mM
-------------------	-------

Puffer TEV 1

Tris-HCl	50 mM
pH 8,0	

Puffer TEV 2

Tris-HCl	50 mM
Imidazol	300 mM
pH 8,0	

Lagerpuffer TEV

Glycerin	50%
pH 8,0	

1 x TEV-Restriktionspuffer

NaH ₂ PO ₄	50 mM
Glycerin	10 %
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM
DTT	0,2 mM
pH 7,5	

Acrylamid/ N,N'-Bisacrylamid –Lösung

Acrylamid	30% (v/v)
N,N'-Methylen-Bisacrylamid	0,5% (v/v)

Stammlösung für 12%ige Trenngele

Wasser	165 ml
Acrylamid/ N,N'-Bisacrylamid –Lösung	200 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	125 ml
10 % (w/v) SDS	5 ml

Stammlösung für 17,5%ige Trenngele

87 % Glycerin (w/v)	47,5 ml
Acrylamid/ N,N'-Bisacrylamid –Lösung	275 ml
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	125 ml
10 % (w/v) SDS	5 ml

Stammlösung für 3,9%ige Sammelgele

Wasser	130 ml
Acrylamid/ N,N'-Bisacrylamid -Lösung	32,5 ml
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	62,5 ml
1 % (w/v) SDS	25 ml

5 x reduzierender SDS-Probenpuffer

Wasser	25 ml
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	6,25 ml
Glycerin	5 ml
10 % (w/v) SDS	10 ml
2 β -Mercaptoethanol	2,5 ml
0,05 % (w/v) Bromphenolblau	1,25 ml

10 x Elektrophoresepuffer

Tris	30 g/l
Glycin	144 g/l
SDS	10 g/l

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue	0,4 g
Ethanol	50 ml
70% Perchlorsäure	34 ml
Wasser	800 ml

Blot-Puffer

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 %

PBST-Puffer

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
Tween 20	0,05%

Blockierlösung

PBST	
Non fatty dry milk	1%

ECL-Lösung 1

Wasser	9 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,5	1 ml
Luminol-Lösung, 250 mM in H ₂ O	100 µl
Coumarin-Lösung, 90 mM in DMSO	45 µl

ECL-Lösung 2

Wasser	9 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,5	1 ml
Wasserstoffperoxid, 30%	6 µl

Chromatographiematerialien

Ni-NTA superflow	Qiagen
Ni-NTA-SpinColumns	Qiagen
Chelating Sepharose™ Fast Flow	Amersham biosciences
HiTrap Chelating Column	Amersham biosciences
Q-Sepharose	Amersham biosciences
Blue Sepharose	Amersham biosciences
Superdex 75/200	Amersham biosciences
Amylose	New England Biolabs

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers mit Hilfe folgender Kits:

Für analytische Zwecke und zur Isolation von DNA für Sequenzierreaktionen wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet. Bei einer hohen Kopienzahl des Plasmids können aus 5 ml Übernachtskultur bis zu 20 µg DNA isoliert werden.

Die Isolation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab erfolgte hingegen über den Midiprep-Kit NUCLEOBOND[®] von Macherey-Nagel (ca. 100 µg DNA aus 50 ml Übernachtskultur).

Im Gegensatz zur Empfehlung des Herstellers wird die DNA im letzten Schritt mit sterilem Millipore-Wasser eluiert bzw. resuspendiert. Die Verwendung von Puffer kann sich bei der Weiterverwendung der DNA für Klonierungszwecke wie Restriktionsverdau aber vor allem bei einer Sequenzierreaktion störend auswirken. Die DNA wurde im Anschluß bei -20°C gelagert.

2.2.1.2 Elektrophoretische DNA-Analyse

Die Auftrennung doppelsträngiger DNA zu analytischen und präparativen Zwecken erfolgte durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989). Die Agarosekonzentration richtete sich nach der Größe der zu trennenden und isolierenden DNA-Fragmente. Die Konzentrationen betragen 1% für Fragmente im Bereich von 500 bp bis 5000 bp und 2% für Fragmente von 1000 bp bis 10000 bp. Der noch warmen Agaroselösung wurde Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Nach Zugabe des entsprechenden Volumens 6 fachen Probenpuffers wurde je nach Größe der Geltaschen 5-60 µl DNA-Lösung auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V für ca. 40 min. Auf dem Transilluminator konnte die im Gel enthaltene DNA über die Fluoreszenz des intercalierenden Ethidiumbromids bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ visualisiert werden.

Als DNA-Längenstandard wurde zusätzlich der DNA-Marker Smart Ladder auf das Gel aufgetragen, der die Größenbestimmung der DNA-Fragmente sowie eine Abschätzung der DNA-Konzentration durch Intensitätsvergleich mit den Banden des DNA-Längenstandards ermöglichte.

2.2.1.3 DNA-Gelelution

Zur Extraktion der DNA aus dem Agarose Gel kam das Qiagen Gel-Extraction[®]-Kit zum Einsatz. Dazu wurde die DNA Bande der gewünschten Größe unter UV-Lichtbestrahlung mit einem Skalpell aus dem Agarosegel isoliert und in tarierte Eppendorf-Cups überführt. Die anschließende Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.1.4 Präparative Aufreinigung der DNA

Um DNA aus Lösungen, die zusätzlich Enzyme, Salze oder kleinere DNA-Fragmente (< 50 bp) enthalten, zu isolieren und umzupuffern, wird der QIAquick PCR-Purification Kits nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.1.5 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonucleasen bakteriellen Ursprungs. Sie spalten die Phosphodiesterbindungen beider Stränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch und unterscheiden sich in der Erkennungssequenz, ihrer Spaltstelle und ihrem Ursprungsorganismus. TypII Restriktionsendonucleasen haben eine kurze, 4-8 Basen lange, meist palindromische Erkennungssequenz und spalten die DNA innerhalb der Erkennungsstelle.

Für einen präparativen Verdau (50µl Gesamtvolumen) wurden etwa 10-20µg Plasmid-DNA mit 20 U Restriktionsendonuklease versetzt, wobei die vom Hersteller gelieferten 10X Puffer verwendet wurden.

Für einen analytischen Verdau wurden etwa 0,5 µg DNA mit 5 U Restriktionsendonuklease versetzt.

Reaktionen mit zwei Restriktionsenzymen wurden unter Reaktions- und Pufferbedingungen durchgeführt, die eine möglichst optimale Aktivität beider Enzyme gewährleisten. Bei Inkompatibilität der Enzyme wurde der Verdau sequentiell durchgeführt.

Der Verdau erfolgte 1,5 h bei 37°C. Anschließend wurden die Ansätze zur Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme für 20 min bei 65°C inkubiert.

2.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion, „*polymerase-chain-reaction*“ PCR, (Mullis und Faloona, 1987) fand bei der Einführung von Restriktionsschnittstellen oder DNA-Abschnitten, die für eine bestimmten Aminosäuresequenzen codieren (*tags*) Verwendung.

Für die PCR wurden mehrere 100 µl Ansätze verwendet, die zur Optimierung der Reaktion jeweils verschiedene Mg²⁺- und Formamid Konzentrationen enthielten. Die Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze ist in Tabelle 2.1 dargestellt

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der PCR-Ansätze, Angaben in µl

	I	II	III	IV	V
10xPuffer	10	10	10	10	10
dNTP's (10 mM pro dNTP)	3	3	3	3	3
MgSO ₄ (100 mM)	0	2	2	4	4
Formamid	0	5	10	5	10
Primer1 (100 pMol/µl)	1	1	1	1	1
Primer2 (100 pMol/µl)	1	1	1	1	1
Template (50ng/µl)	1	1	1	1	1
Vent	1	1	1	1	1
H ₂ O	83	76	71	74	69

Um unspezifische Produktamplifikation zu vermeiden, wurden die Proben vor dem 1. Zyklus der PCR-Reaktion im PCR-Gerät für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend in einem sog. "hot-start" die Vent-Polymerase zugefügt.

Die Amplifikation der Templat-DNA erfolgte in 30 sukzessiven Zyklen, die aus folgenden Schritten bestanden:

Tabelle 2.2: Standardtemperaturprogramm für die PCR mit der Vent-Polymerase

Schritt	Reaktion	Zeit [s]	Temperatur [°C]
1	Denaturierung doppelsträngiger DNA	60	95
2	Anlagerung (Annealing der Primer)	30	47
3	Elongation (DNA-Synthese)	1 min pro 1000 bp	72

Im Anschluß an den letzten Zyklus wurde der Ansatz für weitere 5 min auf 72°C erhitzt, um unvollständig synthetisierte DNA-Fragmente aufzufüllen.

Nach der Analyse der Reaktion über eine Agarosegelelektrophorese wurde das amplifizierte DNA-Fragment mittels des QIAquick PCR-Purification Kits gereinigt.

2.2.1.7 DNA-Dephosphorylierung

Zur Erhöhung der Klonierungseffizienz wurde die linearisierte Vektor-DNA vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps (SAP) behandelt. Dieses Enzym katalysiert die Dephosphorylierung der DNA am 5'-Ende. Da die DNA-Ligase zur Verknüpfung von DNA-Enden eine endständige 5'-Phosphatgruppe benötigt, verhindert die Dephosphorylierung der Vektor-DNA eine intramolekulare Religation des Vektors (Sambrook *et al.*, 1989).

Für die Reaktion mit alkalischer Phosphatase wurden 2-4µg der restringierten Vektor-DNA mit 10xSAP-Restriktionspuffer (50 mM Tris/HCL, 10 mM MgCl₂, pH 9,0) und 2 U alkalischer Phosphatase versetzt und bei 37°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase hitzeinaktiviert (15 min, 65°C).

2.2.1.8 Ligation

Die für die Synthese neuer Vektorkonstrukte verwendete T4 DNA-Ligase katalysiert die kovalente Verknüpfung von Phosphodiesterbindungen zwischen der freien 5'-Phosphatgruppe und der Hydroxylgruppe des Zuckers am 3'-Ende von DNA-Strängen. Das Enzym kann sowohl kohäsive als auch glatte Enden verknüpfen.

Für die Ligation wurden 100 ng Vektor-DNA mit der zu insertierenden DNA in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:5 und mit 10xLigations-Puffer versetzt. Nach der Zugabe von 1µl Ligase werden die Ansätze über Nacht bei 16°C inkubiert. Zur Überprüfung des nichtrekombinanten Hintergrundes wurde ein DNA-Ansatz ohne Insert mitgeführt. Am folgenden Tag wurden jeweils 10 µl der einzelnen Ligationsansätze zur Transformation in *E. coli* XL1-Zellen eingesetzt.

2.2.1.9 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen dient dazu, Bakterien zur Aufnahme von DNA zu befähigen und erfolgt nach der CaCl₂-Methode von Hanahan (Hanahan, 1983).

100 ml LB-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und im Inkubationsschüttler bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Als die Zellen auf eine OD₆₀₀ von 0,5 herangewachsen waren, wurden sie 10 min bei 4°C/2800 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 15 ml TF-B₁-Puffer resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und danach erneut 10 min bei 4°C/2800 g abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 2 ml TF-B₂-Puffer aufgenommen, in Eppendorf-Cups zu 100 µl Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.1.10 Transformation

Ein 50 µl Aliquot der kompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut, und mit 1 µl der Plasmidlösung bzw. 10 µl des Ligationsansatzes versetzt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Um das Eindringen der Plasmid-DNA in die Bakterienzellen zu ermöglichen, wurde der Transformationsansatz für 45 s auf 42°C erhitzt. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden 400 µl SOC-Medium zugefügt und zur Expression der Antibiotikaresistenz für 1 h bei 37°C

geschüttelt. Zur Selektion der Transformanten wurden 100 µl des Ansatzes bzw. bei Ligationsansätzen das gesamte Volumen auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die mit dem entsprechenden Antibiotikum supplementiert waren, und über Nacht bei 37°C inkubiert (Cohen *et al.*, 1972).

2.2.1.11 Bakterienstammhaltung

Für eine Glycerin-Dauerkultur wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in ein geeignetes steriles Gefäß überführt und abzentrifugiert (10 min, 4°C, 3000 g). Das Pellet wurde in 250 µl DB-salt-Lösung resuspendiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Konstruktion der Expressionsplasmide

2.2.2.1 Präparation der Insert DNA

Die für die Konstruktion der neuen Expressionsplasmide erforderliche Insert-DNA wurde durch DNA-Amplifikation mittels PCR erzeugt. Die verwendeten Primer enthalten Basenüberhänge, um die genetische Information für neue Restriktionsschnittstellen, Affinitätstags oder einen hydrophilen Linker einzufügen. Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die verwendeten DNA-Templates, Primer und die daraus resultierenden Expressionsplasmide. Die sequenz der verwendeten Primer ist dem Anhang zu entnehmen.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden im präparativen Maßstab aus einem Agarosegel eluiert, um die amplifizierte DNA von der Template DNA und den Primern zu trennen. Dazu wurde der Qiagen Gel-Extraction Kit verwendet.

Anschließend wurden die gewonnenen PCR-Produkte einer Restriktion entsprechend Tabelle 2.4 unterzogen. Die Restriktionsansätze wurden für 1,5 h bei 37°C inkubiert.

Die restringierte DNA wurde anschließend mit Hilfe des Qiagen PCR-Purification Kit

Tabelle 2.3: Präparation der Insert DNA

Zu konstruierendes Expressionsplasmid	Template DNA	Primer 1	Primer 2	PCR-Produkt
pMalHSD a	pQEHS1	1	6	<i>17βhsd1a</i>
pMalHSD b	pQEHS1	2	6	<i>17βhsd1b</i>
pMalHSD c	pQEHS1	3	4	<i>17βhsd1c</i>
pET43NusAHSD	pQEHS1	5	6	<i>17βhsd1d</i>
pIVEXHSD1	pMal HSD3	7	11	<i>17βhsd1e</i>
pIVEX MBP HSD1	pMal HSD3	9	8	<i>17βhsd1f</i>
pQEHS1C43C	pQEHS1	5	10	<i>17βhsd1i</i>
pQEHS1C43N	pMalHSD1	2	10	<i>17βhsd1k</i>
pET G HSD	pQEHS1	5	6	<i>17βhsd1d</i>

Tabelle 2.4: Restriktion der Insert-DNA

PCR-Produkt	Restriktionsenzym 1	Restriktionsenzym 2	Puffer
<i>17βhsd1a</i>	<i>Bgl</i> III	<i>Hind</i> III	Puffer 2
<i>17βhsd1b</i>	<i>Bgl</i> III	<i>Hind</i> III	Puffer 2
<i>17βhsd1c</i>	<i>Bgl</i> III	<i>Hind</i> III	Puffer 2
<i>17βhsd1d</i>	<i>Bgl</i> III	<i>Hind</i> III	Puffer 2
<i>17βhsd1e</i>	<i>Nde</i> I	<i>Xho</i> I	Puffer 2
<i>17βhsd1f</i>	<i>Kpn</i> I	<i>Xho</i> I	Puffer 1BSA
<i>17βhsd1i</i>	<i>Bgl</i> III	<i>Hind</i> III	Puffer 2
<i>17βhsd1k</i>	<i>Bgl</i> III	<i>Hind</i> III	Puffer 2
<i>17βhsd1d</i>	<i>Bgl</i> III	<i>Hind</i> III	Puffer 2

aufgereinigt und umgepuffert. Zur Bestimmung der Konzentration der DNA-Lösung wurden 5 µl des Eluats auf einem Agarose-Gel analysiert.

2.2.2.2 Präparation der Vektor-DNA

Die Vektor-DNA wird wie in Tabelle 2.5 aufgeführt restringiert. Der Verdau erfolgt für 1,5 h bei 37°C.

Tabelle 2.5: Restriktion der Vektor-DNA

Vektor	Restriktion	Puffer
pBUF 1b		
pBUF 1	<i>Hind</i> III /	Puffer 2 sequentiell
pQE60	<i>Bam</i> HI	(nach dem Verdau mit <i>Hind</i> III Erhöhung der BSA-Konzentration auf 150µM und der NaCl-Konzentration auf 150mM)
pET43.1		
pET 30 G-Prot		
pIVEX MCS	<i>Nde</i> I / <i>Xho</i> I	Puffer 2, 150µM BSA
pIVEX MBP-HSD2	<i>Kpn</i> I / <i>Xho</i> I	Puffer 2

Anschließend werden die Ansätze für 20 min auf 65°C erwärmt, um die Restriktionsenzyme zu inaktivieren.

Der Vektor pIVEX-MBP-HSD2 vom Insert (HSD2) zu trennen, wird im präparativen Maßstab mit Hilfe des Qiagen Gel-Extraction-Kits geleluert. Die übrigen Ansätze werden mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und umgepuffert

Zur Bestimmung der Konzentration der DNA-Lösung wurden 5 µl des Eluats auf einem Agarose-Gel analysiert.

2.2.2.3 Ligation und Screening

Die restringierte Insert DNA und die restringierte und dephosphorylierte Vektor-DNA wurden entsprechend Tabelle 2.6 zur Ligation kombiniert. Die Ligation fand über Nacht bei 16°C statt.

Tabelle 2.6: Ligation und Screening

Zu konstruierendes Expressionsplasmid	Plasmid	Insert	Screening
<i>pMalHSD1</i>	pBUF 1b	<i>17βhsd1 a</i>	Miniexpression
<i>pMalHSD2</i>	pBUF 1	<i>17βhsd1 b</i>	Miniexpression
<i>pMalHSD3</i>	pBUF1	<i>17βhsd1 c</i>	Miniexpression
<i>pET43NusAHSD</i>	pET43.1	<i>17βhsd1 d</i>	Miniexpression
<i>pIVEXHSD1</i>	pIVEX 2.3 MCS	<i>17βhsd1 e</i>	PCR
<i>pIVEX MBP HSD1</i>	pIVEX 2.3 MCS	<i>17βhsd1 f</i>	PCR
<i>pQEHSDC43C</i>	pQE60	<i>17βhsd1 i</i>	Miniexpression
<i>pQEHSDC43N</i>	pQE60	<i>17βhsd1 k</i>	Miniexpression
<i>pET G HSD</i>	pET 30 G	<i>17βhsd1 d</i>	PCR

Jeweils 10µl der Ligationsansätze wurden in *E. coli* XL1- Zellen transformiert.

Da bei der Ligation BglII-geschnittener Insert-DNA und BamHI-geschnittener Vektor-DNA die Restriktionsschnittstelle zerstört wird, kann hier das Vorhandensein des gewünschten Inserts nicht durch Restriktion bestimmt werden. Handelt es sich um einen Vektor mit T5- bzw. lac-Promotor wird eine Expression im kleinen Maßstab (Miniexpression) durchgeführt. Enthält das Plasmid jedoch einen T7-Promotor, so wird eine sog. „whole-cell“-PCR durchgeführt.

2.2.2.4 Identifikation rekombinanter Plasmide

2.2.2.4.1 Expression in einem kleinen Maßstab

Um positive Ligationsprodukte zu identifizieren, kann eine Expression des rekombinanten Proteins in einem kleinen Maßstab durchgeführt werden. Dazu wurden von den Ligationsplatten jeweils zehn Klone mit Hilfe von sterilen Zahnstochern abgeimpft und einerseits zur Inoculation von 3 ml Rollerulturen (LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum) und andererseits zum Ausstreichen auf LB-Antibiotikplatten verwendet. Die Rollerulturen wurden bis zu einer deutlichen Trübung bei 37°C geschüttelt und die Proteinexpression mit einer IPTG Endkonzentration von 1mM induziert. Sowohl die Rollerulturen als auch die LB-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Von den Bakterienkulturen wurden jeweils 500 µl 5 min bei 3800 g abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden dann in je 50 µl SDS-Probenpuffer und 50 µl Wasser resuspendiert und zum Aufschluß der Zellen 10 min auf 95°C erhitzt.

Von diesen Zellaufschlüssen wurden jeweils 15 µl auf ein 17%iges SDS-Gel aufgetragen und analysiert.

Die aufgrund der Überexpression der HSD1 für positiv gehaltenen Klone wurden von der Platte abgeimpft und für die Inoculation einer 5 ml LB-Ampicillin-Rollerkulturen verwendet. Diese Kulturen wurden verwendet, um eine Plasmidpräparation mit QIAprep Spin Plasmid Kit durchzuführen.

Die DNA-Konzentration wurde auf einem Agarosegel analysiert und die Plasmide anschließend sequenziert.

2.2.2.4.2 „whole-cell“-PCR

Bei einer whole cell PCR werden anstatt einer Plasmid-Lösung ganze Zellen als Template verwendet. Dazu wird mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers ein wenig Zellmasse von einer LB-Platte direkt in den PCR-Ansatz (entsprechend Kapitel 2.2.1.6) überführt. Beim Durchlaufen des Temperaturprogramms wird der Ansatz im ersten Schritt auf 95°C erwärmt. Dabei werden die Zellen aufgeschlossen und *E. coli* eigene Enzyme inaktiviert. Als Primer werden die in Tabelle 2.7 angegebenen verwendet. Wenn bei der anschließenden Analyse auf einem Agarosegel ein PCR-Produkt der entsprechenden Größe sichtbar ist, kann von einem Vorhandensein des gewünschten Inserts ausgegangen werden.

Die aufgrund der whole-cell PCR für positiv gehaltenen Klone wurde von der Platte abgeimpft und für die Inoculation einer 5 ml LB-Ampicillin bzw. Kanamycin-Rollerkulturen verwendet.

Diese Kulturen wurden verwendet, um eine Plasmidpräparation mit QIAprep Spin Plasmid Kit

durchzuführen. Die DNA-Konzentration wurde auf einem Agarosegel analysiert und die Plasmide anschließend sequenziert.

Tabelle 2.7: verwendete Primer für „whole cell“- PCR

pIVEXHSD1	Primer 7 + 13
pIVEX MBP HSD1	Primer 8 + 12
pET G HSD	Primer 6 + 12

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Heterologe Expression in *E. coli*

2.2.3.1.1 Expression in LB-Medium

Von der Transformationsplatte wurde mit Hilfe einer sterilen Impföse ein Klon abgeimpft und zur Inoculation einer 5 ml LB-Rollerkultur verwendet. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die gesamte Rollerkultur in einen Liter steriles LB-Medium überführt. Dem Medium wurden zusätzlich Antibiotika (Ampicillin 100µg/ml, Kanamycin 30µg/ml) entsprechend der verwendeten Plasmide zugesetzt und unter den in Tabelle 2.8 angegebenen Bedingungen bei

180 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert. Das Wachstum wurde durch diskontinuierliche Messungen der OD₆₀₀ verfolgt.

Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,5, dazu wurde die Kultur auf eine IPTG-Endkonzentration von 1 mM gebracht.

Nach der Induktion wurden die Zellen für die Dauer der Induktion bei 180 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert und anschließend geerntet.

Tabelle 2.8: Übersicht über die Expressionsbedingungen der verwendeten Plasmide

Expressions-plasmid	<i>E. coli</i> Stamm	Temperatur vor/nach Induktion	Expressionsdauer	Antibiotika
pQEHSd1	XL10	37°C/37°C		Ampicillin
pMalHSD a	XL10	37°C/37°C	4 h	Ampicillin
pMalHSD b	XL10	37°C/37°C	6 h	Ampicillin
pMalHSD c	XL10	37°C/37°C	4 h	Ampicillin
pETNusHSD	BL21DE3Star	30°C/20°C	18 h	Ampicillin
pETGHSD	BL21DE3Star	37°C/20°C	18 h	Kanamycin
pQEHSdC43C	XL1	37°C/20°C	4 h	Ampicillin
pQEHSdC43N	XL1	37°C/28°C	4 h	Ampicillin
pIVEXHSD1		<i>in vitro</i> Expression		Ampicillin
pIVEXMBPHSD		<i>in vitro</i> Expression		Ampicillin

2.2.3.1.2 Expressionskinetik

Um ein frühzeitiges Absterben der Zellen und die damit verbundene Freisetzung des rekombinaten Proteins in das Medium zu verhindern, sind kurze Induktionszeiten anzustreben. Damit die Expression jedoch nicht vorzeitig abgebrochen wird, muß die optimale Induktionszeit für jedes Expressionssystem neu bestimmt werden.

Dazu wurde eine 100 ml Schüttelkultur bei 37°C/180 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG. Zur Stabilisierung des Expressionsplasmids wurde erneut Antibiotikum zugesetzt.

Es wurden zum Zeitpunkt der Induktion und danach in diskontinuierlichen Zeitabständen 500 µl-Proben entnommen und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

Die Bakterienkultur-Proben wurden 5 min bei 3800 g zentrifugiert, das Pellet in 50 µl Wasser und 50 µl Probenpuffer resuspendiert und 10 min bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert.

2.2.3.1.3 Coexpression von Chaperonen

Eine Aggregatbildung bei einer hohen Überexpression hydrophober Proteine kann durch die Co-Expression von Chaperon-Proteinen verhindert werden (Hayhurst und Harris, 1999; Hsu und Betenbaugh, 1997; Nishihara *et al.*, 1998). Chaperone unterdrücken durch vorübergehende Assoziation mit exponierten, hydrophoben, nicht-nativen Proteinsequenzen die Aggregation. Nach der Ablösung von Chaperonen falten sich viele Proteine zur nativen Struktur

Dazu werden kompetente *E. coli* XL10 Zellen sowohl mit 1 µl des gewünschten Plasmids als auch mit 1 µl des Plasmids, das die genetische Information für das jeweilige Chaperon-Protein trägt, transformiert. Die Selektion der Transformanden erfolgt durch LB-Amp-Kan-Platten, da die Chaperon-Plasmide eine Kanamycin-Resistenz vermitteln. Doppelt-resistente Kolonien werden zur Inoculation von 50 ml LB-Amp-Kan-Schüttelkulturen verwendet. Eine Expression der Chaperon-Proteine erfolgt durch Induktion mit 5 mM Arabinose bei einer OD₆₀₀ von 0,5, 30 min später wird die Expression der 17βHSD1 durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert.

2.2.3.1.4 Coexpression des lac-Repressors

Durch den lac-Promotor kontrollierte Gene werden in geringem Maße auch in Abwesenheit von IPTG exprimiert. Damit eine vollständige Repression gewährleistet ist, können Plasmide verwendet werden, die bereits das lacI-Gen enthalten (cis-Repression) oder es wird ein zweites Plasmid co-transformiert (trans-Repression), das das lacI-Gen trägt (vgl. Kapitel 2.2.3.1.2).

2.2.3.1.5 Ernte und Aufschluß der Zellen

Zur Ernte der Zellen wurde die Kultur 10 min bei 4°C/4000 g abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 50 ml Puffer AI, NI oder QI resuspendiert, in Abhängigkeit der Chromatographie, die bei der weiteren Aufreinigung des Proteins zur Anwendung kam. Um den proteolytischen Abbau der freigesetzten Proteine durch Proteasen zu verhindern, wurde der Suspension vor dem Zellaufschluß ca. 0,1 mg/ml Pefabloc[®]SC oder 2 Tabletten Complete EDTA-free, aufgelöst in 2 ml H₂O_{millipore}, zugesetzt.

Für den French Press Zellaufschluß wurde ein Druck von 1200 psi eingestellt, der auf 4°C vorgekühlte Druckzylinder mit der Zellsuspension gefüllt und der Zellextrakt in ein gekühltes 50 ml Zentrifugenröhrchen unter konstantem Druck gepresst. Der Aufschluß erfolgt dabei durch Scherkräfte, die auf die Zellen wirken, wenn sie den Spalt zwischen dem eingesetzten Teflonkügelchen und der Wand der Ausflussöffnung passieren.

Das Rohlysat wurde anschließend für 30 min bei 4°C/20000 g abzentrifugiert, um Zelldebris abzutrennen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abdekantiert und das Pellet

verworfen. Um eine Kontamination des im Anschluß verwendeten Säulenmaterials zu verhindern, wurde das Rohlysat mit Hilfe eines 0,45 µM Spritzenvorsatz-Filters sterilfiltriert.

2.2.3.2 Isotopenanreicherung

2.2.3.2.1 ¹⁵N ²D

Bei dem zur Expression von ¹⁵N und ²H- angereicherter 17βHSD1 verwendete Kulturmedium handelt es sich um ein M9-Minimalmedium, bei dem H₂O durch D₂O ersetzt wurde. Als Stickstoffquelle wurde anstelle ¹⁴NH₄Cl das mit ¹⁵N angereicherte ¹⁵NH₄Cl zugesetzt.

Um ein Ausfallen der Salze in der Lösung zu verhindern, ist es vorteilhaft, die Salze entsprechend der in Tabelle 2.9 angegebenen Reihenfolge zu lösen.

Tabelle 2.9: M9-Medium

Lösung A	NaCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ -Stocklösung	Salze in 300 ml D ₂ O lösen
Lösung B	CaCl ₂ FeCl ₃ -Stocklösung Thiamin Biotin NH ₄ Cl Glucose	Salze in 300 ml D ₂ O lösen Zu Lösung B zufügen
		Lösung A und B mischen, auf 1000 ml auffüllen, pH-Wert mit deuterierten Säuren oder Basen korrigieren und mit Hilfe eines 0,2 µM Filters sterilfiltrieren

Für die M9-Vorkultur wurde unmarkiertes 5xM9-Medium verdünnt, mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit einem Klon von einer Transformationsplatte angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde 1 ml des Kulturvolumens abzentrifugiert, zweimal mit je 2 ml D₂O gewaschen und zum Animpfen der 20 ml D₂O-Vorkultur verwendet. Nach erneuter Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die gesamte Vorkultur in die Hauptkultur überführt und bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Nach Induktion der Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde bei einer Expressionstemperatur von 20°C weitere 24 h inkubiert.

2.2.3.2.2 Selektive Isotopenanreicherung

Für die selektive Anreicherung mit ¹⁵N-markiertem Lysin wurde unmarkiertes M9-Medium mit ¹⁵N-Lysin versetzt. Mit Hilfe einer LB-Vorkultur wurde eine 11-LB-Amp Kultur angeimpft und anschließend bei 37°C bis zu einer OD von 1 inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen unter

sterilen Bedingungen abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit sterilem unmarkiertem M9-Medium gewaschen und anschließend in einem Liter unmarkiertem M9-Medium, versetzt mit 15N-Lysin, resuspendiert. Für weitere 30 min wurde bei 28°C inkubiert und anschließend die Expression durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Die Induktionszeit betrug 16 h.

2.2.3.3 Zellfreie Expression (*in vitro* Expression)

Zur Durchführung einer *in vitro*-Expression als CECF-Reaktion wurden Microdialyser mit 25 kD MWCO eingesetzt. Als Reaktionsvolumen dienten 70 µl der Reaktionslösung, dazu wurden 1000 µl Feedinglösung eingesetzt. Das Feedinggefäß und der Microdialyser wurden mit Parafilm aneinander fixiert, die innere Kammer mit dem Deckel des Microdialysers versehen. Die Reaktion erfolgte bei 30°C im Wasserbad eines Thermoschüttlers für 10 h.

Das hier verwendete Protokoll zur Durchführung der *in vitro*-Expression von Proteinen Tabelle 2.10 sowie die Aufarbeitung des benötigten *E. coli* Extraktes wurden gemäß (Klammt *et al.*, 2004) erstellt.

Als Expressionsplasmide kamen pIVEX MBP-HSD1 und pIVEX HSD1 zum Einsatz.

Tabelle 2.10. Protokoll zur Herstellung der Reaktions- und Feeding-Lösung einer 70µl MD-Reaktion

Konzentration der Stocklösung	Komponenten der Reaktions- und Feedinglösung	Reaktionslösung [µl]	Feedinglösung [µl]	Endkonzentration
	S30-Extrakt	24.5	-	0.35
	S30-Puffer	-	350	0.35
0.3 mg/ml	Plasmid	3.5	-	0.015 mg/ml
34.48	RNasin	0.6	-	0.30 U/µl
30	T7-RNA Polymerase	7.0	-	3.0 U/µl
40 mg/ml	tRNA <i>E. coli</i>	0.9	-	0.50 mg/ml
10 mg/ml	PK	0.3	-	0.04 mg/ml
16.7 mM	RCWMDE	4.2	60	1.00 mM
4.0 mM	AS-Mix	8.8	250	0.50 mM
1000 mM	Acetylphosphat	1.4	20	20.00 mM
1000 mM	PEP	1.4	20	20.00 mM
75	NTP	0.9	13	1.0
500 mM	DTT	0.3	4	2.0 mM
10 mg/ml	Folsäure	0.7	10	0.10 mg/ml
50	Complete	1.4	20	1
24	Puffer (Hepes+EDTA)	2.6	37	1.0
1000 mM	Mg(OAc) ₂	0.6	8	8.1 mM
4000 mM	KOAc	2.4	34	136.0 mM
40 %	PEG8000	3.5	50	2 %
10%	NaN ₃	0.4	5	0.05 %
	H ₂ O	4.8	119	
	Gesamtvolumen	70	1000	

2.2.3.4 Chromatographische Trennmethoden

2.2.3.4.1 Affinitätschromatographie an Amylose

Die Affinitätschromatographie an Amylose basiert auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen dem *maltose-binding-protein* und Amylose. Durch die Wasserstoffbrücken-vermittelte Bindung des maltose-binding-proteins an das Amylose-Agarose-Säulenmaterial wird das Fusionsprotein auf der Säule retardiert und kann durch die Zugabe von Maltose eluiert werden, da die Affinität des maltose-binding-proteins zu Maltose größer ist als zu Amylose.

Die Amyloseaffinitätschromatographie wird eingesetzt, um Proteine, an deren N- oder C-Terminus ein MBP fusioniert wurde, zu isolieren.

Amylose Aufreinigung unter Verwendung einer Säule

Das Lysat wurde nach dem Zellaufschluß auf eine mit Puffer A1 äquilibrierte 10 ml Amylose-Säule aufgetragen. Unter Gravitationsfluß wurde die Säule so lange mit Puffer A1 gewaschen, bis im Durchfluß kein Protein mehr nachweisbar war. Das an das Amylose-Material gebundene Fusionsprotein wurde mit Puffer A2, der 10 mM Maltose enthielt, eluiert und fraktioniert gesammelt. Die Homogenität des Proteins wurde durch eine SDS-PAGE analysiert. Die Lagerung des Säulenmaterials erfolgte unter SDS (Lösung A3).

Amylose im „batch“ bei gleichzeitigem TEV-Verdau

Das Lysat wurde nach dem Zellaufschluß auf eine mit Puffer A1 äquilibrierte Amylose-Säule aufgetragen und mit Puffer A1 gewaschen, bis im Durchfluß kein Protein mehr nachweisbar war. Im Anschluß wurde das Säulenmaterial aus der Säule entnommen und zu jeweils 5 ml (5 ml Suspension entsprechen etwa 3 ml Amylose-Material) aliquotiert. Durch Zugabe von β -OG, Glycerin oder Chaps wurden die Restriktionsparameter systematisch variiert und zu jedem Aliquot wurde TEV-Protease in gleicher Konzentration (1% der Gesamtproteinmasse) zugegeben. Nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht wurde der Überstand abgenommen, erneut mit Puffer A1 gewaschen und dann mit Puffer A2 versetzt. Nach der Sedimentation des Materials wurde der Überstand abgenommen und mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert.

2.2.3.4.2 Affinitätschromatographie an Dextrin

Die Affinitätschromatographie an Dextrin basiert auf dem gleichen Prinzip wie die Amylose-Chromatographie. Das maltose-binding-protein bindet an des kurzkettigere Dextrin, das durch Verdau mit α - und β -Amylasen oder industriell durch die Behandlung mit Säuren unter

Erwärmung aus Kartoffelstärke hergestellt wird. Durch die Zugabe von Maltose, das eine höhere Affinität zum maltose-binding-protein aufweist, wird das Fusionsprotein eluiert.

Zur Vorbereitung der Säule wurde Dextrin in reichlich Wasser resuspendiert und der Überstand abdekantiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis der Überstand keine gelbliche Färbung mehr aufwies. Anschließend wurde das Dextrin zweimal mit Puffer D1 gewaschen und in einen Säulenkörper mit einem Durchmesser von mindestens 6 cm gefüllt.

Das Lysat wurde nach dem Zellaufschluß auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Unter Gravitationsfluß wurde die Säule so lange mit Puffer D1 gewaschen, bis im Durchfluß kein Protein mehr nachweisbar war. Das an das Dextrin gebundene Fusionsprotein wurde mit Puffer D2, der 10 mM Maltose enthielt, eluiert und fraktioniert gesammelt. Die Homogenität des Proteins wurde durch eine SDS-PAGE analysiert. Das Dextrin wurde verworfen.

2.2.3.4.3 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie

Bei der von Porath (Porath *et al.*, 1975) eingeführten immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (MCAC) ist eine Metall-chelatierende Gruppe, die Nitrilotriessigsäure (NTA), am Säulenmaterial immobilisiert. NTA besetzt vier der sechs Liganden-Bindungsstellen des Ni^{2+} -Ions, so dass zwei Koordinationsstellen für die Wechselwirkung mit dem *his-tag* verbleiben und die Ni^{2+} -Ionen fest an das Säulenmaterial gebunden sind.

Der Imidazolring stellt einen Teil der Struktur von Histidin dar. Histidin bindet über den Imidazolring an das Säulenmaterial. Bei einer niedrigen Imidazolkonzentration ist die Affinität von Proteinen mit einem *his-tag* stark und erlaubt eine effiziente Bindung an das Ni-NTA-Material, während die unspezifische Bindung einzelner Histidin-Reste von Proteinen ohne *his-tag* zerstört wird. Bei einer Imidazolkonzentration von etwa 300 mM, dissoziieren Proteine mit *his-tag* und können eluiert werden.

EDTA komplexiert Ni^{2+} -Ionen und entfernt sie von der NTA-Gruppe, so dass das Material mit einem EDTA enthaltenden Puffer regeneriert werden kann.

IMCA an NiNTA

Die mit Ni^{2+} -Ionen beladene Säule wurde zur Regeneration mit drei Säulenvolumen Stripping Buffer gewaschen. Anschließend wurde sie zur Entfernung des übrigen EDTA mit drei Säulenvolumen Wasser gespült. Die Beladung mit Ni^{2+} -Ionen erfolgte durch drei Säulenvolumen Nickel-Sulfat-Lösung, bis die Säule gleichmäßig grün erschien.

Die mit Ni^{2+} -Ionen beladene Säule wurde mit drei Säulenvolumen Puffer N1 äquilibriert. Das sterilfiltrierte Rohlysate wurde auf die Säule aufgetragen. Durch einen Stufengradienten mit zwei Schritten wurden zunächst bei 20% Puffer N2 (entspricht 60 mM Imidazol) unspezifisch bindende Proteine entfernt, die Elution erfolgte dann durch 100% Puffer N2.

Ni-NTA-Spin Columns

Ni-NTA-Spin-Columns stellen eine einfache Methode für die schnelle Überprüfung und Reinigung von Proteinen, die mit einem *his-tag* versehen sind, aus einer kleinen Bakterien-Expressions-Kultur dar. Die Proteinreinigung basiert ebenfalls auf der Selektivität des mit Ni^{2+} -Ionen beladenen NTA-Materials. Das Ni-NTA-Silica-Material der Spin Columns zeigt dieselben Reinigungseigenschaften und Elutionsprofile wie die Ni-NTA-Agarose, die bei der Aufreinigung im präparativen Maßstab verwendet wird.

Die pelletierten Zellen aus 50 ml Kulturvolumen wurden in 5 ml Lysis-Puffer resuspendiert und im Anschluß durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (5 x 20 Pulse).

Um die Zelltrümmer zu entfernen, wurde der Rohaufschluß für 10 min bei 18000 g abzentrifugiert. Die Hälfte des Überstands wurde in mehreren Schritten auf die Ni-NTA-Spin-Columns aufgebracht, indem jeweils ein Teil der Lösung auf die Säule aufgetragen, anschließend für jeweils eine Minute bei 700 g abzentrifugiert und das Eluat verworfen wurde. Die Säulen wurden im Folgenden zweimal mit je 750 μl Wasch-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch Aufbringen von 300 μl Elutions-Puffer auf die Säulen und Zentrifugieren für 1 min bei 700 g.

Für SDS-Gel-Proben wurden vom Rohlysate und den jeweiligen Eluaten (beim Beladen, Waschen und Eluieren) je 20 μl mit 10 μl Probenpuffer vermischt und 10 min bei 95°C erhitzt.

Davon wurden 15 μl auf einem 17,5 %igen SDS-Gel analysiert.

IMCA mit Hitrap Säulen

Hi-Trap-Columns, erhältlich als 1 ml oder 5 ml Säule, stellen eine einfache Methode für die schnelle Überprüfung und Reinigung von Proteinen, die mit einem *his-tag* versehen sind, aus einer kleinen Bakterien-Expressions-Kultur dar. In den „HiTrap-Chelating-Columns“ wird Iminodiessigsäure (IDA) verwendet, die nur über drei Ligandenbindungsstellen verfügt und so das Ni^{2+} -Ion geringfügig schwächer als beim NiNTA-Material bindet. Dieses Material zeigt dennoch sehr ähnliche Eigenschaften wie das NiNTA-Material, das für Aufreinigungen im großen Maßstab verwendet wird.

Diese Säulen können sowohl mit einer Peristaltik-Pumpe als auch mit Hilfe einer Spritze verwendet werden, dabei ist bei letzterem allerdings zu beachten, dass der auf die Säule ausgeübte Druck gleichmäßig niedrig ist, um eine Kompression des Materials zu vermeiden.

Entsprechend des Protokolls für NiNTA-Material (Kapitel 0) kann die Säule regeneriert und äquilibriert werden. Das filtrierte Zelllysate wurde auf die Säule aufgetragen und mit dem doppelten Säulenvolumen Puffer N1 gewaschen. Ein Stufengradient von 20% Puffer N2 diente dem Entfernen unspezifisch gebundener Proteine. Die Erhöhung auf 100% Puffer N2 führte dann zur Elution der spezifisch gebundenen Proteine.

2.2.3.4.4 Ionenaustauschchromatographie

Die Grundlage für den Ionenaustausch ist die kompetitive Wechselwirkung geladener Ionen. Ein Protein, geladen durch saure und basische Seitengruppen einzelner Aminosäuren, konkurriert mit Salz-Ionen um die geladenen Positionen auf einer Ionenaustauscher-Matrix. In einem ersten Schritt bindet das Molekül an die fixierten Ladungen der stationären Phase, und in einem zweiten Schritt erfolgt die Verdrängung und Elution durch die steigende Salzkonzentration des Eluenten. Je stärker das Protein geladen ist, desto stärker ist die Bindung an den Ionenaustauscher. Bei Q-Sepharose handelt es sich um einen starken Anionenaustauscher, der als funktionelle Gruppe eine quaternäre Trimethylaminoethyl-Gruppe trägt.

Die Menge an Protein, die an einen Austauscher gebunden werden kann, hängt von der Molekülgröße ab. Für große Moleküle ist nur die Oberfläche des Ionenaustauschers zugänglich und die Kapazität ist relativ gering.

Zur Beladung mit dem mobilen Gegenion wurde die Säule (Q-Sepharose High Performance, 20 ml) vor der Auftragung der Probe zunächst mit dem dreifachen Säulenvolumen Puffer Q2 gespült und anschließend mit Puffer Q1 äquilibriert. Die Probe wurde sterilfiltriert und dann auf die Säule aufgetragen.

Anschließend wurde die Säule zur Elution unspezifisch gebundener Proteine mit drei Volumen Puffer Q1 gewaschen. Die Elution der HSD erfolgte mittels eines linearen Gradienten von 0 bis 1 mM NaCl. Die Elution wurde über die Messung der Absorption bei $\lambda = 280$ nm verfolgt.

2.2.3.4.5 Ausschlußchromatographie

Die Ausschlußchromatographie trennt gelöste Moleküle nach ihrem relativen Molekulargewicht und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Proben in ein poröses Trägermaterial mit bestimmter Porengröße. Für das Trennverhalten ist das hydrodynamische Volumen der Probenmoleküle verantwortlich. Die Molekülgröße steht in einem kritischen Verhältnis zu den

Poren, Moleküle ab einer bestimmten Größe können nicht in die Poren des Trenngels eindringen und eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront. Kleinere Moleküle dringen in die Poren des Trenngels ein und erfahren dadurch eine ihrer Größe entsprechende Verzögerung, die kleinsten Komponenten werden somit zuletzt eluiert.

Die G-HSD enthaltenden Fraktionen wurden nach Zusatz von 10% Glycerin mit einer Amicon-Zelle aufkonzentriert und auf eine 120 ml Gelfiltrations-Säule (Superdex 200) aufgetragen.

2.2.3.5 Protein-Analytik

2.2.3.5.1 Western Blot

Der Transfer und die Immobilisierung elektrophoretisch getrennter Proteine aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Membran aus PVDF oder Nitrocellulose unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes (sog. „Western Blotting“) macht die Proteine für einen direkten Nachweis durch spezifisch bindende Antikörper zugänglich und ermöglicht so eine genauere Charakterisierung (Renart *et al.*, 1979; Timmons und Dunbar, 1990; Towbin *et al.*, 1979).

Die Übertragung der Proteine vom Polyacrylamidgel auf die Polyvinyliden-Difluorid (PVDF) Membran erfolgte nach dem Semidry-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) mit Hilfe einer „Trans-Blot SD“- Zelle von Biorad (100mA, 1 h). Die Effizienz des Transfers konnte durch die Verwendung eines vorgefärbten Proteinmolekulargewichtsstandards überprüft werden.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die PVDF-Membran zu verhindern, wurde diese für 1 h mit Blockpuffer gesättigt. Durch die darauffolgende Inkubation (3 h) mit dem spezifischen Primärantikörper wurde das gewünschte Protein markiert. Der Sekundärantikörper (Inkubation 2 h) bindet spezifisch an den Primärantikörper und ist an ein Chemolumineszenz-fähiges Enzym (z.B. *horse raddish peroxidase*) gekoppelt. Waschschrte mit PBST Puffer erfolgten nach Inkubation der Membran mit der Blocklösung sowie mit den beiden Antikörperlösungen.

Die Immundetektion wird mittels ECL („enhanced chemiluminescence“), einer nicht radioaktiven, sensitiven Methode zum Nachweis geringer Proteinmengen auf einer Membran, durchgeführt.

Hierfür katalysiert die an den Sekundärantikörper gebundene HRP in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol, die unter alkalischen Bedingungen zu einer Lichtemission bei 428 nm führt. Die Reaktion wird bei der verstärkten Chemolumineszenz (ECL) durch ein Phenol um ein ca. 1000-faches verstärkt.

Dazu wird die Membran zuerst für eine Minute mit ECL-Lösung 1 inkubiert und anschließend mit ECL-Lösung 2 veretzt. Die entstehende Chemolumineszenz konnte im „Lumi-Imager“ detektiert werden.

2.2.3.5.2 Bradford Test

Die Proteinkonzentration wurde mit dem „*Coomassie dye-binding assay*“ (Bradford 1976) bestimmt. Zu 990 µl der Bradford-Lösung wurden 10 µl der Probe gegeben, vermischt, und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die OD₅₉₅ wurde bestimmt, wobei als Referenz 990 µl Bradfordlösung gemischt mit 10 µl Puffer dienten. Die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich mit der Eichgeraden unter Einbeziehung der Verdünnung ermittelt. Dabei wurde die Eichkurve mit Rinderserumalbumin im Konzentrationsbereich von 1 bis 10 µg/ml aufgenommen. Befand sich der gemessene Wert oberhalb des linearen Bereiches der Eichgeraden, wurde die Proteinlösung 1:10 mit H₂O verdünnt und erneut gemessen.

2.2.3.5.3 Elektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld (Garfin, 1990). Unterschiedliche Ladungen und Größen der Teilchen bewirken eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit. Die Wanderung der Teilchen wird durch die Wechselwirkung mit der Gelmatrix behindert, die somit als Molekularsieb wirkt. Diese entgegengesetzten Effekte resultieren in individuell unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten von Proteinen

Als Gelmedium für die Auftrennung von Proteingemischen bietet sich ein Polyacrylamidgel an. Um eine Trennung ausschließlich nach dem Molekulargewicht zu erreichen, bietet sich die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) an. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinen so effektiv, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (1,4 mg SDS pro mg Protein). Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuß an SDS auf 95°C erhitzt. Dadurch werden die Wasserstoffbrücken aufgespalten und die Moleküle gestreckt, so dass die Tertiär- und Sekundärstrukturelemente zerstört werden. Durch den Zusatz der reduzierenden Thiolverbindung β-Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken zwischen Cysteinen aufgespalten. Die mit SDS beladenen, gestreckten Aminosäureketten bilden schließlich Ellipsoide. (Lottspeich und Zorbas, 1998)

Herstellung des SDS-Gels

Das aus einem 12 %igen Trenngel und einem 4%igen Sammelgel bestehende diskontinuierliche SDS-Gel wurde in einer Minigelapparatur hergestellt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist dem Anhang zu entnehmen.

Für zwei 12 %ige Trenngele wurde folgender Ansatz pipettiert:

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (für 12%ige Gele)	10 ml
TEMED	25 µl
APS 10% (w/v)	50 µl

Je ca. 5 ml des Polymerisationsansatzes wurden zwischen zwei Glasplatten eingefüllt und zum Luftabschluß mit wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet.

Als das Trenngel polymerisiert war, konnte nach Entfernen des Butanols das Sammelgel gegossen werden. Dazu wurde folgender Ansatz pipettiert:

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (für 4%ige Gele)	5 ml
TEMED	10 µl
APS 10% (w/v)	25 µl

Nachdem der Polymerisationsansatz für das Sammelgel auf das bereits polymerisierte Trenngel geschichtet wurde, konnte der Kamm für die Geltaschen eingeschoben werden.

Die beiden Gele wurden nach der vollständigen Polymerisation in die Elektrophoresekammer überführt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Anschließend konnten die Käme entfernt werden.

Danach wurden jeweils 15 µl der vorbereiteten Proben und 8 µl des Molekulargewichtsstandards „low range“ auf das Gel aufgetragen.

Der Standard besteht aus einem Gemisch folgender Proteine:

Ovalbumin	43 kD
Carboanhydrase	29 kD
β-Lactoglobulin	18,4 kD
Lysozym	14,3 kD
Trypsininhibitor (Rind)	6,2 kD
Insulin	3 kD

Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer Spannung von zunächst 100 V für ca. 15 min, anschließend 200 V für ca. 70 min.

Nachweis der getrennten Proteine

Die Proteine können direkt im Gel angefärbt werden, ein vielverwendeter Farbstoff ist Coomassie Brilliant Blau R-250.

Die Gele wurden unter leichtem Schütteln für 25 min in die Färbelösung eingelegt. Die Proteine wurden dabei angefärbt und fixiert.

Zum Entfärben wurden die Gele in Wasser in der Mikrowelle bei hoher Leistung ca. 30 min erhitzt.

2.2.3.5.4 Aktivitätsmessung

Die Oxidation von Estradiol und auch die Reduktion von Estron, katalysiert durch die 17 β HSD1 unter Verbrauch von NADP⁺ bzw. NADPH⁺, können direkt photometrisch untersucht werden. Das Absorptionsmaximum von NADH liegt bei einer Wellenlänge von 340 nm und der Extinktionskoeffizient beträgt 6,178 L/mol*cm. Für die Oxidation wird eine Zunahme der Extinktion und für die Reduktion eine Abnahme beobachtet. Für die Untersuchung der 17 β HSD1-Aktivität wurde folgender Ansatz verwendet:

Oxidation

50 mM NaHCO ₃ -Puffer	600 μ l
1 mM Estradiol	35 μ l
5 mM NADP ⁺	10 μ l
17 β HSD1	5 μ l

Reduktion

50 mM KH ₂ PO ₄ -Puffer	600 μ l
1 mM Estron	45 μ l
1,4 mM NADPH	100 μ l
17 β HSD1	5 μ l

Für die Bestimmung des K_M-Wertes wurde die Substratkonzentration unter Berücksichtigung des Gesamtvolumens variiert (Oxidation zwischen 80 und 510 μ M, Reduktion zwischen 14 und 90 μ M).

2.2.3.6 Weitere biochemische Methoden

2.2.3.6.1 TEV-Protease

Bei der Protease TEV (*tobacco etch virus*) handelt es sich um eine Cystein-Protease (Phan *et al.*, 2002), die eine aus sieben Aminosäuren bestehende Konsensus Sequenz E-X-X-Y-X-Q-G/S erkennt, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt (Carrington und Dougherty, 1988; Dougherty *et al.*, 1989). Die Spaltung erfolgt zwischen Q und G/S, so dass ein Glycin- bzw. Serin-Rest am N-Terminus des Zielproteins zurückbleibt. Aufgrund ihrer hohen Spezifität wird sie häufig verwendet, um tags oder Fusionspartner vom Zielprotein zu entfernen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgende Erkennungssequenz verwendet: E-N-L-Y-F-Q-G.

Expression der TEV-Protease

Für die proteolytische Spaltung der Fusionsproteine pMalHSD1, 2 und 3 sowie pMalHSDC43 kam TEV-Protease zum Einsatz, die in *E. coli* XL1-Zellen exprimiert wurde. Das verwendete Plasmid geht auf das Plasmid pRK586 (Kapust und Waugh, 2000) zurück. Dabei wird die hydrophobe TEV-Protease in Fusion mit dem Maltose-Binde-Protein exprimiert, um sie in Lösung zu bringen. Aufgrund der TEV-Erkennungssequenz, die sich zwischen MBP und TEV befindet, kann bereits *in vivo* das MBP proteolytisch abgetrennt werden. Die TEV-Protease bleibt nach dem Schnitt in Lösung und wird aufgrund des vorhandenen *his-tags* durch eine IMAC an NiNTA in einem Schritt aufgereinigt (Puffer TEV1 und TEV2). Die TEV-Protease wird bis zur weiteren Verwendung bei -80°C im Elutionspuffer unter Zugabe von 50% Glycerin gelagert.

Coexpression der TEV-Protease

Eine Coexpression eines Fusionsproteins, das eine TEV-Proteolysesequenz enthält, mit der TEV-Protease führt zu einer Spaltung des Fusionsproteins *in vivo*. Falls das Zielprotein in Lösung bleibt, wird die Aufreinigungsstrategie dadurch deutlich vereinfacht.

Dazu werden kompetente *E. coli* XL10 Zellen mit jeweils 1 µl pMalHSD3 und pRK603 transformiert. Die Selektion der Transformanden erfolgt durch LB-Amp-Kan-Platten, da das Plasmid, das die genetische Information für die TEV-Protease trägt, eine Kanamycin-Resistenz vermittelt. Doppelt-resistente Kolonien werden zur Inoculation einer 50 ml LB-Amp-Kan-Schüttelkultur verwendet und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C inkubiert. Da der Vektor pRK603 einen λP_{L/tetO}-Promotor enthält kann die Expression der TEV-Protease durch die Zugabe von Anhydrotetracyclin mit einer Endkonzentration von 100 ng/ml induziert werden.

Gleichzeitig wird die Expression des MBP-17 β HSD1-Fusionsproteins durch die Gabe von 1mM IPTG induziert.

Nach der Ernte werden die Zellen in 5 ml Puffer GF resuspendiert, mittels Ultraschall aufgeschlossen und anschließend durch SDS-PAGE analysiert.

Proteolyse durch die TEV-Protease

Für die TEV-Proteolyse des aufgereinigten MBP-17 β HSD1-Fusionsproteins (pMalHSD1) wurde das Eluat des ersten Aufreinigungsschritt mit 50xTEV-Restriktionspuffer versetzt. Die Masse der zugegebenen TEV-Protease betrug etwa 1 % der Gesamtmasse des Fusionsproteins. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C unter schwachem Rühren inkubiert.

Die Proteolyse des aufgereinigten Fusionsproteins MBP-17 β HSD1 (pMalHSD2 oder 3) erfolgte bei gleichzeitiger Dialyse gegen Puffer Q1, NiNTA1 oder A1. Die Wahl des Puffers hing von der weiteren Aufreinigung ab. Das Eluat des ersten Aufreinigungsschritts wurde mit 50xTEV-Restriktionspuffer und TEV-Protease (5% der Gesamtmasse des Fusionsproteins) versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Eventuell gebildete Präzipitate wurden durch Filtration (0,45 μ m) entfernt.

Optimierung der TEV-Verdaus

Der TEV-Verdau wurde entsprechend der in Tabelle 2.11 angegebenen Variationen optimiert. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C inkubiert und im Anschluss durch SDS-Gel-Elektrophorese analysiert.

Tabelle 2.11: Optimierung des TEV-Verdau

Ansatz	MBP-HSD1	EDTA [mM]	DTT [mM]	NaCl [mM]	Glycerin	pH-Wert	TEV	Sonstiges
1	1	1	0,2	100	10%	6,52	1%	
2	1	1	0,2	100	10%	7,02	1%	
3	1	1	0,2	100	10%	7,52	1%	
4	1	1	0,2	100	10%	7,98	1%	
5	1	1	0,2	100	10%	8,47	1%	
6	1	1	0,2	200	10%	7,86	1%	
7	1	1	0,2	500	10%	7,76	1%	
8	1	1	0,2	100	10%	7,7	1%	200 mM KCl
9	1	1	0,2	100	10%	7,82	0,5%	500 mM KCl
10	1	1	0,2	100	10%	7,82	3%	
11	1	1	0,2	100	10%	7,73	5%	
12	1	1	0,2	100	10%	7,74	10%	
13	1	1	0,2	100	10%	7,78	1%	
14	1	1	0,2	100	0	7,79	1%	
15	1	1	0,2	100	10%	7,77	1%	
16	1	1	0,2	100	10%	7,75	1%	2MGlycin
17	1	1,5	0,4	100	10%	7,79	1%	
18	1	3	1,2	100	10%	7,75	1%	
19	1	1,5	1,2	100	10%	7,78	1%	
20	1	1	0,2	100	10%	7,75	1%	Dialyse

2.2.3.6.2 Proteolyse durch die Protease Thrombin

Der für die Expression des NusA-17 β HSD1 Fusionsproteins verwendete Vektor pETNusA enthält bereits eine Schnittstelle für die Serin-Protease Thrombin. Diese Protease spaltet die Polypeptidkette selektiv zwischen Arginin und Glycin in der Erkennungssequenz LVPRGS.

Die 17 β HSD1 enthaltenden Fraktionen wurden nach der Metallcheltaffinitätschromatographie vereinigt und gegen Puffer N1 dialysiert. Es wurde Thrombin in einer Konzentration von 1U pro 200 μ g Protein zugeetzt und zusätzlich die Glycerin-Konzentration auf 10% erhöht. Die Spaltung erfolgte über 6 h bei Raumtemperatur.

2.2.4 NMR-Methoden

2.2.4.1 Saturation-Transfer-Difference (STD)-Untersuchungen

2.2.4.1.1 Präparation der Proben

Das durch die Amylose Säule aufgereinigte MBP-HSD2 b Fusionsprotein wurde bei 4 °C über Nacht gegen Puffer M dialysiert. Anschließend wurde es mittels eines Vivaspin Konzentrators bei 4 °C/2800g auf 2.5 mg/ml aufkonzentriert. Daraus wurden Proben für NMR-Experimente mit

Tabelle 2.12: Zusammensetzung der NMR-Proben für 1D-STD- und ePHOGSY-Experimente

	I	II	III	IV	V	VI	Endkonzentration [μM]	pH-Wert der Probe
Puffer M	400 μl	500 μl	390 μl	390 μl	470 μl	500 μl		
MBP-HSD1	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	4.25	
D_2O	70 μl	70 μl	70 μl	70 μl	70 μl	70 μl	100	
DMSO	120 μl		120 μl	120 μl			170	
Estradiol (20 mM)	10 μl						285	7
NADP ⁺ (20 mM)		30 μl					855	7
Coumestrol (20mM)			20 μl				570	9
5C-014 (10 mM)				20 μl			285	7
7C-052 (10 mM)					60 μl		855	7
106 488 85 (20 mM)						30 μl	855	7

verschiedenen Liganden hergestellt. Tabelle 2.12 zeigt die Zusammensetzung der NMR-Proben. Die Konzentration des Fusionsproteins betrug jeweils 4.25 μM . Die Ligandenkonzentration variierte zwischen 255 bis 855 μM . Der Ligand lag folglich in einem ca. 60- bzw. einem 200-fachen Überschuß zum Fusionsprotein vor. Für die in Wasser schlecht löslichen Liganden war eine Zugabe von DMSO bis zu 20% bzw. eine Erhöhung des pH Wertes nötig. Wegen seiner extrem schlechten Löslichkeit bei pH 7 wurde Coumestrol als einziger Ligand bei pH 9 vermessen, während alle anderen Proben der Protein-Ligandbindung auf pH 7 eingestellt waren. Dieser pH entspricht den physiologischen Bedingungen. Für den internen Deuteriumblock des NMR-Spektrometers enthielten alle Proben 10% D_2O .

2.2.4.1.2 Ein-dimensionale NMR Messung

Es wurden ein-dimensionale Messungen des Liganden mit Wasserunterdrückung durch *watergate* (Piotto *et al.*, 1992) oder *excitation sculpting* durchgeführt. Die Messungen wurden bei 293 K an einem Bruker Avance DRX 600 Spektrometer mit Cryo 5HCN Probenkopf oder an einem AV 700 Spektrometer mit einem TXI 5HCN Probenkopf mit jeweils mindestens 512 Inkrementen durchgeführt.

Die NMR-Spektren wurden mit 16K Datenpunkten und einer Anregungsbreite (sweep-width) von 9000 Hz aufgenommen. Die Daten wurden im Anschluß mit Hilfe der auf Matlab basierenden NMRLab-Software (Gunther *et al.*, 2000) prozessiert. Zur Unterdrückung des Wassersignals wurde der WAVEWAT-Algorithmus verwendet (Gunther *et al.*, 2002). Nach der Fourier Transformation wurde eine Basislinienkorrektur durchgeführt. Die Berechnung der Integrale erfolgte ebenfalls mit der Software NMRLab.

2.2.4.1.3 Saturation-Transfer-Difference-Messung

Die STD-Spektren wurden ebenfalls unter Verwendung der *watergate*- oder *excitation sculpting*-Wasserunterdrückung aufgenommen. Die Pulssequenz des verwendeten Pulsprogramms ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Die Frequenz der on-resonance-Sättigung wurde so gewählt, dass die Methylprotonen des Proteins angeregt werden, im Falle der 17 β HSD1 bei -300 Hz und im Fall der 17 β HSD2 bei -900 Hz. Die Frequenz der off-resonance-Sättigung betrug + 20000 Hz. Eine effiziente Sättigung wurde durch eine Sequenz von WURST-Pulsen bzw. GAUSS-Pulsen erreicht.

Für jeden Liganden wurde zur Abschätzung von Subtraktionsartefakten eine Kontrolle durchgeführt, bei der sowohl die on- als auch die off-resonance-Frequenz 20000Hz betragen.

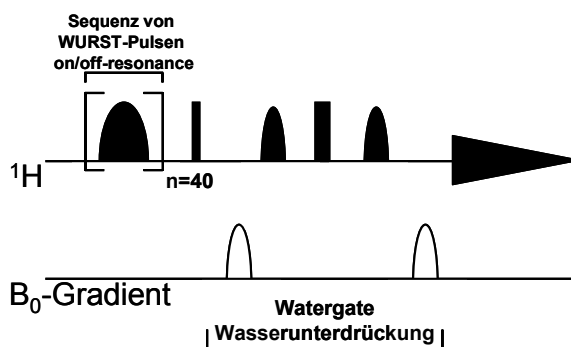


Abbildung 2.1: Pulsprogramm der STD-Messungen

2.2.4.2 ePHOGSY

Es wurden eindimensionale ePHOGSY (enhanced protein hydration observed through gradient spectroscopy)-Untersuchungen durchgeführt. Die Pulssequenz des verwendeten Pulsprogramms ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Eine Optimierung der Messparameter ergab für den ersten wasserselektiven 180° Puls eine Leistung von 43,5 dB und für die Mischzeit eine Dauer von $\tau_m = 600$ ms. Die Doppel-Spin-Echo-Sequenz nach der Mischzeit ermöglicht eine effiziente Unterdrückung der Wassersignale einerseits und eine Unterdrückung der Protein-Resonanzen, speziell bei großen Proteinen, aufgrund transversaler Relaxation andererseits.

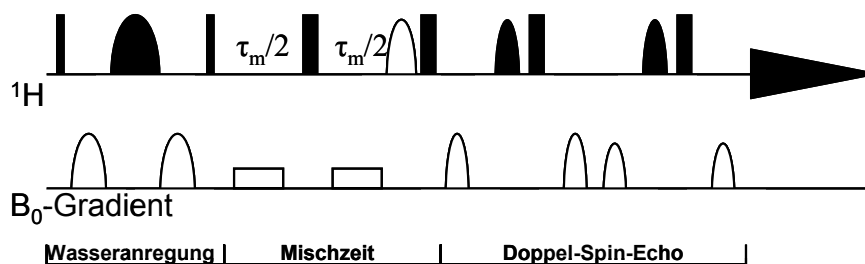


Abbildung 2.2: Pulsprogramm der ePHOGSY-Messung

2.2.5 Docking

Das Vorhandensein experimentell bestimmter, dreidimensionaler Kristallstrukturen der 17 β HSD1, kokristallisiert mit Substraten bzw. Inhibitoren, stellt eine ausgezeichnete Grundlage für eine strukturbasierte Untersuchung neuer Inhibitoren dar. Computergestützte Verfahren zur Vorhersage der optimalen Bindungsgeometrie von Liganden an Makromoleküle werden unter dem Begriff „Docking“ zusammengefasst, dabei hat sich „AutoDock“ (Morris *et al.*, 1998) als leistungsfähiges Programm bewährt.

AutoDock geht von einem starren Protein und einem vollkommen flexiblen Liganden aus und variiert einerseits die Bindungsgeometrie und andererseits die Konformation des Liganden. Als Ausgangsdaten werden die Strukturinformationen aus pdb-Dateien verwendet, denen polare Wasserstoffatome sowie -Ladungs- und Solvatisierungsparameter hinzugefügt werden. Um die Rechenzeiten zu beschleunigen, wird im Vorfeld ein Gitter erzeugt, das als Kubus über die Bindungstasche gelegt wird. Für jeden Gitterpunkt wird nun ein Testatom für jeden Atomtyp des Liganden eingesetzt und die auf ihn wirkende Energie berechnet. Gleiches wird für eine positive Ladung zur Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkung durchgeführt.

Die Ausgangsstrukturen (pdb-Dateien) für die Liganden wurden unter Berücksichtigung der Konformation in Corina (Molecular Networks GmbH) erzeugt. Anschließend wurden in AutoDock Gasteiger-Ladungen hinzugefügt.

Die Kristallstrukturen der 17 β HSD1 kokristallisiert mit Estradiol und NADP (1FDT, 1,7Å) und Dehydrotestosteron (1DHT, 2,24Å) aus der Protein-Data-Bank wurden für die Docking-Untersuchungen verwendet. Wasser und Liganden wurden manuell entfernt. In AutoDock wurden polare Wasserstoff-Atome, Kollmann-Ladungen und Solvationsparameter zugeordnet.

Die Anfangsstrukturen der Liganden wurden auf die Koordinaten der jeweiligen Substrate in der Kristallstruktur positioniert. Unter Verwendung von AutoGrid wurden Gitternetze mit 50x50x50 Punkten erzeugt, mit einem Abstand der Punkte von 0,353 Å. Das Zentrum wird entsprechend der Koordinaten der Bindungstasche positioniert.

Mit Hilfe eines sogenannten Lamarck'schen genetischen Algorithmus wird für jeden gegebenen Konformationsraum die Bindungsorientierung mit der niedrigsten Energie gesucht. Die Größe der Zufalls-Population betrug anfänglich 70 Individuen, die maximale Anzahl der Energieberechnungen 500000, die maximale Zahl der Generationen 30000. Der Elitismus betrug 1, die Mutations- und Crossover-Raten 0,02 bzw 0,8. Dieser genetische Algorithmus

wurde mit einem lokalen Suchalgorithmus kombiniert, dessen Wiederholungen auf 500 begrenzt wurden. Es werden jeweils 50 Durchgänge durchlaufen.

Nach dem Docking werden die entstandenen Strukturen mit einer Standardabweichung von 0,5 Å geclustert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Expression, Aufreinigung und Kinetik

Für die heterologe Expression der 17 β HSD1 in *E. coli* wurde von der Firma Solvay Pharmaceuticals Hannover ein Expressionsplasmid zur Verfügung gestellt, das für die Verwendung in *E. coli* geeignet ist und bereits die genetische Information für die humane 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 enthält. Am 3'Ende des *17 β hsd1*-Gens befindet sich die Sequenz für ein *his-tag*

Bei der Expression mit diesem Plasmid in *E. coli* XL10-Zellen zeigte sich nach dem Aufschluß der Zellen durch Ultraschall, dass die 17 β HSD1 vorwiegend in unlöslicher Form vorliegt. Zur Steigerung der Löslichkeit wurden verschiedene Expressionsparameter variiert, so z.B. eine Verringerung der Temperatur nach Induktion, um die Expression zu limitieren, die Optimierung der Induktionszeit oder die gleichzeitige Expression von Chaperonen zur Unterstützung der Proteinfaltung oder des lac-Repressors zur stringenten Repression. Keine der genannten Veränderungen konnte jedoch den Anteil löslicher 17 β HSD1 erhöhen. Aus diesem Grund wurden parallel drei Lösungsansätze verfolgt:

- Fusionierung der 17 β HSD1 mit diversen Proteinen, die sich als löslichkeitsvermittelnd bewiesen haben
- C-terminale Deletion der 17 β HSD1 um 43 Aminosäuren
- *in vitro*-Expression

Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die verwendeten Plasmide.

Tabelle 3.1: Übersicht über die verwendeten Expressionsplasmide

		pMalHSDa
Fusion	MBP	pMalHSDb
		pMalHSDc
	NusA	pET-NusA-HSD
	G-Protein	pET-G-HSD
C-term Verkürzung		pQEHS-D-C43C
		pQEHS-D-C43N
<i>in vitro</i> Expression		pIVEX HSD
		pIVEX MBP HSD

3.1.1 Fusion mit Löslichkeitsvermittlern

Zur Erhöhung der Löslichkeit der 17 β HSD1 wurden als Löslichkeitsvermittler das *maltose-binding protein*, das sog. NusA-Protein sowie die B1-Domäne des Protein G (G-Protein) verwendet. Die dafür benötigten Expressionsplasmide und die damit erzielten Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

3.1.1.1 Fusion mit dem *maltose-binding protein*

In pMal-Vektoren wird das gewünschte Gen stromabwärts des *malE* Gens aus *E. coli* eingefügt, das für das *maltose-binding protein* (MBP) codiert. Dies führt zur Expression eines MBP-Fusionsproteins (di Guan *et al.*, 1988; Maina *et al.*, 1988).

Die Vektoren pMalHSD a, b und c basieren alle auf dem Vektor pMal-c, der das *malE*-Gen bereits enthält. Am 3'-Ende des *malE*-Gens befindet sich im Vektor pMalHSD a eine Sequenz, die für ein *his-tag* codiert, gefolgt von der genetische Information für die Erkennungssequenz der TEV-Protease (*tobacco-etch-virus* TEV) und dem *17 β hsd1*-Gen (Abbildung 3.1). Im Vektor pMalHSD b ist die Position der genetischen Information für das *his-tag* und die TEV-Restriktionsschnittstelle vertauscht. Im Vektor pMalHSD c wurde stromabwärts der Sequenz für die TEV-Schnittstelle ein Linker eingefügt. Außerdem wurde das *his-tag* an das 3'-Ende des *17 β hsd1* Gens verschoben.

Die Expression erfolgte in *E. coli* XL10-Zellen bei 37°C. Vier Stunden nach Induktion mit 1 mM IPTG wurden die Zellen geerntet und mittels French Press aufgeschlossen. In allen Fällen war das Expressionsprodukt vollständig löslich.

Eine Coexpression der TEV Protease führt zwar zu einer Spaltung des Fusionsproteins in der Zelle *in vivo*, allerdings bleibt dabei nur das *maltose-binding protein* in Lösung, die 17 β HSD1 liegt in der Zelle in unlöslicher Form vor. Eine gleichzeitige Coexpression der TEV-Protease und von Chaperonen kann die Unlöslichkeit der 17 β HSD1 nach der Abspaltung vom *maltose-binding protein* nicht verhindern.

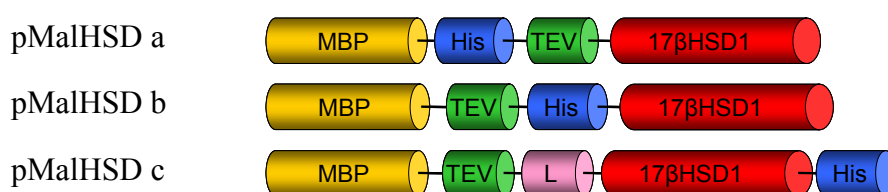


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Expressionsprodukte bei Expression mit pMalHSD-Vektoren

Wird das MBP-Fusionsprotein nach der Expression mit pMalHSD a oder b einer Affinitätschromatographie an Dextrin unterzogen, so kann es zu großer Homogenität aufgereinigt werden. Obwohl ein Teil des heterolog exprimierten Proteins aufgrund schwacher Bindung an die verwendete Säule verloren ging, lagen die Proteinausbeuten bei etwa 200 mg pro Liter Kulturvolumen. Trotz einer Optimierung der Pufferbedingungen, der verwendeten Proteinkonzentration und der Temperatur können die beiden Fusionsproteine nach Zugabe der Protease TEV gar nicht oder nur sehr unvollständig gespalten werden (pMalHSDa bzw. pMalHSDb).

Nach der unvollständigen Restriktion des Expressionsprodukts nach Expression mit pMalHSD b durch die TEV-Protease kann in einem zweiten Aufreinigungsschritt durch Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose das *maltose binding protein* abgetrennt werden. Aber trotz der Verwendung eines sehr flachen Gradienten war es nicht möglich, 17 β HSD1 und das verbliebene Fusionsprotein voneinander zu trennen.

Eine schwache Bindung der beiden Fusionsproteine an NiNTA-Material konnte durch eine Metallchelataffinitätschromatographie mit NiNTA Spin Columns nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluß zu, dass das *his-tag*, das sich zwischen dem MBP und der 17 β HSD1 befindet, schlecht zugänglich ist und daher keine optimale Bindung an die Säule ermöglicht.

Das Lysat nach Expression mit pMalHSD c kann aufgrund der besseren Zugänglichkeit des *his-tags* einer Metallchelataffinitätschromatographie an NiNTA unterzogen werden. Wie in Abbildung 3.2 zu erkennen, befindet sich eine erhebliche Menge des Fusionsproteins im Durchfluß. Das Eluat weist noch einige Verunreinigungen auf. Der darauf folgende Verdau mit

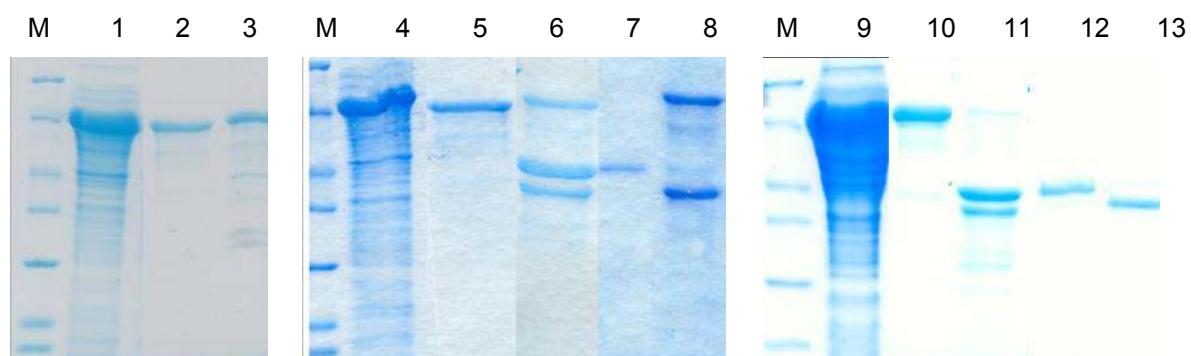


Abbildung 3.2: Reinigung der 17 β HSD1 nach Expression mit pMalHSD a (lane 1-3), pMalHSD b (lane 4-8) und pMalHSD c (lane 9-13); M: Marker; 1: lösliche Proteinfraction; 2: Eluat Dextrin; 3: Proteolyse mit TEV; 4: lösliche Proteinfraction; 5: Eluat Dextrin; 6: Proteolyse mit TEV; 7+8: Fraktionen Q-Sepharose; 9: lösliche Proteinfraction; 10: Eluat NiNTA; 11: Proteolyse mit TEV; 12+13: Fraktionen Q-Sepharose

der Protease TEV war meist nicht vollständig und wurde zur Erhöhung der Ausbeute systematisch optimiert (Kapitel 0) Dabei zeigte sich jedoch, dass nur die Erhöhung der TEV-Konzentration einen sichtbaren Unterschied brachte.

Im Falle eines vollständigen TEV-Schnitts konnten MBP und 17 β HSD1 zuverlässig durch einen zweiten Aufreinigungsschritt an NiNTA oder Q-Sepahrose voneinander getrennt werden, die 17 β HSD1 blieb dabei in Lösung.

Bei einem unvollständigen TEV-Verdau galt es nicht nur, das MBP und die 17 β HSD1 zu trennen, sondern auch das verbleibende ungeschnittene Fusionsprotein abzutrennen. Da beim Schnitt durch die TEV-Protease das *his-tag* an der 17 β HSD1 verbleibt, kann eine solche Trennung nicht durch NiNTA erfolgen. Hier kam eine Affinitätschromatographie an Amylose zum Einsatz, deren Trenneigenschaften aufgrund des Verlustes der Bindungskapazität bei mehrmaliger Verwendung allerdings drastisch abnahmen und die Kosten sehr hoch waren.

Nach Anreicherung mit den Isotopen ^{15}N und ^2D wurde vom ungeschnittenen Fusionsprotein (nach Expression mit dem Expressionsplasmid pMalHSD c) ein TROSY-Spektrum aufgenommen (Abbildung 3.3 A). Aufgrund des hohen Molekulargewichts des Proteins und der damit verbundenen Verkürzung der transversalen Relaxationszeit T_2 sind die Signalintensitäten und die spektrale Auflösung jedoch gering. Die wenigen scharfen Signale mit guter Dispersion aber geringer Intensität lassen sich vermutlich auf das *maltose-binding protein* zurückführen, das über einen flexiblen Linker an die 17 β HSD gebunden ist.

Zusätzlich wurde ein TROSY-Spektrum nach selektiver Anreicherung mit ^{15}N -markiertem

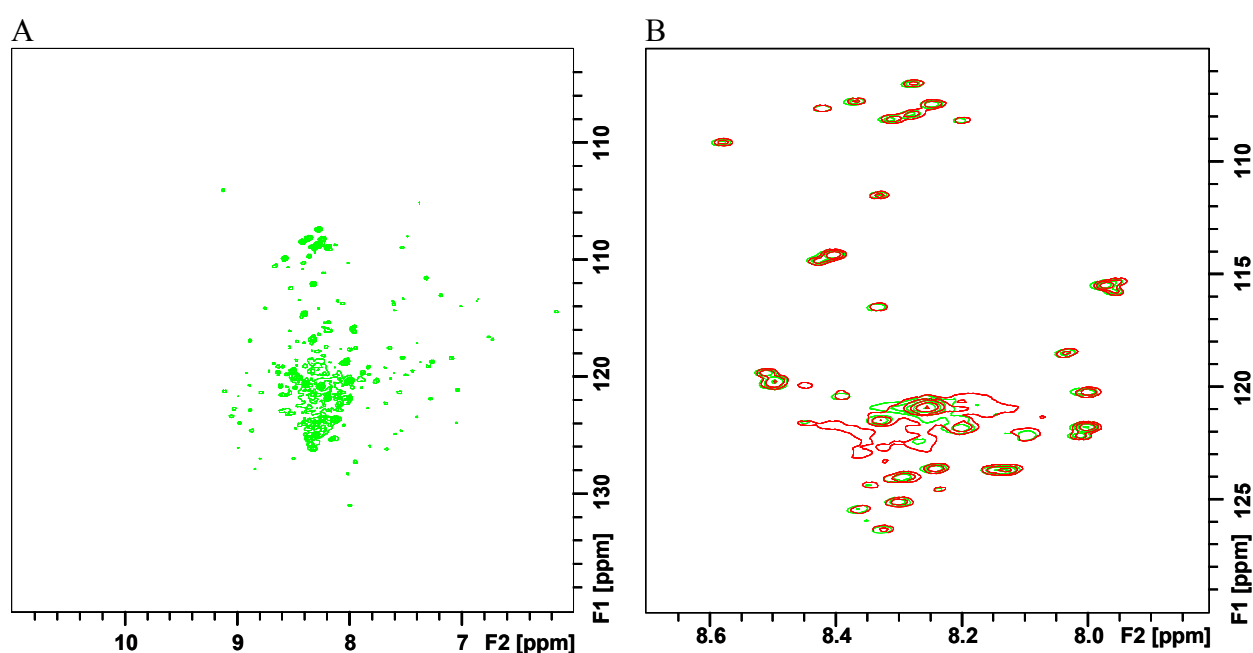


Abbildung 3.3: ^{15}N -TROSY-Spektren des MBP-17 β HSD1-Fusionsproteins

Lysin erstellt. Das MBP-HSD-Fusionsprotein enthält 45 Lysine, davon 36 im *maltose-binding-protein* und 9 in der 17 β HSD1. Das Spektrum zeigt etwa 30 Peaks mit guter Dispersion, jedoch auch einen Bereich mit nur schwacher spektraler Auflösung (Abbildung 3.3 B). Nach Zugabe von 200 μ M Estron sind keine Verschiebungen im Spektrum zu beobachten, so dass der Schluß nahe liegt, dass die dispersiven Peaks dem *maltose-binding protein* zuzuordnen sind, während die Signale der 17 β HSD1 schlecht aufgelöst sind.

3.1.1.2 Fusion mit NusA

Für das in Abbildung 3.4 A dargestellte Expressionsprodukt des Vektors pETNusA-HSD diente als Ausgangsvektor pET43.1, der bereits das Gen für das NusA-Protein. (*N-utilisation substance protein A*) enthält, an dessen 3'-Ende sich die Sequenz für ein *his-tag* befindet, gefolgt von Erkennungssequenzen für die Proteasen Thrombin und Enterokinase. Im Anschluss daran wurde das *17 β hsd1*-Gen inseriert.

Mit dem Plasmid pETNusAHSD transformierte *E. coli* BL21DE3Star-Zellen wurden bis zur Induktion der Expression bei 30°C inkubiert, anschließend wurde die Temperatur auf 20°C reduziert. Nach einer Induktionszeit von 18 h wurde das Zelllysate nach Zellaufschluss mittels French Press einer Metallchelataffinitätschromatographie an NiNTA unterzogen. Die Ausbeute betrug dabei ca 25-30ml/l Kultur. Das Fusionsprotein wurde unmittelbar nach der Aufreinigung einer Proteolyse mit der Protease Thrombin unterzogen (Abbildung 3.4). Weitere Aufreinigungsschritte nach dem Verdau mit Thrombin durch Gelfiltration mit Superdex 200 oder Metallchelataffinitätschromatographie schlugen fehl, da die 17 β HSD1 unter den gegebenen Bedingungen aggregierte.

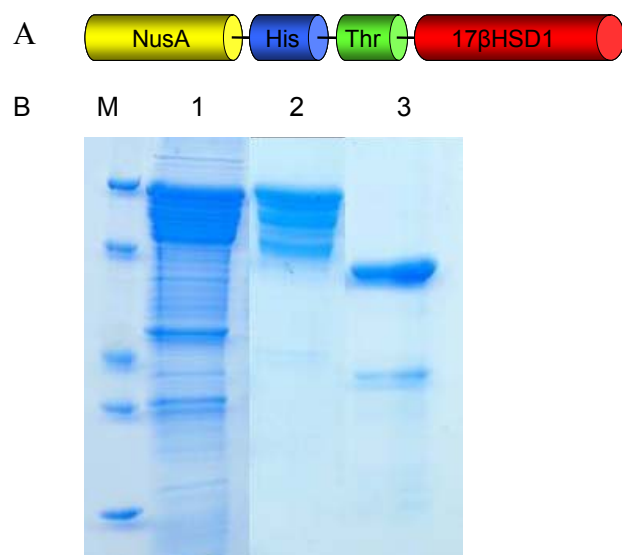


Abbildung 3.4:

A: Schematische Darstellung des Expressionsprodukts bei Expression mit pET NusA HSD

B: Reinigung der 17 β HSD1 nach Expression mit pNusA-HSD;

1: lösliche Proteinfraction,

2: EluatNiNTA

3: Proteolyse mit Thrombin

3.1.1.3 Fusion mit Protein G



Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des Expressionsprodukts bei Expression mit pET G HSD

Der Vektor pET-G enthält bereits das Gen für die B1-Domäne des Proteins G, an dessen 3'-Ende das Gen für die 17βHSD1 inseriert wurde (Abbildung 3.5). Für die Expression wurden mit dem Plasmid pET-G-HSD

transformierte *E. coli* BL21-DE3-Star-Zellen bei 37°C inkubiert. Nach der Induktion der Expression durch die Zugabe von IPTG wurde die Temperatur auf 20°C reduziert. Die Analyse des Expressionsverhaltens ergab eine optimale Expressionsdauer von etwa 18 h.

Nach dem Zellaufschluss durch French Press wurde das Zelllysat einer Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose unterzogen. Die Analyse durch SDS-PAGE (Abbildung 3.6) zeigt, dass das G-HSD-Fusionsprotein noch zu 10-20 % verunreinigt ist. Um diese Verunreinigungen abzutrennen, wurde das Fusionsprotein durch eine Ausschlußchromatographie mit Superdex 200 weiter aufgereinigt (Abbildung 3.7). Ein Western Blot mit Antikörpern gegen 17βHSD1 zeigt die Spezifität.

Um den Einfluss von Glycerin auf die Stabilität der 17βHSD zu untersuchen wurde die Gelfiltration unter sonst identischen Bedingungen dreimal mit jeweils unterschiedlichen Glycerin-Konzentrationen (0 %, 10 % und 20 %) durchgeführt. Der Vergleich der Elutionsprofile (Abbildung 3.7) macht deutlich, dass in Abwesenheit von Glycerin die 17βHSD1 fast vollständig aggregiert, so dass die Proteinaggregate im Ausschlussvolumen zu finden sind. Bei Zugabe von mindestens 10 % Glycerin kann dieser Vorgang unterbunden werden.

Nach Anreicherung mit den stabilen Isotopen ¹⁵N und ²D wurde von dem G-17βHSD1-

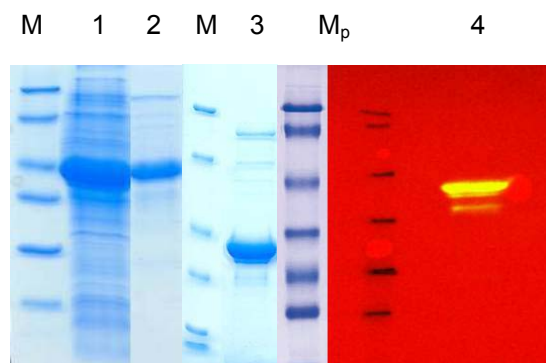


Abbildung 3.6: Reinigung der 17βHSD1 nach Expression mit pET-G-HSD
M: Marker; 1: lösliche Proteinfraktion; 2: Eluat Q-Sepharose; 3: GF bei 10%Glycerin; 4: Western Blot

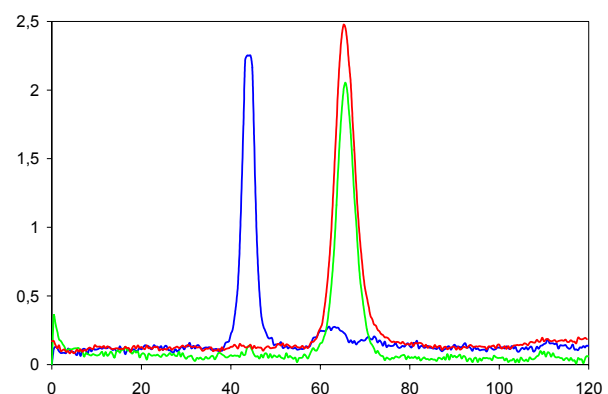


Abbildung 3.7: Ausschlußchromatographie an Superdex 200 unter Variation der Glycerinkonzentration; blau: 0% Glycerin; grün: 10%Glycerin; rot: 20% Glycerin

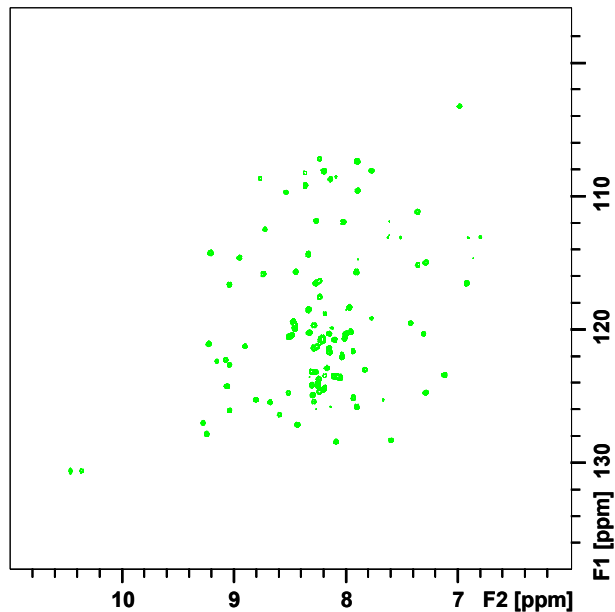


Abbildung 3.9: ^{15}N -TROSY-Spektren des NusA- $17\beta\text{HSD1}$ -Fusionsproteins

Fusionsprotein ein TROSY-Spektrum aufgenommen. Das in Abbildung 3.9 dargestellte Spektrum zeigt nur einige scharfe Signale mit guter Dispersion, die einen Bereich breiter Linien mit geringer Dispersion und geringer Intensität überlagern. Die Anzahl der gut aufgelösten Signale legt den Schluß nahe, dass sich nur eine Domäne des gesamten Proteins, verbunden über einen ausreichend flexiblen Linker, unabhängig vom Rest bewegen kann und damit eine kleinere Rotationskorrelationszeit aufweist als der übrige Teil des Proteins. Dabei handelt es sich vermutlich um das Protein G. Dass eine

Aggregation des Fusionsproteins zu der fehlenden Dispersion führt, obwohl in der Gelfiltration der dimerisierte Zustand unter den gegebenen Pufferbedingungen beobachtet wurde, ist auf die deutlich höhere Konzentration des Proteins unter NMR-Bedingungen zurückzuführen.

3.1.2 C-terminale Deletion

Für die Untersuchung der Auswirkungen auf die Löslichkeit durch eine C-terminale Verkürzung der $17\beta\text{HSD1}$ um 43 Aminosäuren wurden zwei Konstrukte erstellt. Beim einen befindet sich die genetische Information für das *his-tag* am 5'-Ende des $17\beta\text{hsd1}$ Gens (pQE-HSD-C43C), beim anderen am 3'-Ende (pQE-HSD-C43N). Die Abbildung 1.9 zeigt die schematische Darstellung der beiden Expressionsprodukte.

Mit den Plasmiden pQE-HSD-C43C und pQE-HSD-C43N transformierte *E. coli* XL1-Zellen wurden bei 37°C inkubiert. Nach Induktion der Proteinexpression durch die Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Temperatur auf 20°C gesenkt. Vier Stunden nach Induktion wurden die Zellen geerntet und mittels French Press aufgeschlossen. In beiden Fällen findet eine deutliche



Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Expressionsprodukte bei Expression mit pQE-HSD-C43-Vektoren

Überexpression statt, allerdings liegt nur die C-terminal verkürzte $17\beta\text{HSD1}$ mit dem C-terminalen *his-tag* in löslicher Form vor (Abbildung 3.11 A). Das Lysat nach Expression mit dem Vektor pQE-HSD-C43C wurde zur

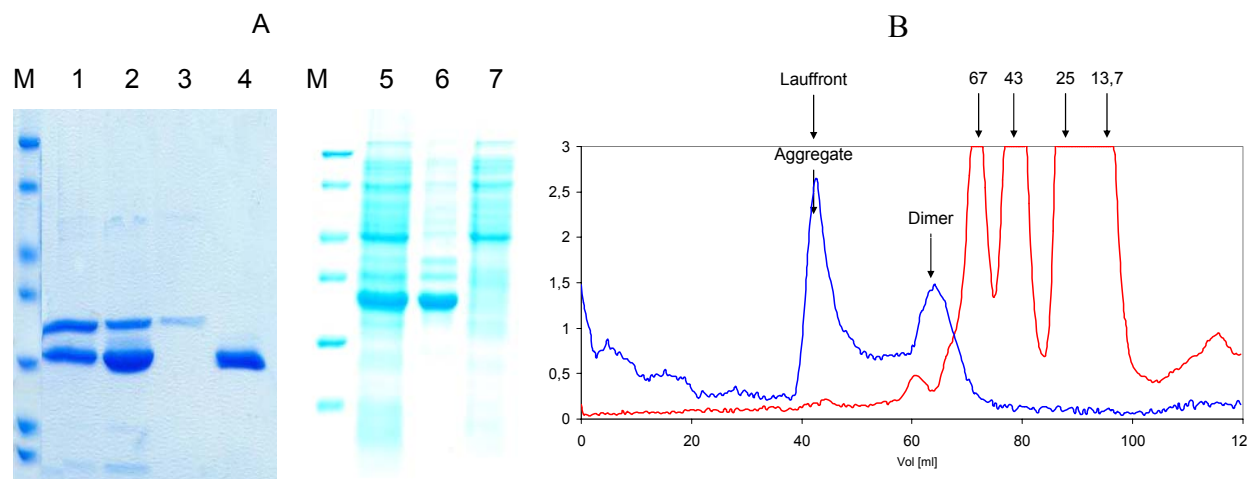


Abbildung 3.11 A: Reinigung der 17 β HSD1 nach Expression mit pQEHSDC43C (lane 1-4) und pQEHSDC43N (lane 5-7); 1: EluatNiNTA; 2: Eluat nach Lagerung \ddot{U} N; 3: Gelfiltration Peak 1; 4: Gelfiltration Peak 2; 5: Lysat; 6: Pellet; 7: lösliche Proteinfraction

B: Ausschlußchromatographie an Superdex 200 rot: Kalibrierung; blau: C-terminal verkürzte 17 β HSD1

Aufreinigung einer Metallchelataffinitätschromatographie an NiNTA unterzogen.

In Abbildung 3.11 A (lane 1) ist zu erkennen, dass die um 43 Aminosäuren verkürzte 17 β HSD1 in nur einem Schritt zu großer Homogenität aufgereinigt werden kann, allerdings deutet die

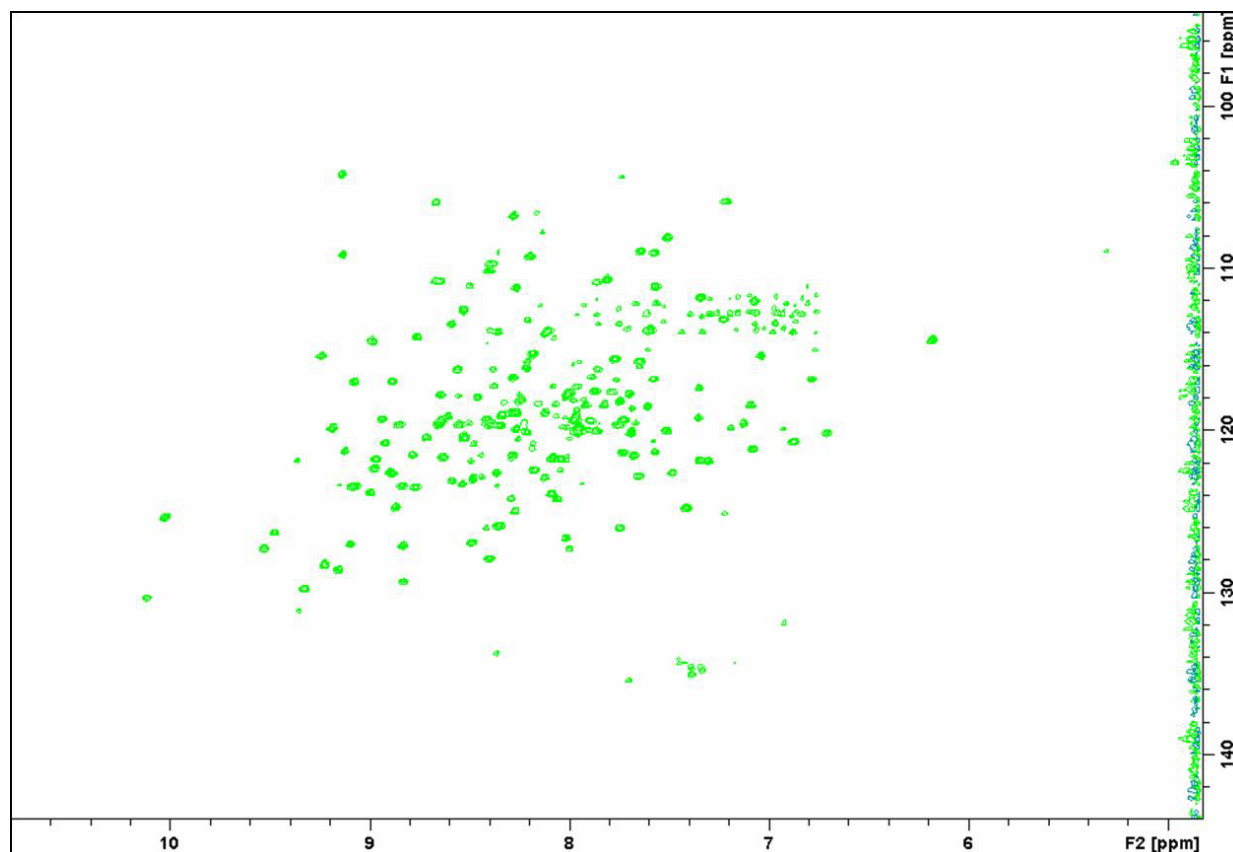


Abbildung 3.10: 15 N-TROSY-Spektren der C-terminal verkürzten 17 β HSD1

zweite Bande auf ein Abbauprodukt der bereits verkürzten 17 β HSD1 hin. Bei längerer Lagerung schreitet dieser Abbau weiter fort bis schließlich die 17 β HSD1 vollständig zu dem noch kürzeren Produkt abgebaut ist.

Um die beiden Produkte zu separieren und deren Größe abzuschätzen, wurde eine Gelfiltration mit Superdex 200 durchgeführt. Abbildung 3.11 B zeigt, dass das Abbauprodukt, das im zweiten Peak eluiert wurde, als Dimer vorliegt, während die um 43 Aminosäuren verkürzte 17 β HSD1 im Ausschlussvolumen eluiert wurde und demnach große Aggregate bildet.

Das TROSY-Spektrum Abbildung 3.10 der C-terminal verkürzten 17 β HSD1 zeigt schmale Linien mit guter Dispersion und großer Intensität. Eine nachträgliche Analyse der untersuchten Proteinprobe zeigte jedoch, dass es sich hierbei ebenfalls um das Produkt des proteolytischen Abbaus handelt

3.1.3 in vitro-Expression

Bei der zellfreien Proteinsynthese muss für eine erfolgreiche Translation der gesamte Translationsapparat (Ribosomen, TRNAs, Aminoacyl-tRNA Synthetasen (ARS), Initiationsfaktoren (IF), Elongationsfaktoren (EF) und Releasefaktoren (RF)) zur Verfügung stehen. Wenn außerdem statt mRNA eine DNA (z.B. Plasmid-DNA) als Template eingesetzt werden soll, müssen auch die Komponenten des Transkriptionsapparates (DNA-Polymerase, Transkriptionsfaktoren (TF)) vorhanden sein. Dazu kann einerseits jede einzelne Komponente aufgereinigt werden (Shimizu *et al.*, 2001) oder es wird ein zytosolischer Extrakt einer Zellkultur verwendet, der alle essentiellen Proteine des Zellapparates enthält (Zubay, 1973).

Als energieregenerierende Systeme dienen Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvatkinase (PK) sowie Acetylphosphat (AcP) und Acetat-Kinase (AckA). Da die DNA als Template zum Einsatz kommt werden neben Aminosäuren noch NTP's und eine für den verwendeten Promotor geeignete RNA-Polymerase (hier T7-RNA-Polymerase) benötigt.

Die *in vitro*-Expression erfolgte in einem Microdialyser als „Continuous Exchange Cell-Free“ (CECF)-Variante. Ein CECF-System besteht aus einem einfachen Dialysesystem, in dem eine räumliche Trennung in Reaktionslösung und Feedinglösung stattfindet. Die Reaktionslösung ist der Ort der Proteinsynthese und beinhaltet alle hierzu notwendigen Komponenten. Die

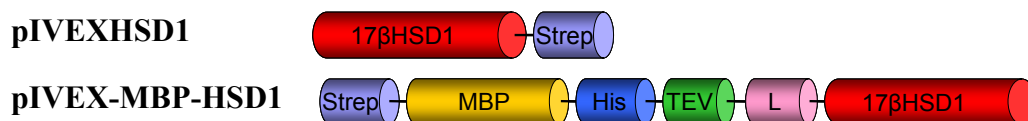


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des Expressionsprodukts bei Expression mit pIVEXHSD1 und pIVEX-MBD-HSD1

Feedinglösung besteht ausschließlich aus den Versorgungskomponenten (Aminosäuren, NTPs, PEP, AcP und dem entsprechenden Puffer). Die beiden Lösungen werden durch eine Dialysemembran voneinander separiert, die den Austausch von niedermolekularen Versorgungssubstanzen (ATP, NTPs, Aminosäuren) gestattet. Gleichzeitig werden hochmolekulare Substanzen der Reaktionslösung in der Reaktionskammer zurückgehalten. Die Dialyse der Reaktionslösung erfolgt gegen ein vielfaches Volumen an Feedinglösung, wobei das gesamte System ständig geschüttelt wird, um Konzentrationsunterschiede innerhalb der Lösungen zu vermeiden.

In pIVEX-Vektoren (pIVEX, Plasmid für die *in vitro* Expression) steht die Transkription unter der Kontrolle des T7-Promotors, da bei der zellfreien Proteinsynthese die T7-Polymerase zum Einsatz kommt.

Für den Vektor pIVEX-HSD1 wurde das *17βhsd1*-Gen, an dessen 5'-Ende sich die der genetischen Information für ein Strep-tag befindet, in den Vektor pIVEX2.3MCS inseriert.

Der Vektor pIVEX-MBP-HSD1 geht ebenfalls auf den Vektor pIVEX2.3 MCS zurück. Das *17βhsd1*-Gen wurde mit Hilfe der Primer 8 und 9 aus dem Plasmid pMalHSD3 amplifiziert und anschließend mit KpnI und XhoI restringiert. Dieses Insert wurde dann in den ebenfalls KpnI/XhoI-geschnittenen Vektor pIVEXMBP-HSD2 kloniert, der das malE-Gen enthält, an dessen 5'-Ende sich die genetische Information für ein Strep-tag befindet (Abbildung 3.12). Die Sequenz zwischen malE-Gen und *17βhsd1*-Gen entspricht der beschriebenen Sequenz im Vektor pMalHSD C.

In Abbildung 3.13 A sind die Ergebnisse der *in vitro* Expression des Plasmids pIVEXHSD1 dargestellt. Es ist keine deutliche Überexpression der *17βHSD1* zu erkennen. Wie in Abbildung

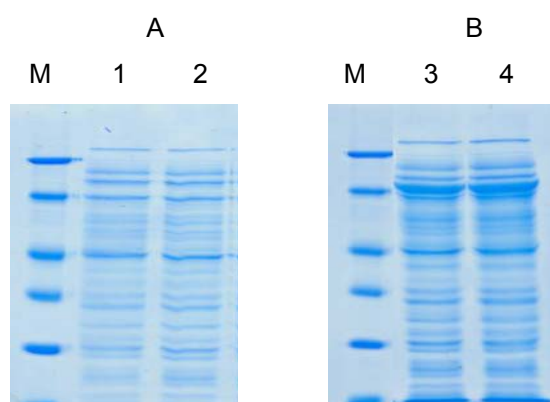


Abbildung 3.13: : *in vitro* Expression mit pIVEXHSD1 (A) und pIVEXMBPHSD (B)

A: Suspension (1), Überstand (2);

B: Suspension (3) und Überstand (4)

3.13 B zu sehen, findet bei der Verwendung des Plasmids pIVEXMBPHSD1 eine deutliche zellfreie Proteinexpression des Fusionsproteins aus MBP und *17βHSD1* statt. Von einer zellfreien Expression im präparativen Maßstab und anschließender Aufreinigung wurde jedoch abgesehen, da das MBP-HSD-Fusionsprotein bei der heterologen Expression in *E. coli* in großen Mengen kostengünstig zu erhalten ist.

3.1.4 Kinetische Messungen

Bei der heterologen Expression eines Enzyms ist die Untersuchung der katalytischen Aktivität von großer Bedeutung. Diese kann bei der 17 β HSD1 indirekt durch die Änderung der Absorption bei 340 nm aufgrund der Umsetzung der Cofaktoren NADP⁺ bzw NADPH verfolgt werden. Bei der Auswertung der kinetischen Messungen wurde die Theorie der Michaelis-Menten-Kinetik zugrundegelegt. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und k_{cat} wurde die Anfangsgeschwindigkeit v_0 in Abhängigkeit der Substratkonzentration $[S_0]$ ermittelt. Dabei wurde die Substratkonzentration zwischen 8 μ M und 100 μ M bei der Oxidation und zwischen 14 μ M und 100 μ M bei der Reduktion variiert. Die Anfangsgeschwindigkeit wurde aus der Steigung des linearen Teils der Kinetiken („first order plot“) bestimmt. Mit den so bestimmten Anfangsgeschwindigkeiten wurden K_M und k_{cat} durch Auftragung der Meßdaten nach Lineweaver-Burk bzw. Eadie-Hofstee erhalten. Diese linearisierten Darstellungen der Michaelis-Menten-Gleichung ermöglichen die Bestimmung der kinetischen Parameter sind aber fehlerbehaftet. So wird bei der Darstellung nach Lineweaver Burk der niedere Substratbereich überbewertet, während bei der Darstellung nach Eadie-Hofstee die Variable v_0 in den Maßstab für beide Achsen eingeht. Um den Einfluß dieser Fehler zu minimieren, wurden jeweils beide Methoden verwendet.

Tabelle 3.2: kinetische Konstanten der 17 β HSD1

	K_M [μ M]	k_{cat} [1/sec]
Oxidation		
Estradiol \rightarrow Estron	3,12 μ M	7,746 $\cdot 10^3$
Reduktion		
Estron \rightarrow Estradiol	69,05 μ M	1,37 $\cdot 10^4$

Die in Tabelle 3.2 angegebenen kinetischen Konstanten stehen in guter Übereinstimmung zu den in der Literatur veröffentlichten Konstanten. Für die 17 β -Oxidation von Estradiol variieren die Werte zwischen 1,5 und 10,4 μ M, für die Reduktion von Estron werden Werte zwischen 0,9 und 8,6 μ M angegeben (Mazza *et al.*, 1998; Puranen *et al.*, 1997; Strickler *et al.*, 1981; Tobias *et al.*, 1982).

Zusätzlich zu den eben dargestellten Kinetiken, die der Bestimmung der kinetischen Parameter dienen, wurden weitere kinetische Messungen in Gegenwart einiger Inhibitoren durchgeführt, die in Abbildung 3.14 dargestellt sind, aber nicht quantifiziert werden.

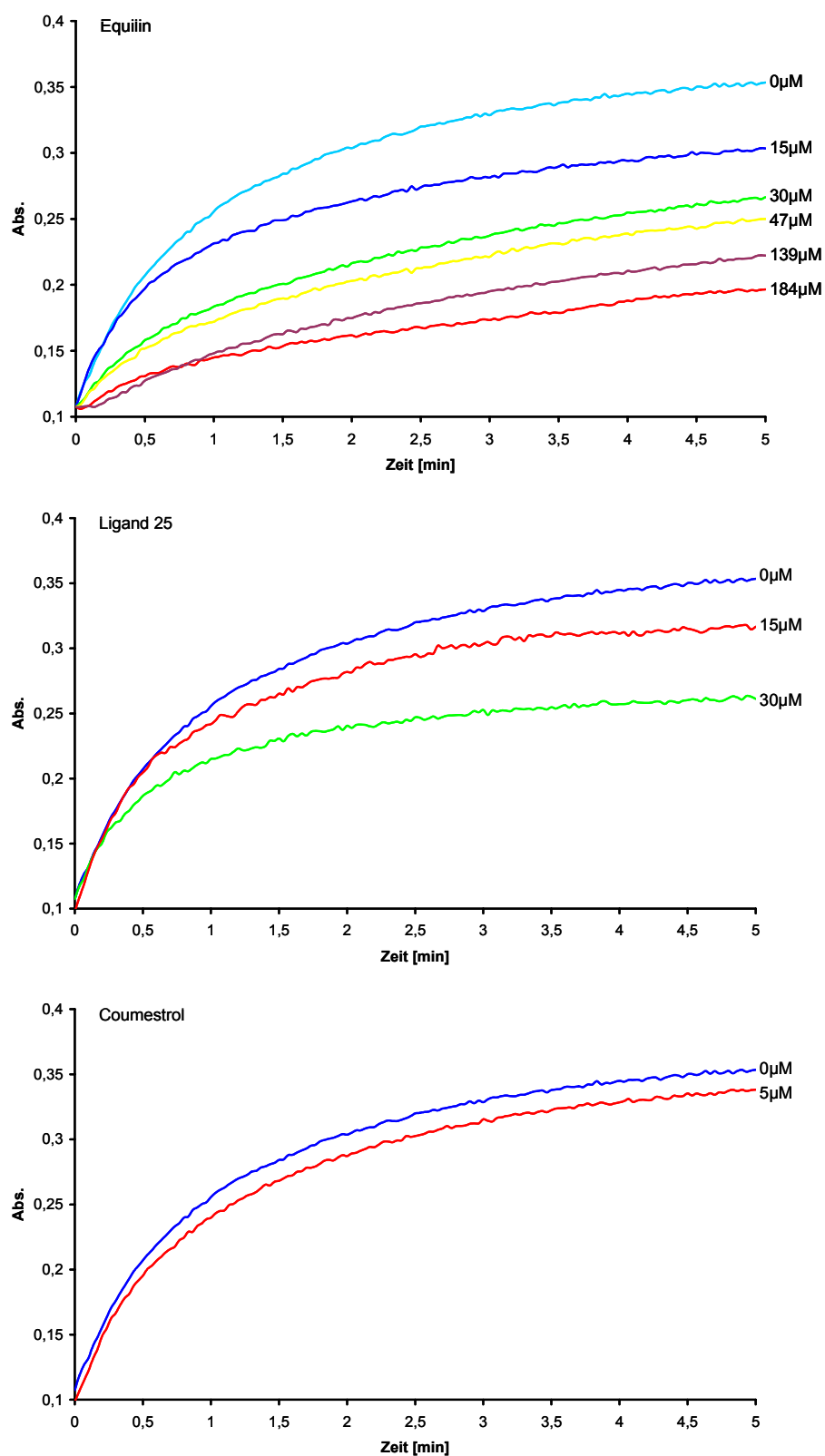


Abbildung 3.14: Darstellung der oxidativen Aktivität der 17βHSD1 in Abhängigkeit von der Inhibitor-Konzentration

3.1.5 Schlussfolgerungen

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die 17 β HSD1 entweder direkt aus menschlicher Plazenta gewonnen (Langer und Engel, 1958; Lin *et al.*, 1992) oder die Expression erfolgte heterolog unter Verwendung von sf9 Insektzellen, die durch ein Baculovirussystem infiziert wurden (Breton *et al.*, 1994; Mazza *et al.*, 1998; Sawicki *et al.*, 1999). Eine heterologe Expression in *E. coli* ist für die Verwendung des Zielproteins für NMR-Messungen von Vorteil, da sie nicht nur kostengünstiger und mit geringerem präparativem Aufwand durchzuführen ist, sondern bereits Systeme zur spezifischen Isotopenmarkierung etabliert sind und meist eine höhere Expressionsrate erzielt werden kann.

Das von der Firma Solvay Pharmaceuticals Hannover zur Verfügung gestellte Expressionsplasmid pQEHS1 enthält die genetische Information für die humane 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1. Unter Verwendung dieses Plasmids konnte trotz einer Variation der Expressionsbedingungen keine Expression der 17 β HSD1 in löslicher Form erreicht werden.

Obwohl es sich bei der 17 β HSD1 um ein cytosolisches Protein handelt, hat es eher hydrophoben Charakter und wird demnach in *E. coli* in aggregierter Form als Einschlußkörperchen sog. „*inclusion bodies*“ exprimiert. Es mussten andere Methoden zur Steigerung der Löslichkeit gefunden werden. Dazu bieten sich verschiedene Lösungsansätze an. Eine häufig verwendete Methode ist die Fusionierung des Zielproteins mit löslichkeitsvermittelnden Proteinen.

Das *maltose-binding protein* (MBP) aus *E. coli* ist bekannt für seine Eigenschaft, die Löslichkeit an das MBP-fusionierter Proteine bei der Expression in *E. coli* zu erhöhen (Fox *et al.*, 2001; Fox und Waugh, 2003; Kapust und Waugh, 1999; Kapust und Waugh, 2000; Pryor und Leiting, 1997). In pMal-Vektoren wird das gewünschte Gen stromabwärts des *malE* Gens aus *E. coli* eingefügt, das für das MBP codiert. Durch die Deletion der Signalsequenz kann die Sekretion in das Periplasma verhindert und das Fusionsprotein intrazellulär akkumuliert werden. Die spezifische Bindung des *maltose-binding proteins* an Dextrin bzw. Amylose ermöglicht eine einfache Aufreinigung. Bei der Verwendung der pMal-Plasmide konnten sehr hohe Expressionsraten (~200mg/l) erzielt werden. Das MBP-HSD1-Fusionsprotein wurde vollständig in löslicher Form exprimiert. Das *maltose-binding protein* besteht allerdings aus 369 Aminosäuren und muss, wie im TROSY-Spektrum zu erkennen, für strukturelle Untersuchungen während der Aufreinigung vom Fusionspartner abgespalten werden. Eine Spaltung des Fusionsproteins gestaltete sich jedoch aufgrund der schlechten Zugänglichkeit der TEV-

Restriktionsstelle als schwierig, erst das Einfügen eines *linkers* ermöglichte eine meist nicht vollständige Spaltung. Eine chromatographische Trennung der Spaltprodukte ließ sich durch die Assoziation der geschnittenen 17 β HSD an noch verbliebenes Fusionsprotein (Dimerisierung oder Bildung größerer Aggregate) nur unvollständig bewältigen. Für STD-Untersuchungen eignete sich das Expressionsprodukt des Vektors pMalHSD c, da es in einem Schritt zu großer Homogenität aufgereinigt werden konnte.

Bei einer systematischen Suche nach Löslichkeitsvermittelnden Proteinen in *E. coli* fanden Wilkinson und Harrison (Davis *et al.*, 1999; Wilkinson und Harrison, 1991) NusA (*N utilisation substance protein A*) als potenten Löslichkeitsvermittler. Mit 485 Aminosäuren weist NusA allerdings ein noch größeres Molekulargewicht auf als MBP (Davis *et al.*, 1999). Das NusA-17 β HSD1-Fusionsprotein konnte mit ebenfalls hohen Expressionsraten exprimiert werden, eine Spaltung durch Thrombin war ebenfalls möglich, doch die 17 β HSD1 aggregierte unter den gegebenen Bedingungen.

Im Gegensatz zur Kristallographie wo die Verwendung von Fusionsproteinen aufgrund der meist hohen Beweglichkeit des Tags die Kristallisation und die Strukturbestimmung beeinflusst, ist bei NMR-Untersuchungen eine Verwendung von Tags nur aufgrund der limitierten Masse eingeschränkt. Die 56 Aminosäuren umfassenden B1-Domäne des Proteins G ist als stabiles und sehr gut lösliches Protein bekannt. In diversen Beispielen konnte gezeigt werden, dass eine Fusion mit diesem Protein die Löslichkeit des Fusionspartners signifikant steigern kann und NMR-Untersuchungen des gesamten Komplexes ermöglicht (Gronenborn *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 2001). Unter Verwendung des Proteins G als Löslichkeitsvermittler konnte die 17 β HSD1 in löslicher Form exprimiert werden. In Gegenwart von 10% Glycerin liegt das Fusionsprotein in dimerisierter Form vor. Nach Isotopenmarkierung wurde im TROSY-Spektrum jedoch deutlich, dass das Fusionsprotein selbst in Gegenwart von 10% Glycerin bei der hohen Proteinkonzentration, die für NMR-Zwecke von Nöten ist, aggregiert. Eine Optimierung der Pufferbedingungen hinsichtlich der Stabilität des Fusionsproteins ist erstrebenswert.

Am C-Terminus der 17 β HSD1 befindet sich ein 43-Aminosäuren umfassendes Segment, dessen Struktur aufgrund der diffusen Elektronendichte kristallographisch nicht zu bestimmen ist. Dieses Segment ist reich an Alanin-, Glycin- und Prolin-Resten und enthält sich wiederholende Ala-Gly Sequenzen, auf die das Fehlen einer Sekundärstruktur und die hohe Beweglichkeit zurückzuführen sein könnten. Eine C-terminale Deletion dieses Bereichs könnte sich demnach positiv auf die Löslichkeit des gesamten Proteins auswirken. Nach der Expression der C-terminal

um 42 Aminosäuren verkürzten 17 β HSD1, deren Löslichkeit deutlich gesteigert war, wurde das Expressionsprodukt trotz der Verwendung von Protease-Inhibitoren proteolytisch abgebaut. Das Endprodukt lag nach wie vor in dimerisierter Form vor und ergab ein ausgezeichnetes TROSY-Spektrum mit guter Dispersion.

Die Dimerisierung der beiden Untereinheiten der 17 β HSD1 wird durch die beiden Helices α E und α F (AS105-131 bzw. 153-175) vermittelt. Selbst im Abbauprodukt des proteolytischen Abbaus sind diese beiden Helices aufgrund ihrer Position mitten in der Polypeptidkette vermutlich noch vorhanden, so dass eine Dimerisierung, wie in der Gelfiltration beobachtet, noch stattfindet.

Zwei der Helices, die das Ende der Substratbindungstasche bilden, α G' und α H, haben einen amphiphilen Charakter. Zusammen mit der hydrophoben Helix α H' liegen sie coplanar. Für eine solche Anordnung wird eine mögliche Membran-Assoziierung postuliert (Ghosh *et al.*, 1995). Wenn der proteolytische Abbau C-terminal vonstatten geht, so würde ein Teil dieser Helix-Anordnung verloren gehen, was mit einer Steigerung der Löslichkeit verbunden sein könnte. Zusätzlich würde dabei ein Teil der Steroid-Bindungstasche fehlen, die von diesen Helices begrenzt wird, wodurch das Fehlen chemischer Verschiebung nach Zugabe von Estradiol erklärt werden könnte.

Die zellfreie Synthese von Proteinen *in vitro* (Spirin, 2004; Spirin *et al.*, 1988) stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Lösung von Problemen dar, die bei der heterologen Expression rekombinanter Proteine *in vivo* auftreten und die Ausbeute erheblich verringern können. Darunter fallen unter anderem die Bildung von Einschlusskörperchen, sog. *inclusion bodies* aufgrund der Unlöslichkeit des Proteins im Zellmilieu, der proteolytische Abbau des Proteins oder seiner mRNA durch wirtseigene Proteasen bzw. RNAsen und eine mögliche zytotoxische Wirkung des Proteins auf die Wirtszelle. Durch eine Optimierung der Reaktionslösung z.B. durch Zugabe von Detergenzien oder Protease- und RNase-Inhibitoren kann hier direkt Einfluß auf die Expression rekombinanter Proteine genommen werden. Allerdings erfordert dieses System einen hohen technischen Aufwand, da der gesamte zelluläre Apparat, der für die erfolgreiche Transkription und Translation erforderlich ist, zur Verfügung stehen muss.

Nur bei der zellfreien Expression des MBP-17 β HSD1-Fusionsproteins zeigte sich eine sichtbare Überexpression, die zellfreie Synthese der 17 β HSD1 hingegen war äußerst gering. Eine weitgehende Optimierung der Reaktionsbedingungen durch Hinzufügen verschiedener

Detergenzien könnte sich positiv auf die Expression und die Löslichkeit der 17 β HSD1 auswirken.

Für STD-NMR- und ePHOGSY-Experimente ist die Verwendung des 17 β HSD-MBP-Fusionsproteins vorteilhaft, da dieses Fusionsprotein mit hoher Expressionsrate in löslicher Form exprimiert und anschließend in nur einem Schritt zu großer Homogenität aufgereinigt werden kann.

Für Protein-basierte NMR-Untersuchungen ist eine weitere Optimierung der Pufferbedingungen hinsichtlich einer besseren Löslichkeit durch eine weitere Erhöhung der Glycerin-Konzentration oder durch den Zusatz von Detergenzien sowohl bei dem um 43 Aminosäuren verkürzten Konstrukt als auch bei der G-Protein-gekoppelten 17 β HSD1 anzustreben.

3.2 Ligandenbindung

Die Wechselwirkung zwischen einem Protein und seinem Liganden bedingt häufig die biologische Funktion des Proteins, so dass eine genaue Kenntnis der Protein-Liganden-Interaktion essentiell ist für deren Verständnis. Von besonderem Interesse sind dabei Protein-Liganden-Wechselwirkungen, die eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese einzelner Krankheiten einnehmen. Das Verständnis der Prinzipien nach denen eine solche Bindung erfolgt, ermöglicht die Identifizierung, Optimierung und Klassifikation von Wirkstoffkandidaten für neue Pharmaka und dadurch bedingt die Entwicklung von Leitsubstanzen (Meyer und Peters, 2003).

In der Vergangenheit fanden NMR-Techniken zu diesem Zweck vermehrt Anwendung (Stockman und Dalvit, 2002). Im Wesentlichen existieren zwei Ansätze: Der erste basiert auf Effekten, die bei der Protein-Liganden-Wechselwirkung am Liganden zu beobachten sind, und beruht damit zumeist auf NOE-Effekten (z.B. *saturation transfer difference* STD oder *enhanced protein hydration observed through gradient spectroscopy* ePHOGSY) der zweite konzentriert sich auf die Änderung der chemischen Verschiebung von Protein-Signalen aufgrund der Ligandenbindung (*structure-activity-relationship* SAR by NMR) (Hajduk *et al.*, 1997; Shuker *et al.*, 1996).

Mit den von der Firma Solvay Pharmaceuticals, Hannover zur Verfügung gestellten Liganden wurden STD-NMR-Untersuchungen sowohl an der 17 β HSD1 als auch an der 17 β HSD2 durchgeführt. Für jede NMR-Probe wurden ein ein-dimensionales Referenz- sowie ein ein-dimensionales „saturation transfer difference“ (STD)-Spektrum aufgenommen.

Die Auswertung der STD-Spektren erfolgt durch den Vergleich der relativen Signalintensitäten der einzelnen Protonen. Dazu wird der Quotient aus den integrierten Signalintensitäten des STD-Spektrums und des Referenz-Spektrums gebildet und auf den höchsten STD-Wert normiert. Die relativen Signalintensitäten werden in Prozent angegeben. In einigen Fällen war eine Integration der Signale des STD-Spektrums nicht möglich, da die Signale zu sehr überlappten.

Die STD-Experimente wurden unter Verwendung der Fusionsproteine MBP-17 β HSD1 bzw. MBP-17 β HSD2 durchgeführt. Das MBP-17 β HSD2 Fusionsprotein wurde mit der analogen Strategie zur 17 β HSD1 im Rahmen einer Diplomarbeit erzeugt (Fink, 2003).

Um sicherzustellen, dass keine Wechselwirkung mit dem *maltose-binding protein* stattfindet, wurden STD-Spektren mit reinem *maltose-binding protein* erzeugt, die ein reines Rauschsignal zeigten. Zur Abschätzung von Subtraktionsartefakten wurde zu jedem STD-Spektrum ein Kontroll-Spektrum aufgenommen, bei dem sowohl die on- als auch die off-Resonanz-Sättigung

jeweils auf 20000 Hz gesetzt wurde. Weitere Kontroll-Messungen wurden unter sonst unveränderten Bedingungen allerdings ohne Zugabe von Protein durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Anregung außerhalb der spektralen Fensters der Liganden stattfindet und keine Artefakte durch Aggregation auftreten. Für beide Experimente wurden Spektren mit reinen Rauschsignalen detektiert.

Mit Hilfe des Programms NMRLab wurde die Prozessierung einschließlich der Wasserunterdrückung und Basislinienkorrektur durchgeführt. Zur Berechnung der Integrale wurde ebenfalls mit Hilfe des Programms NMRLab eine Lorentz-Linie an die Resonanzen angepasst. Auf diese Weise ließen sich auch Signale in Spektren geringer Signalintensität in Gegenwart von Basislinienstörungen weitgehend artefaktfrei integrieren.

Die Zuordnung der Resonanzen des Spektrums zu den chemischen Strukturen der untersuchten Substanzen erfolgte mit Hilfe des Programms ACD/HNMR Predictor (V.6.12).

STD-NMR-Daten können nach einer quantitativen Auswertung zur Charakterisierung des Bindungsepitops der untersuchten Liganden herangezogen werden (*group epitope mapping*). Eine höhere Sättigung einzelner Protonen des Liganden gibt Hinweise auf eine größere Nachbarschaft zu Protonen des Proteins (Mayer und Meyer, 2001).

Zusätzlich wurden für eine Reihe Liganden, gebunden an die 17 β HSD1, ePHOGSY-Spektren aufgenommen. Im ePHOGSY-Experiment zeigen Liganden, die an das Protein binden, positive Signale, während Substanzen, die nicht an das Protein binden, Signale mit einem umgekehrten Vorzeichen haben.

Steht bereits eine dreidimensionale Struktur des Proteins, kokristallisiert mit dem Substrat oder Inhibitoren zur Verfügung, können strukturbasierte, computergestützte Verfahren zur Vorhersage der optimalen Bindungsgeometrie von Liganden an das Protein (Docking) eine sinnvolle Ergänzung zu den mittels NMR-Spektroskopie gewonnenen Daten bilden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Programm „AutoDock“ (Morris *et al.*, 1998) verwendet, das von einem starren Protein und einem vollkommen flexiblen Liganden ausgeht. Als Ausgangsdaten werden pdb-Dateien verwendet, denen polare Wasserstoffatome sowie Ladungs- und Solvatisierungsparameter hinzugefügt werden.

Zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit von AutoDock wurden Docking-Ergebnisse von Estradiol in der 17 β HSD1 (1FDT) mit den experimentell ermittelten Daten aus der Kristallstruktur verglichen. Hierbei befanden sich alle finalen Strukturen des Dockings innerhalb eines Clusters mit einer Standardabweichung von 0,5 Å zur Kristallstruktur. Da zudem gezeigt werden konnte, dass die Steroidbindungsregion selbst in Gegenwart verschiedener Substrate sehr

rigide ist (Shi und Lin, 2004), können AutoDock-Ergebnisse zu einer fundierten Bewertung des Bindungsverhaltens herangezogen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten potentiellen Inhibitoren der 17 β HSD1 können in drei Gruppen gegliedert werden:

Die erste Gruppe umfasst die durch Addition diverser Reste modifizierte Steroide. Wird bei Estron an der 15 α -Position ein Butyl-Rest addiert, entsteht der Ligand 83. Aus der Addition eines Phenylring an die C3-Hydroxylgruppe von Estron geht der Ligand 89 hervor, während der Ligand 35 ebenfalls an der C3-Hydroxygruppe verändert wird allerdings durch die Addition von Glucuronsäure. Im Docking wurden zusätzlich Androgene untersucht.

Die zweite Gruppe kann unter dem Begriff Phytoestrogene zusammengefasst werden. Dabei handelt es sich um Pflanzenstoffe, die aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum 17 β -Estradiol die Biosynthese von Hormonen beeinflussen. Einerseits wurde Coumestrol untersucht, das zur Gruppe der Coumestane gehört, und einen ausgesprochen guten kompetitiven Inhibitor der 17 β HSD1 darstellt (Makela *et al.*, 1994). Des Weiteren wurden zwei Flavone betrachtet. Bei den Flavonoiden, zu deren Gruppe die Flavone gehören, handelt es sich um hellgelbe Pflanzenfarbstoffe deren estrogene und antiestrogene Wirkung bereits beschrieben wurde (Collins *et al.*, 1997). Eine Reihe weiterer Flavone, deren inhibitorische Fähigkeiten bzgl. der 17 β HSD1 bereits beschrieben wurden, waren Grundlage für weitere Docking-Experimente.

Durch eine systematische Untersuchung der Wirkung verschiedener Flavonoide auf die Aromatase und die 17 β HSD1 konnten die Positionen der essentiellen Gruppen charakterisiert werden (Le Bail *et al.*, 1998). Der verwendete Ligand 84 ist an der Position 5 und 7 hydroxyliert und an der Position 4' methoxyliert. Der Ligand 25 ist an den Positionen 7 und 4' hydroxyliert und an der Position 2 befindet sich ein zusätzlicher Phenylring.

Die dritte Gruppe umfasst die nicht steroidal, synthetischen Liganden 5C, 7C und 85.

Im Folgenden werden für jeden Vertreter dieser drei Gruppen die Bindungseigenschaften beschrieben. Dafür werden die Ergebnisse aus STD- und Docking-Experimenten kombiniert betrachtet.

3.2.1 Steroide und Steroid-Derivate

3.2.1.1 Estradiol

Die zur Bestimmung des Bindungsepitops des natürlichen Substrats Estradiol durchgeführten STD-Spektren (Abbildung 3.15) zeigen sowohl für die Bindung an die 17 β HSD1 als auch an die

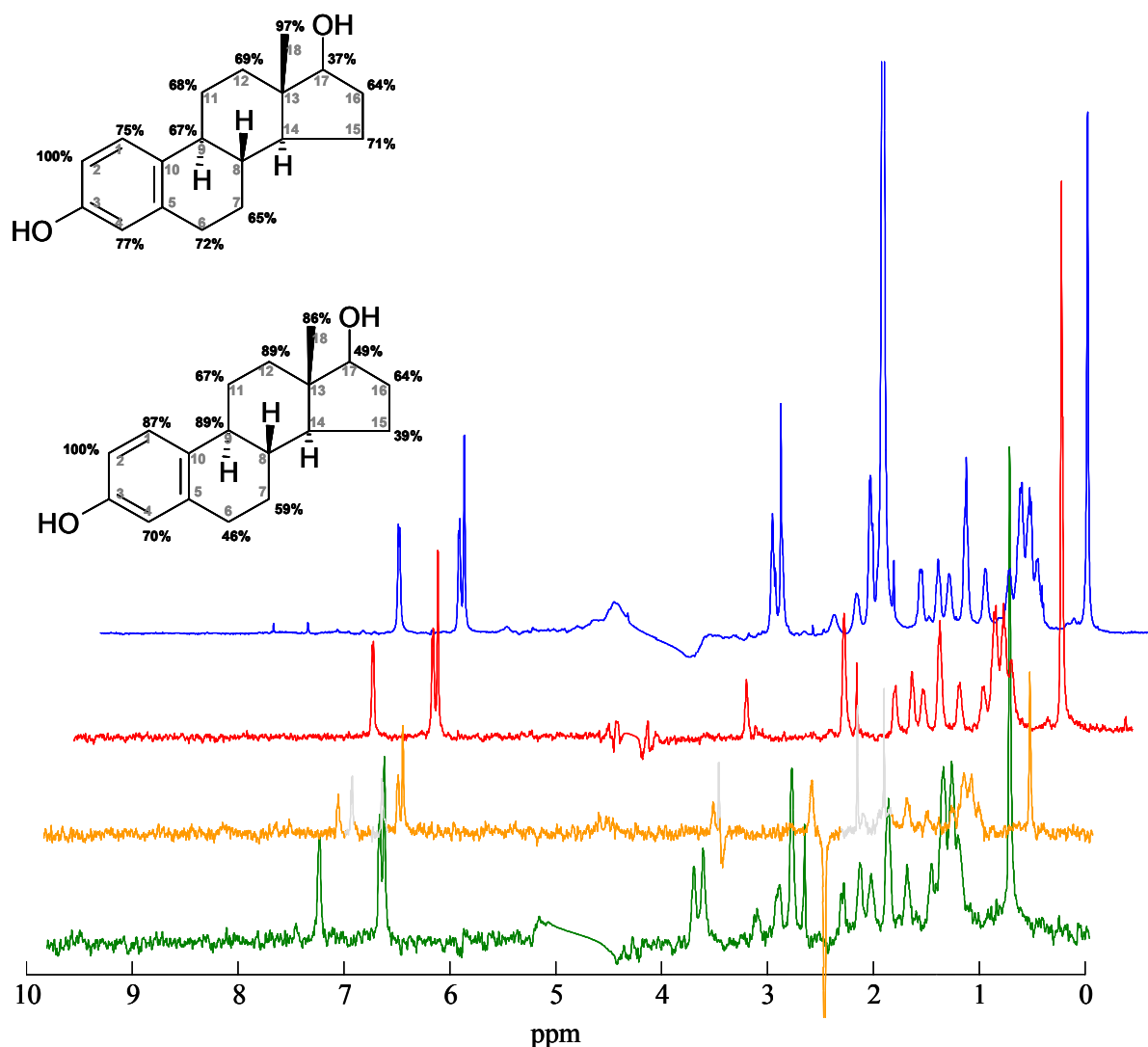


Abbildung 3.15: STD-Messungen an Estradiol, blau: ^1H -NMR-Referenz-Spektrum von Estradiol ($285\mu\text{M}$) mit $17\beta\text{HSD1}$ ($4\mu\text{M}$), rot: STD-Spektrum von Estradiol ($285\mu\text{M}$) mit $17\beta\text{HSD1}$ ($4\mu\text{M}$), gelb: ePHOGSY-Spektrum von Estradiol ($75\mu\text{M}$) mit $17\beta\text{HSD1}$ ($4\mu\text{M}$) in Gegenwart von 7C ($150\mu\text{M}$), grün: STD-Spektrum von Estradiol ($285\mu\text{M}$) mit $17\beta\text{HSD2}$ ($4\mu\text{M}$), Darstellung der relativen STD-Effekte am Liganden in Prozent, oben: $17\beta\text{HSD1}$ unten: $17\beta\text{HSD2}$

$17\beta\text{HSD2}$ eindeutig STD-Effekte. Die Aromaten- und Methylprotonen zeigen bei der Bindung an beide Proteine die höchsten relativen Signalintensitäten. In beiden Fällen ist der STD-Effekt des $\text{C}17$ -Protons schwach (37% bzw. 49%).

Allerdings sind bei der Bindung des Estradiols an die beiden untersuchten HSDs auch Unterschiede zu beobachten. Den Protonen $\text{H}6$, $\text{H}7$ und $\text{H}15$ können bei der Bindung an die HSD1 deutlich stärkere STD-Effekte, den Protonen $\text{H}9$ und $\text{H}12$ hingegen deutlich schwächere

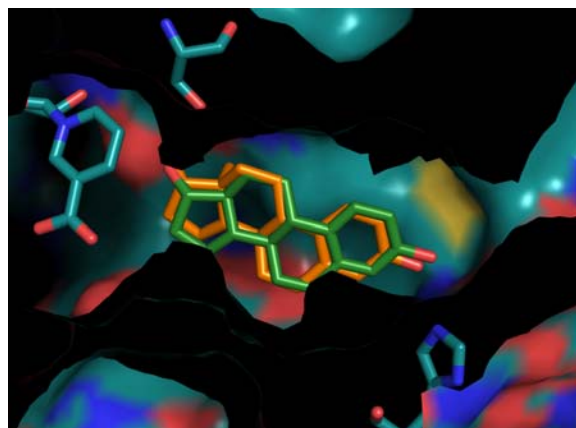


Abbildung 3.16: Vergleich der kristallographisch bestimmten Bindungsposition von Estradiol (grün) mit der Docking-Position (orange)

STD-Effekte bei der Wechselwirkung des Estradiols mit der 17βHSD1 zugeordnet werden als im Falle der Bindung an die 17βHSD2.

Eine Berechnung der relativen Signalintensitäten der übrigen Protonen konnte aufgrund der Überlappung der Signale nicht vorgenommen werden.

Das in der Präparation des Proteins nicht vollständig entfernte Glycerin wie auch DMSO ergeben sowohl im Referenz-Spektrum als auch im STD-Spektrum Signale. Diese können aufgrund ihrer sehr geringen relativen

Signalintensitäten ($\leq 5\%$) als unspezifische Wechselwirkungen am Protein interpretiert werden. Das ePHOGSY-Spektrum stützt diese Interpretation ebenfalls. Die Estradiol-Resonanzen erscheinen mit einem umgekehrten Vorzeichen als die Resonanzen von DMSO und Glycerin.

Die beim Docking von Estradiol in die 17βHSD1 (1FDT) hervorgegangene bevorzugte Bindungsposition ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

Die Ergebnisse aus den STD-Experimenten stehen in gutem Einklang mit denen aus Kristallisationsexperimenten bzw. Docking. Der aromatische A-Ring ist zwischen den beiden sich gegenüberliegenden Resten Leu149 und Val225 eingespannt und zeigt die stärksten STD-Effekte. Im Bereich der Ringe B und D erweitert sich die Bindungstasche der 17βHSD1, wodurch eine schwächere Wechselwirkung und dadurch bedingt etwas schwächere STD-Effekte erklärt werden können. Die β-ständige Methylgruppe ragt aus der Ringebene heraus und wird durch die hydrophobe Oberfläche der 17βHSD1, speziell durch Val143, stabilisiert. Am Übergang zur *active site* verengt sich die Bindungstasche asymmetrisch, so dass das 17α-Proton nur wenig Kontakt zur Oberfläche, die Protonen 15α und 16α etwas stärkeren Kontakt haben (kleine bzw. mittlere STD-Effekte). Aufgrund der starken Überlappung der Signale zwischen 1 und 1,5 ppm konnten für die Positionen 9, 12, 15 und 16 nur die STD-Effekte für die jeweiligen α-ständigen Protonen bestimmt werden, die ebenso wie die STD-Effekte des α-ständigen Protons an Position 17 relativ schwach sind. Diese Protonen liegen auf der Unterseite der Ringebene, wo die Bindungstasche der 17βHSD1 etwas erweitert ist.

Estradiol zeigt bei der Bindung an die 17βHSD2 an den Positionen H9 und H12 höhere Signalintensitäten, die auf eine engere Nachbarschaft dieser Protonen mit den Protonen des

Proteins hinweisen, möglicherweise hervorgerufen durch eine engere Geometrie der Bindungstasche in diesem Bereich.

3.2.1.2 Androstandion

Wird das Androgen Androstandion in die 17 β HSD1 (1FDT) gedockt, so befinden sich alle Konformationen innerhalb von zwei Clustern (54% und 46% der Strukturen). In Abbildung 3.17 sind die beiden möglichen Konformationen dargestellt. In beiden Konformationen liegen die beiden Ketogruppen in einem Abstand zu His221, Ser142 und Tyr155, dass ausgebildet werden können. Die energetisch günstigere Konformation sieht Androstandion in der umgekehrten Position mit dem Cyclopentanring zur Substraterkennungsstelle orientiert, wohingegen die zweite Konformation den Cyclopentanring zur active site ausrichtet. Allerdings ist das Androgen verglichen mit Estradiol um 180° um die Längsachse gedreht, so dass die beiden Methylgruppen zur α -Seite (bezogen auf Estradiol) weisen. Diese beiden Bindungspositionen entsprechen den experimentellen Befunden, nach denen die 17 β HSD1 Androgene in zwei alternativen Positionen binden kann und aus diesem Grund sowohl 17 β -reduktive als auch 3 β -oxidative Aktivität besitzt. Ursache für die Drehungen um die Längs- bzw. Querachse von Androstandion bezogen auf Estradiol soll die sterische Hinderung zwischen der β -ständigen C19-Methylgruppe und Leu149 sein. (Gangloff *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2000; Nahoum *et al.*, 2003; Shi und Lin, 2004)

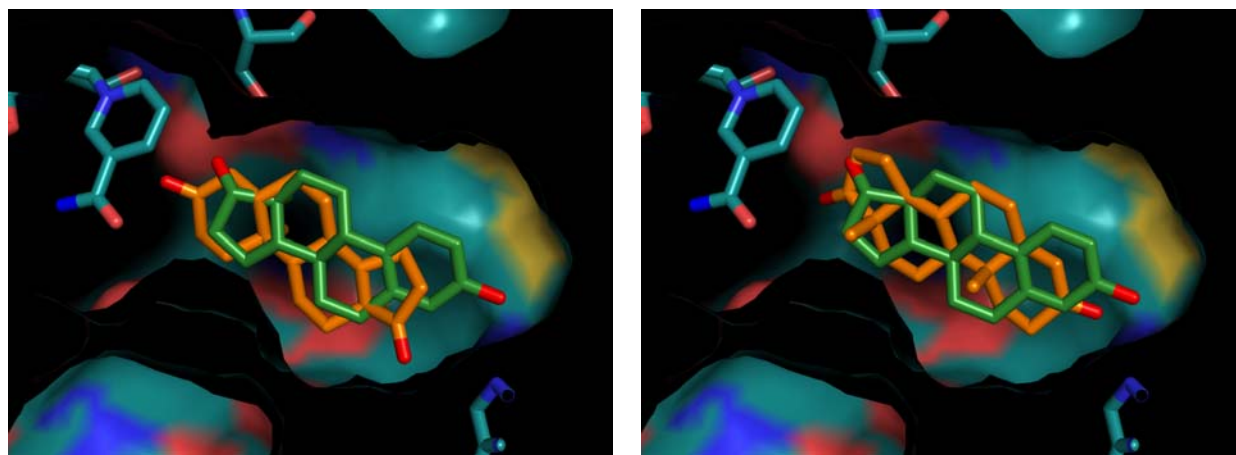


Abbildung 3.17: Vergleich der Docking-Position von Androstandion (orange) mit der kristallographisch bestimmten Position von Estradiol (grün) links beste Konformation, rechts zweitbeste Konformation

3.2.1.3 Equilin

Equilin, ein konjugiertes Estrogen, das in der Estrogen-Ersatz-Therapie eingesetzt wird, unterscheidet sich von Estron durch eine zusätzliche Doppelbindung im Ring B. Wie in kinetischen Untersuchungen *in vitro* gezeigt werden konnte, besitzt Equilin die Fähigkeit die

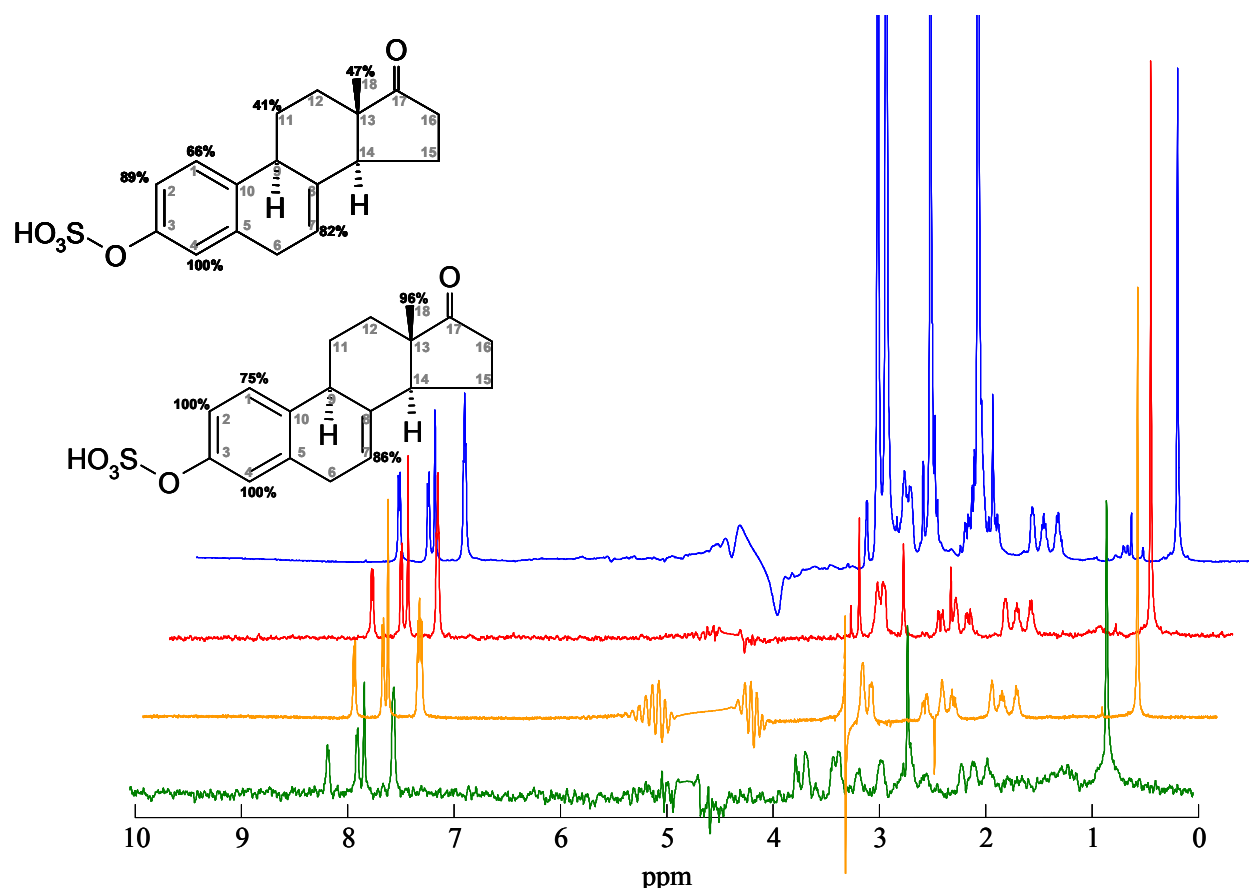


Abbildung 3.18: STD-Messungen an Equilin, blau: $^1\text{H-NMR}$ -Referenz-Spektrum von Equilin ($850\mu\text{M}$) mit $17\beta\text{HSD1}$ ($4\mu\text{M}$), rot: STD-Spektrum von Equilin ($850\mu\text{M}$) mit $17\beta\text{HSD1}$ ($4\mu\text{M}$), gelb: ePHOGSY-Spektrum von Equilin ($850\mu\text{M}$) mit $17\beta\text{HSD1}$ ($4\mu\text{M}$), grün: STD-Spektrum von Equilin ($200\mu\text{M}$) mit $17\beta\text{HSD2}$ ($4\mu\text{M}$), Darstellung der relativen STD-Effekte am Liganden in Prozent, oben: $17\beta\text{HSD1}$ unten: $17\beta\text{HSD2}$

Umsetzung von Estron zu Estradiol durch die $17\beta\text{HSD1}$ bis zu 97% zu hemmen (Sawicki *et al.*, 1999). Für die $17\beta\text{HSD2}$ wurde bisher nur eine Hemmung der Aktivität durch 17β -Dihydroequilin beschrieben (Puranen *et al.*, 1999).

Die in Abbildung 3.18 dargestellten Spektren zeigen deutliche STD-Effekte für die Bindung von Equilin sowohl an die $17\beta\text{HSD1}$ als auch die $17\beta\text{HSD2}$. Das Aromatenproton H4 zeigt in beiden Fällen den jeweils stärksten STD-Effekt. Die Aromatenprotonen H1 und H7 weisen im Vergleich zwischen der Bindung an die $17\beta\text{HSD1}$ und die $17\beta\text{HSD2}$ ähnlich starke Signalintensitäten auf.

Besonders deutlich ist der Unterschied zwischen den STD-Effekten der Methylprotonen H18, die im Fall der $17\beta\text{HSD1}$ nur bei 47% liegen und im Fall der $17\beta\text{HSD2}$ bei 96%. Bei der Bindung von Equilin an die $17\beta\text{HSD1}$ liegen die STD-Intensitäten der Protonen H11 und H18 deutlich unter den entsprechenden Werten bei der Bindung mit Estradiol.

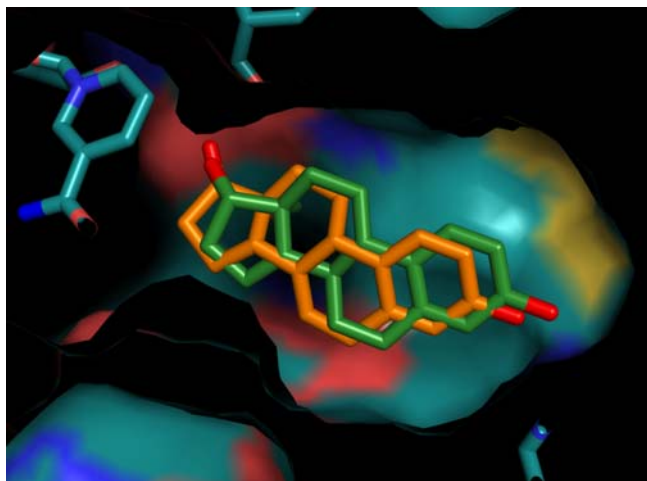


Abbildung 3.19: Vergleich der Docking-Position von Equilin (orange) mit der kristallographisch bestimmten Position von Estradiol (grün)

Das ePHOGSY-Spektrum der Bindung von Equilin an 17β HSD1 zeigt ganz deutlich, dass es sich hierbei um eine spezifische Wechselwirkung handelt, während Glycerin und DMSO Signale mit umgekehrtem Vorzeichen hervorrufen, was einer unspezifischen Wechselwirkung entspricht. Wie in Abbildung 3.19 zu erkennen, liegen die Ring A und B von Equilin (50 von 50 gedockten Strukturen) in etwa in derselben Bindungsebene wie Estradiol. Durch die planare Konformation dieser beiden Ringe

werden die Ringe C und D in eine um etwa 20° gedrehte Position gezwungen.

Die STD-Effekte der Bindung von Estradiol an die 17β HSD1 und 2 zeigen im Bereich der Aromatenprotonen ähnliche Werte, die auch vergleichbar sind mit der Ausprägung der STD-Effekte bei Estradiol. Die Protonen der Methylgruppe und an der Position 11 hingegen zeigen bei der 17β HSD1 deutlich schwächere Werte. Dies steht in gutem Einklang mit den Ergebnissen des Dockings. Die planare Konformation der Ringe A und B und die trotzdem unveränderte Bindungsposition in diesem Bereich verglichen mit der Position von Estradiol, zwingt die Ringe C und D zu einer Drehung. Daraus resultiert eine veränderte Position der Methylgruppe und des $H_{11\alpha}$ Protons weg von der Proteinoberfläche, tiefer ins Inneren der Bindungstasche hinein, was einen schwächeren Kontakt des Liganden zum Protein und folglich kleiner STD-Effekte erklären könnte. Der gegenteilige Effekt ist bei dem Proton H7 zu beobachten. Aufgrund der konjugierten Doppelbindung in Equilin befindet sich das Proton H7 im Gegensatz zu Estradiol in der Ringebene und damit deutlich näher an der Proteinoberfläche, was mit der höheren Signalintensität dieses Protons im STD übereinstimmt.

3.2.1.4 Ligand 35

Der Ligand 35 entspricht Estron, an dessen C3-Hydroxylgruppe Glucuronsäure assoziiert ist. Die in Abbildung 3.20 dargestellten Spektren zeigen, dass für die Bindung des Liganden 35 an die 17β HSD1 deutliche STD-Effekte detektierbar sind, für die Bindung an die 17β HSD2 hingegen die STD-Effekte so schwach sind, dass eine Auswertung aufgrund des Signal-Rausch-Verhältnisses nicht möglich ist. Die Methylprotonen C18 und die Protonen am Cyclopentanring C16 ergaben die größten STD-Effekte. Ähnlich wie bei der Bindung von Estradiol ist die relative

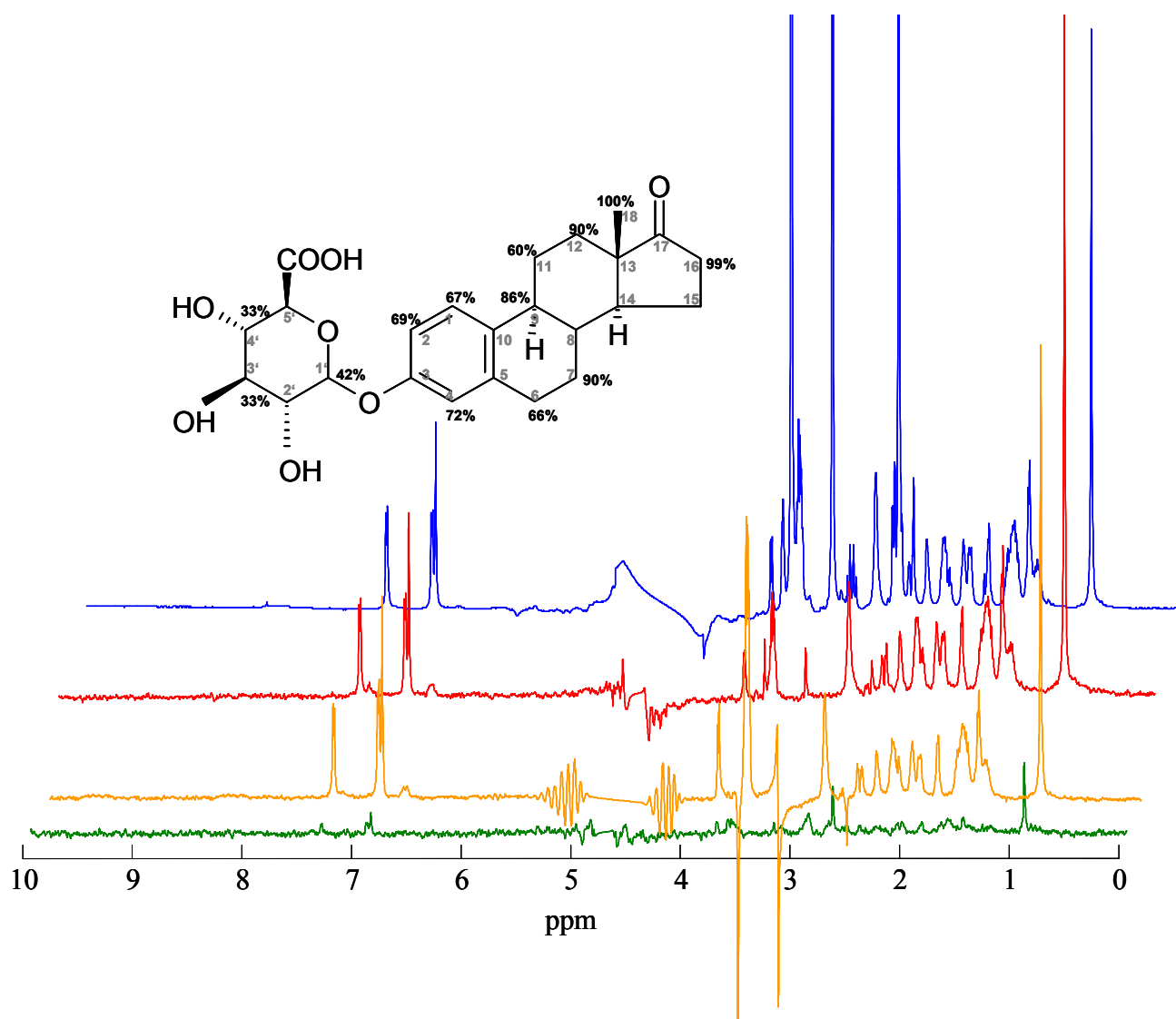


Abbildung 3.20: STD-Messungen am Ligand 35, blau: Referenz-Spektrum von 35 (570 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), rot: STD-Spektrum von 35 (570 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), gelb: ePHOGSY-Spektrum von 35 (570 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), grün: STD-Spektrum von 35 (400 μ M) mit 17 β HSD2 (4 μ M), Darstellung der relativen STD-Effekte am Liganden in Prozente bei der Bindung an 17 β HSD1

Signalintensität der H17 Protonen innerhalb des Steroid-Teils am niedrigsten. Die Werte der STD-Effekte für den Zucker bewegen sich zwischen 42% und 33% und sind damit etwas niedriger als im Steroid-Teil des Liganden 35. Die STD-Effekte für die Protonen an den Positionen 2' und 5' im Zucker konnten aufgrund äußerst schwacher STD-Signale nicht ermittelt werden.

Protein-gebundene Liganden ergeben im ePHOGSY-Experiment positive Signale während ungebundene Moleküle negative Signale hervorrufen.

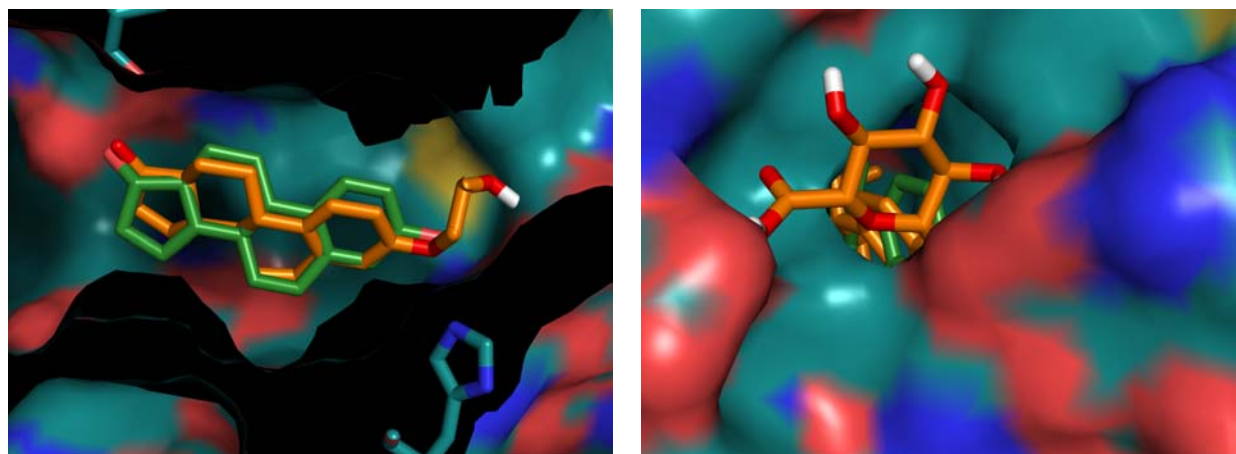


Abbildung 3.21: Vergleich der Docking-Position des Liganden 35 (orange) mit der kristallographisch bestimmten Position von Estradiol (grün) links: Steroid-Teil von 35, rechts: Konformation des Zuckers

Die Resonanz des Protons 2' des Zucker-Teils zeigt im Gegensatz zu allen übrigen Signalen dieses Liganden im ePHOGSY-Spektrum schwach negative Signale. Steht ein Ligand oder Teile davon im gebundenen Zustand im Austausch mit Wasser, so zeigen nicht an der Bindung beteiligte Protonen dennoch negative Werte. Daraus folgt, dass das Proton H2' vermutlich keine Wechselwirkung mit dem Protein eingehen, was in guter Übereinstimmung zu dem nicht bestimmbar STD-Effekt dieses Protons steht. Die Resonanz des Protons 5' kann im ePHOGSY-Spektrum aufgrund der Überlappung mit dem Glycerin-Signal nicht genau bestimmt werden. Diese Daten könnten darauf hindeuten, dass sich der hydrophile Zuckerrest außerhalb der Bindungstasche befindet.

Im Docking mit der 17 β HSD1 Kristallstruktur 1FDT, waren keine eindeutigen Cluster mit einem rmsd von weniger als 0,5Å zu finden. Bei der genaueren Interpretation fällt jedoch auf, dass sich in 11 der 50 berechneten Konformationen der Zucker außerhalb der Bindungstasche, zum Solvent exponiert, befindet. Das Steroid liegt jeweils leicht um die Längsachse gedreht in der Steroidbindungsebene. Für den Zucker gibt es eine Reihe verschiedener, energetisch gleichwertiger Bindungspositionen, was das Fehlen der Cluser erklären könnte. Beim Docking in die Struktur 1A27, konnte die eben beschriebene Bindungsposition als energetisch günstigste und als größter Cluster mit 20% der berechneten Konformationen gefunden werden.

Diese leicht veränderte Bindungsposition des Steroid-Teils kann ursächlich sein für die schwächeren STD-Effekte der Aromaten. Das H7 β -Proton und die Methylprotonen hingegen befinden sich bei der hier dargestellten Bindung näher an der Protein-Oberfläche, was mit höheren relativen STD-Signalintensitäten im Einklang steht.

3.2.1.5 Ligand 89

Bei der Verbindung 89 handelt es sich erneut um ein modifiziertes Steroid. Ähnlich wie bei der Verbindung 35 wurde an der C3-OH-Position ein Phenyl-Rest addiert. STD-Experimente konnten mit diesem Liganden aufgrund seiner schlechten Löslichkeit nicht durchgeführt werden. Im Docking zeigte sich, dass anders als bei der Verbindungs 35 der Phenylrest vermutlich aufgrund seiner Hydrophobizität nicht zum Solvent exponiert ist, sondern das Steroid zu einer Drehung um 180° zwingt, so dass der Phenylrest im Bereich der NADP⁺-Bindungstasche zum Liegen kommt. Die beiden energetisch günstigsten Cluster (Abbildung 3.22 links) positionieren das Steroid und den Phenylrest identisch und unterscheiden sich nur in der Konformation der verbindenden Methoxygruppe (30%), während bei 20% der berechneten Konformationen (Abbildung 3.22 rechts) der Phenylring ähnlich positioniert ist, allerdings das Steroid zusätzlich eine Längsdrehung vollzieht, so dass die C18-Methylgruppe nun auf der α -Seite der Estradiolbindungsebene liegt.

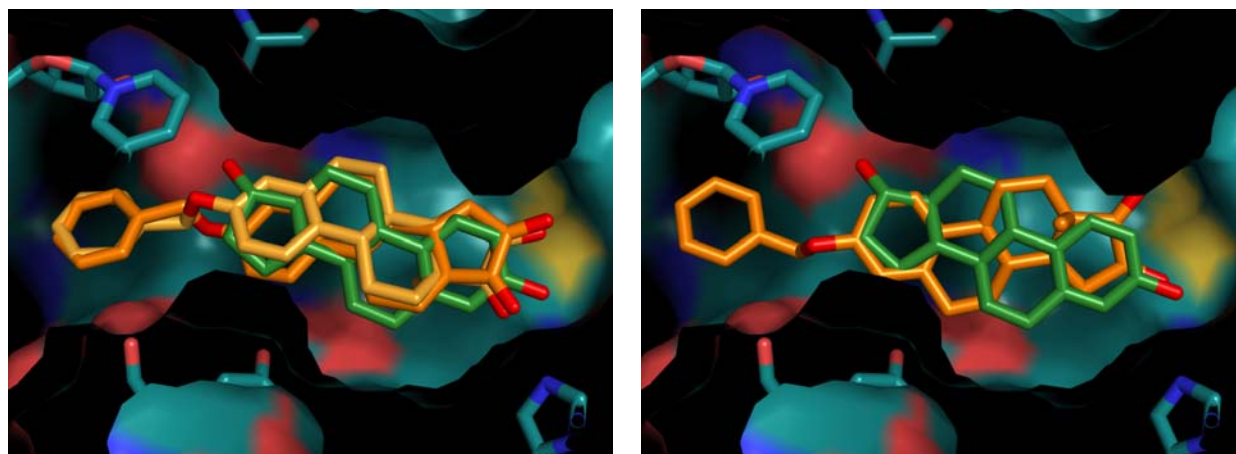


Abbildung 3.22: Vergleich der Docking-Position des Liganden 89 (orange) mit der kristallographisch bestimmten Position von Estradiol (grün), links: die beiden besten Konformationen, rechts: drittbeste Konformation

3.2.1.6 Ligand 83

Bei der Verbindung 83 handelt es sich um ein Steroid, das durch einen an der Position 15 addierten Butyl-Rest modifiziert ist. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Liganden 83 weist das STD-Spektrum wie in Abbildung 3.23 ersichtlich nur ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis auf, so dass sich die Auswertung als schwierig gestaltete. Den stärksten STD-Effekt verursacht die Methylgruppe an Position 18. Die Protonen des Butyl-Rests, der an Position 15 addiert ist, führen mit 76%-86% ebenfalls zu relativ starken STD-Effekten. Die Aromatenprotonen H1, H2 und H4 sowie die Protonen H6 α und β weisen die geringsten

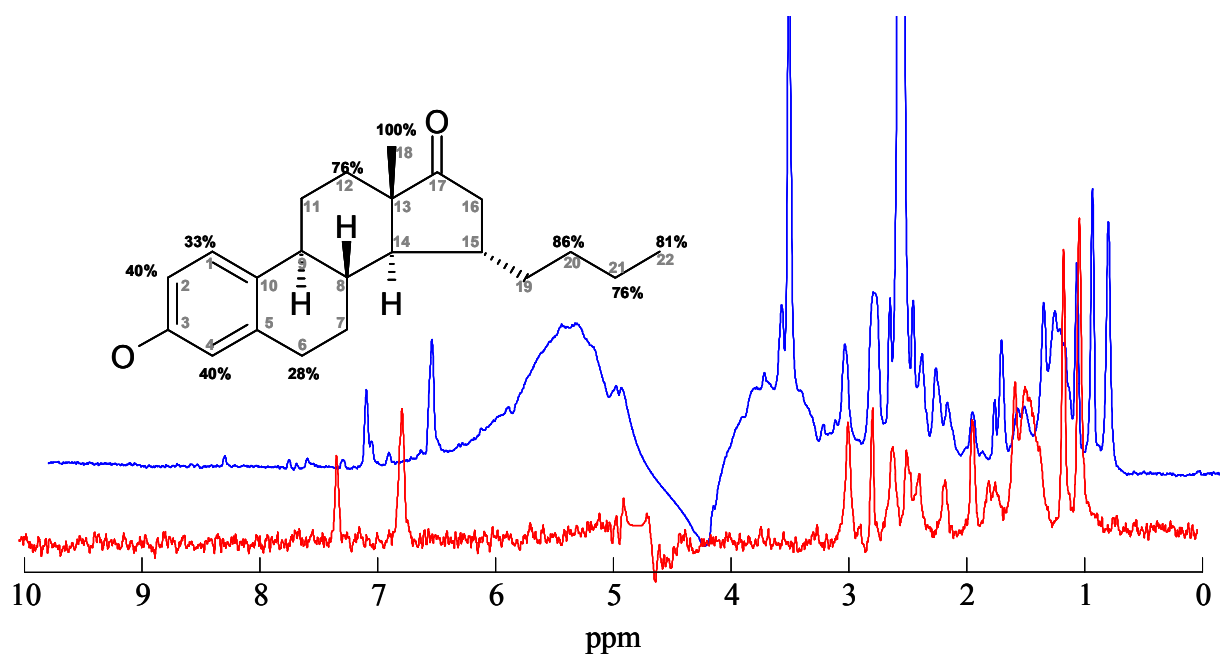


Abbildung 3.23: STD-Messungen am Ligand 83, blau: Referenz-Spektrum von 83 (285 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), rot: STD-Spektrum von 83 (285 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), Darstellung der relativen STD-Effekte am Liganden in Prozent bei der Bindung an 17 β HSD1

relativen Signalintensitäten (28%-40%) auf. Im Gegensatz zur Verteilung der relativen Signalintensitäten bei Estradiol sind hier die höchsten Werte im Bereich des Rings D und des Butyl-Rests zu finden.

Beim Docking der Verbindung 83 in die 17 β HSD1 fanden sich vier, energetisch in etwa gleichwertige Konformationscluster. Im energetisch günstigsten Cluster (14%) führte der α -

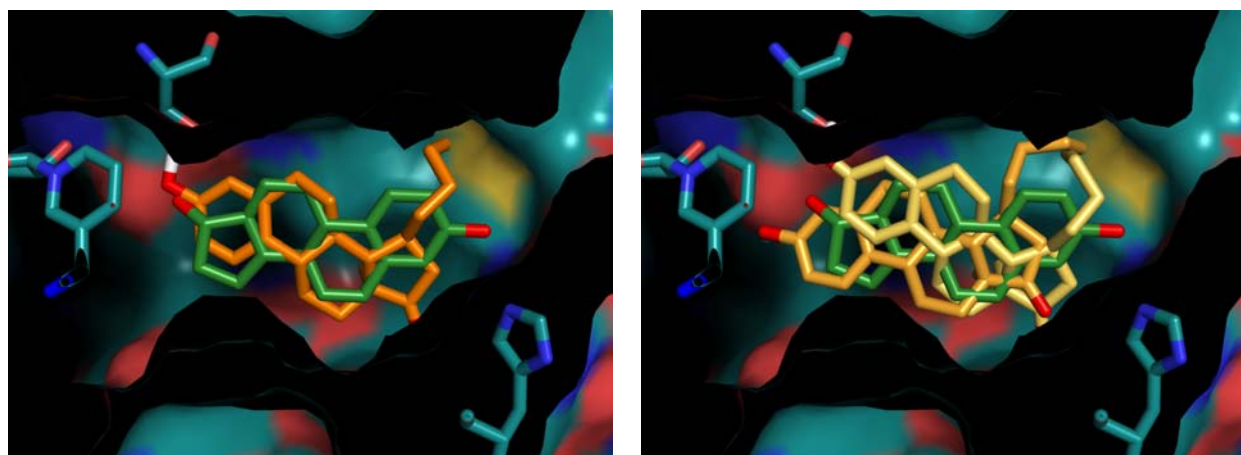


Abbildung 3.24: Vergleich der Docking-Position des Liganden 83 (orange) mit der kristallographisch bestimmten Position von Estradiol (grün), links: beste Konformation rechts: zweit- und drittbeste Konformation (dunkel bzw. hell)

ständige Butylrest zu einer deutlichen Verschiebung des Steroids, bei den drei übrigen Clustern (12% + 16% + 22%) sogar zu einer Drehung um 180°. In allen Fällen bleibt der Steroidteil in der Steroid-Bindesebene und die 17-Keto bzw. 3-Hydroxylgruppe liegen jeweils nahe genug, um mit den Resten Ser142, Tyr155 und His 221 Wasserstoffbrücken auszubilden.

Basierend auf den STD-Daten kann nicht festgestellt werden, ob die im Docking gefundenen Konformationen plausibel erscheinen oder eine favorisiert wird.

3.2.2 Phytoestrogene

3.2.2.1 Coumestrol

Wie aus den Spektren der Abbildung 3.25 ersichtlich wird, sind nur für die Bindung des Liganden Coumestrol an die 17 β HSD1 eindeutige STD-Effekte zu detektieren. Die Aromatenprotonen H5' und H2' zeigen etwas geringere STD-Effekte als die übrigen Aromatenprotonen bei der Wechselwirkung von Coumestrol mit der HSD1. Bei der Untersuchung der Bindung von Coumestrol an die 17 β HSD2 ist nur ein minimaler STD-Effekt zu erkennen. Wie bereits bei dem Cofaktor NAD⁺ erläutert, bleibt es offen, ob eine Bindung an

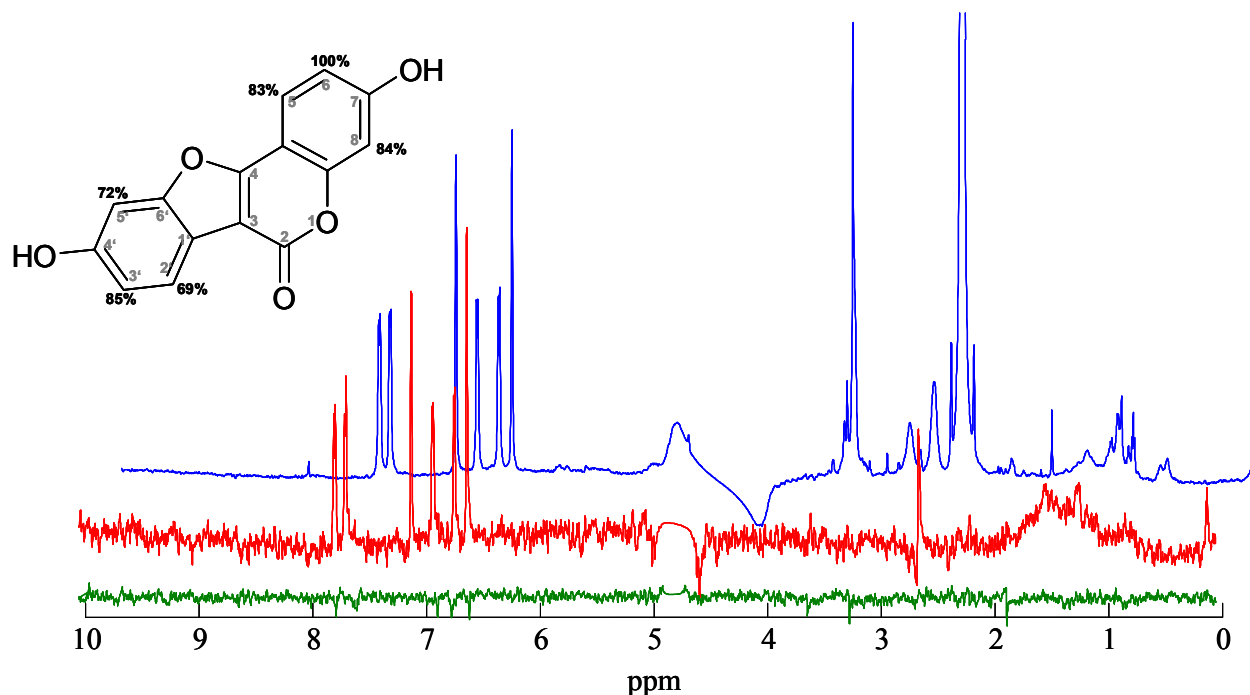


Abbildung 3.25 STD-Messungen an Coumestrol, blau: Referenz-Spektrum von Coumestrol (570 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), rot: STD-Spektrum von Coumestrol (570 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), grün: STD-Spektrum von Coumestrol (570 μ M) mit 17 β HSD2 (4 μ M),

Darstellung der relativen STD-Effekte am Liganden in Prozent bei der Bindung an 17 β HSD1

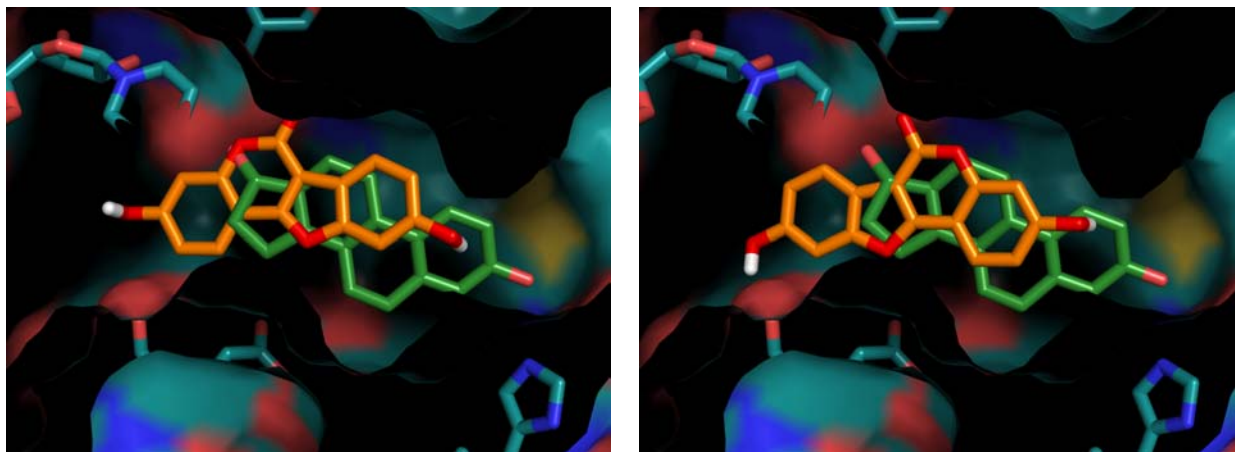


Abbildung 3.26: Vergleich der Docking-Position von Coumestrol (orange) mit der kristallographisch bestimmten Position von Estradiol (grün), links: beste Konformation, rechts: zweitbeste Konformation

die 17β HSD2 stattfindet.

Docking von Coumestrol in die 17β HSD1 lieferte im Wesentlichen zwei mögliche Bindungsmodi (74% und 24%), in denen Coumestrol in beiden Fällen in der Steroid-Bindungsebene liegt, jedoch um 180° gedreht zueinander. Obwohl die planare Ringstruktur der von Estradiol sehr ähnelt, ist Coumestrol im Docking aus der hydrophoben Bindungstasche in Richtung NADP^+ -Bindungstasche verschoben. Ursächlich für diese Verschiebung scheinen die Sauerstoffatome zu sein, die Coumestrol einen deutlich hydrophileren Charakter geben als Estradiol und die in dieser Position möglicherweise Wasserstoffbrücken zu Ser142, Tyr155 und Glu194 ausbilden können.

Beide im Docking gefundenen Bindungspositionen scheinen beim Vergleich mit den STD-Ergebnissen plausibel. Die zugehörigen Dockingenergien der beiden Cluster unterscheiden sich mit $-8,43$ und $8,35$ kcal/mol kaum. Aufgrund des Fehlens einer der C18-Methylgruppe äquivalenten Gruppe an Coumestrol kann auch nicht von einer Bevorzugung einer der beiden Bindungspositionen ausgegangen werden.

3.2.2.2 Ligand 84

Beim Ligand 84 handelt es sich um ein Flavon, das an den Positionen 5 und 7 hydroxyliert und an der Position 4' methoxyliert ist. Die in Abbildung 3.28 dargestellten Spektren zeigen eindeutige STD-Effekte für die Bindung des Liganden 84 an die 17β HSD1. Die Aromatenprotonen H6 und H8 zeigen mit 77% bzw. 100% die stärksten STD-Effekte. Deutlich schwächer sind die relativen Signalintensitäten der Aromatenprotonen H3' und H5' sowie der Methylprotonen H7' (48% bzw. 46%).

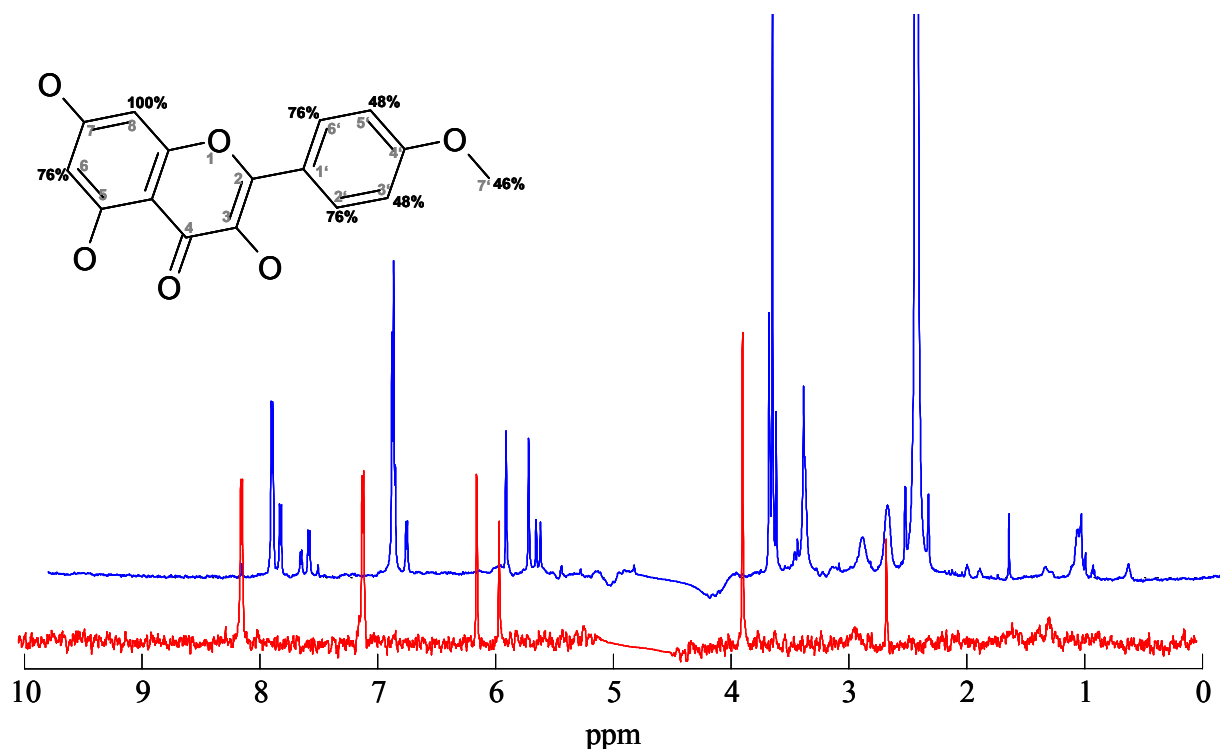


Abbildung 3.28: STD-Messungen am Ligand 84, blau: Referenz-Spektrum von 84 (285 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), rot: STD-Spektrum von 84 (285 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), Darstellung der relativen STD-Effekte am Liganden in Prozente bei der Bindung an 17 β HSD1

Beim Docking des Liganden 84 in die 17 β HSD1 ergaben sich im Wesentlichen zwei Cluster. In beiden Fällen weist das Doppelringsystem zur *active site* während der Methoxyphenylring im Bereich des Rings A verglichen mit Estradiol liegt, allerdings um etwa 45° gedreht. Eine Stabilisierung der in A dargestellten Bindungsposition kann durch eine Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen erfolgen (5-OH zu Tyr155 OH, 7OH zu Glu194 O, 1O zu Glu194

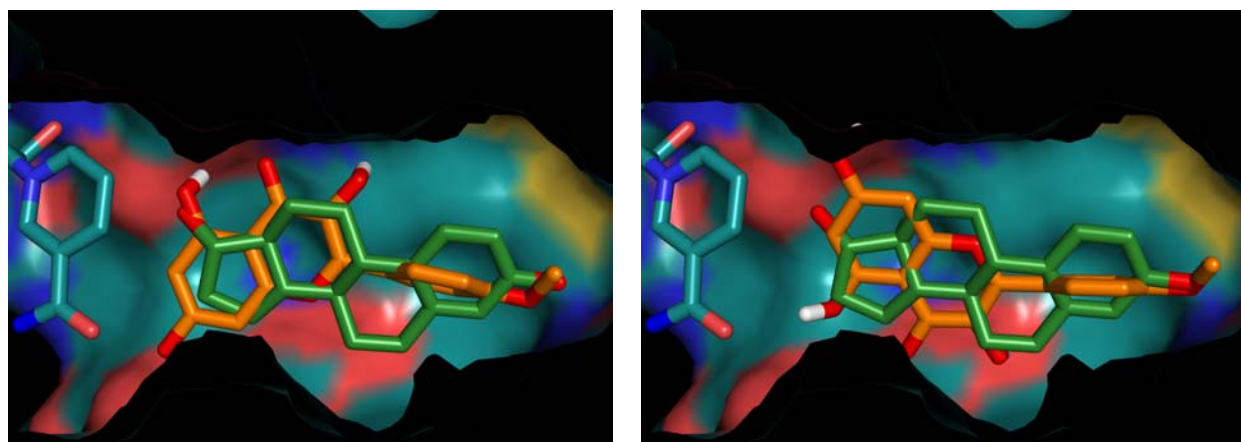


Abbildung 3.27: Vergleich der Docking-Position des Liganden 84 (orange) mit der kristallographisch bestimmten Position von Estradiol (grün), links: beste Konformation rechts: zweitbeste Konformation

O ϵ , 4O zu Ser142 OH). Bei der in Abbildung 3.27 B dargestellten Konformation ist das Doppelringssystem um 180° um die Querachse gedreht, aufgrund dessen sind nur noch drei Wasserstoffbrücken möglich (5-OH zu Glu194 O, 7OH zu Tyr155 OH, 4O zu Glu194 O ϵ).

Beim Vergleich der STD-Effekte mit den Docking-Ergebnissen, zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung.

Mit der deutlichen Drehung des Phenylrings des Liganden 84 verglichen mit dem A-Ring in Estradiol stehen niedrige relative Signalintensitäten in diesem Bereich im Einklang. Größere STD-Effekte im Bereich des Doppelringssystems hingegen korrespondieren gut mit der Lage innerhalb der active site. Die Methoxygruppe zeigt entsprechend ihrer Positionierung am Rande der Bindungstasche geringe STD-Effekte.

3.2.2.3 Ligand 25

Flavon 25 ist an den Positionen 7 und 4' hydroxyliert und an der Position 2 befindet sich ein zusätzlicher Phenylring. Die bei der Bindung dieser Substanz an die 17 β HSD1 und 2 erhaltenen Spektren sind in Abbildung 3.29 dargestellt und zeigen eindeutige STD-Effekte. Die Aromatenprotonen des Rings D zeigen in beiden Fällen die jeweils stärksten STD-Effekte (83%-100%), die kleinste relative Signalintensität wird jeweils durch die Protonen H9 verursacht. Bei 17 β HSD2 zeigen die Protonen der beiden aromatischen Ringe B und C ähnlich starke STD-Effekte (70%-83%), während bei der Bindung von 25 an die 17 β HSD1 große Unterschiede auftreten (4%-96%). Die Protonen H3' und H5' führen dabei zur geringsten relativen Signalintensität innerhalb der Aromatenprotonen.

Das ePHOGSY-Spektrum (hier in Gegenwart von Equilin, grau dargestellt) zeigt wieder die spezifische Bindung des Liganden 25 an die 17 β HSD1 im Gegensatz zur unspezifischen Wechselwirkung mit Glycerin und DMSO, ausgedrückt durch das umgekehrte Vorzeichen.

In Abbildung 3.30 ist die beste Struktur des Dockings des Liganden 25 in die 17 β HSD1 dargestellt. Das Doppelringssystem weist ähnlich wie bei 84 zur *active site*, ist allerdings aus der Steroidbindungsebene herausgedreht. Der zusätzliche aromatische Ring befindet sich oberhalb der Steroidebene, der Phenolring liegt unterhalb, in einer Position vergleichbar zum entsprechenden Ring beim Liganden 84. In dieser Konformation sind Wasserstoffbrückenbindungen aufgrund der Abstandsbeziehungen zwischen Glu194 und 7OH bzw. O1 und zwischen 4'OH und His221 möglich.

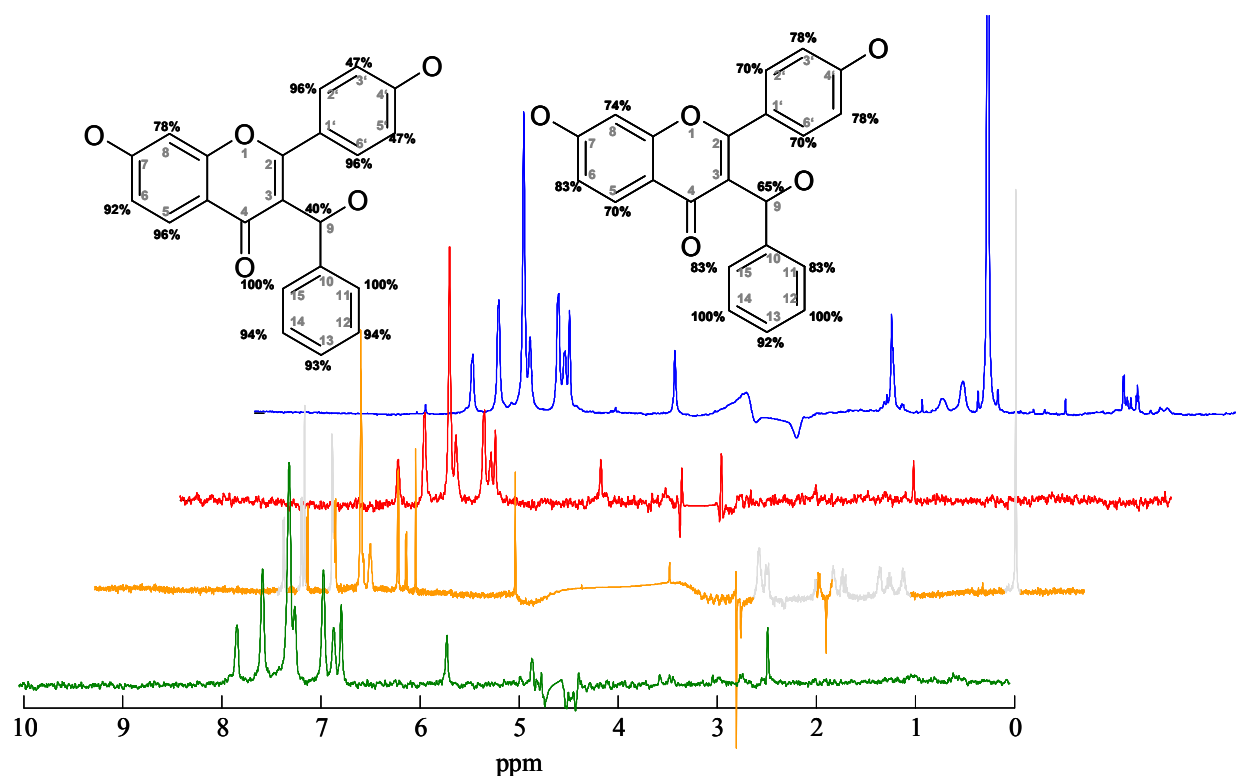


Abbildung 3.29: STD-Messungen am Ligand 25, blau: Referenz-Spektrum von 25 (570 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), rot: STD-Spektrum von 25 (570 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), gelb: ePHOGSY-Spektrum von 25 (340 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M) in Gegenwart von Equilin (850 μ M), grün: STD-Spektrum von 25 (800 μ M) mit 17 β HSD2 (4 μ M), Darstellung der relativen STD-Effekte am Liganden in Prozent, links: 17 β HSD1, rechts: 17 β HSD2

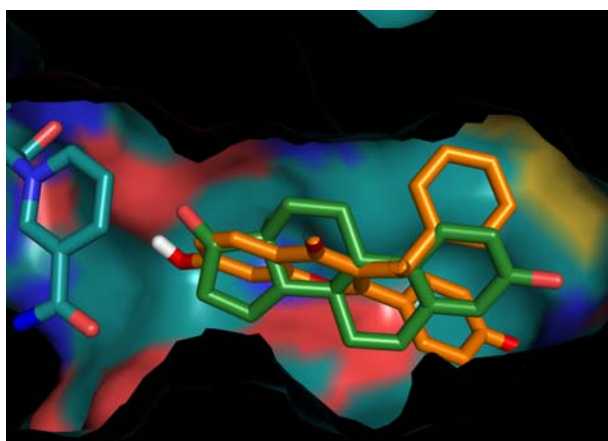


Abbildung 3.30: Vergleich der Docking-Position des Liganden 25 (orange) mit der kristallographisch bestimmten Position von Estradiol (grün)

Die Protonen H5, H6, H11, H12, H14 und H15 zeigen hohe Signalintensitäten, die auf eine räumliche Nähe zur Proteinoberfläche, wie sie in der gezeigten Bindungskonformation dargestellt ist, hindeuten. Aufgrund der freien Drehbarkeit der Phenylringe, kann zwischen den Protonen H11 und H15 bzw. H12 und H14 nicht unterschieden werden. Die beiden Phenylringe bilden mit den aromatischen Ringen von Phe259 und Tyr218 eine gestapelte Anordnung.

3.2.2.4 Weitere Flavone



Abbildung 3.31: Darstellung der im Docking ermittelten Bindungskonformation von Apigenin (orange)

Bei ausgedehnten Docking-Untersuchungen mit diversen Flavonen zeigte sich eine äußerst gute Übereinstimmung der gefundenen Konformationen. Mit abnehmender inhibitorischer Potenz nahm auch die Eindeutigkeit der Konformationen, also die Größe der Cluster ab. In Abbildung 3.31 ist die Bindungsposition von Apigenin, dem effektivsten Inhibitor der bisher veröffentlichten Flavone, exemplarisch dargestellt. Das Doppelringsystem befindet sich in der Steroidbindungsebene und weist

zur *active site*. Der dazu um 90° gedrehte Phenylring liegt unterhalb dieser Ebene. Bei Apigenin handelt es sich um 5,7,4'-tri-Hydroxyflavon. Alle drei Hydroxylgruppen können Wasserstoffbrücken zu Tyr155, Glu194 bzw His221 ausbilden. Weitere Wasserstoffbrücken sind zwischen O1 und Glu194 Oe bzw. O4 und Ser142 möglich. Chrysin (5,7-di-Hydroxyflavon) und 7-Hydroxyflavon liegen ebenfalls in einem Abstand zu den genannten Aminosäureresten, um jeweiligen Wasserstoffbrücken ausbilden zu können. 7-Methoxyflavon kann außer durch die Wechselwirkung mit O1 und O4 keine weiteren Wasserstoffbrücken bilden. Der Phenylring liegt eingebettet in den hydrophoben Bereich der Bindungstasche.

3.2.3 Nicht-steroidale synthetische Liganden

3.2.3.1 Ligand 85

In den in Abbildung 3.32 dargestellten Spektren sind sowohl für die 17 β HSD1 als auch für die 17 β HSD2 STD-Effekte zu beobachten, die durch spezifische Wechselwirkung des Liganden 85 mit den Proteinen entstehen. Dabei verursachen die Aromatenprotonen H1 und H2 sowohl bei der Bindung an die 17 β HSD1 als auch bei der Bindung an die 17 β HSD2 die stärksten STD-Effekte. Alle Methyl- bzw. Methoxy-Protonen zeigen in beiden Fällen deutlich schwächere STD-Effekte als die Aromatenprotonen. Bei der Ligandenbindung an die 17 β HSD1 haben die Protonen an den Positionen 11 und 14 die niedrigste relative Signalintensität, bei der 17 β HSD2

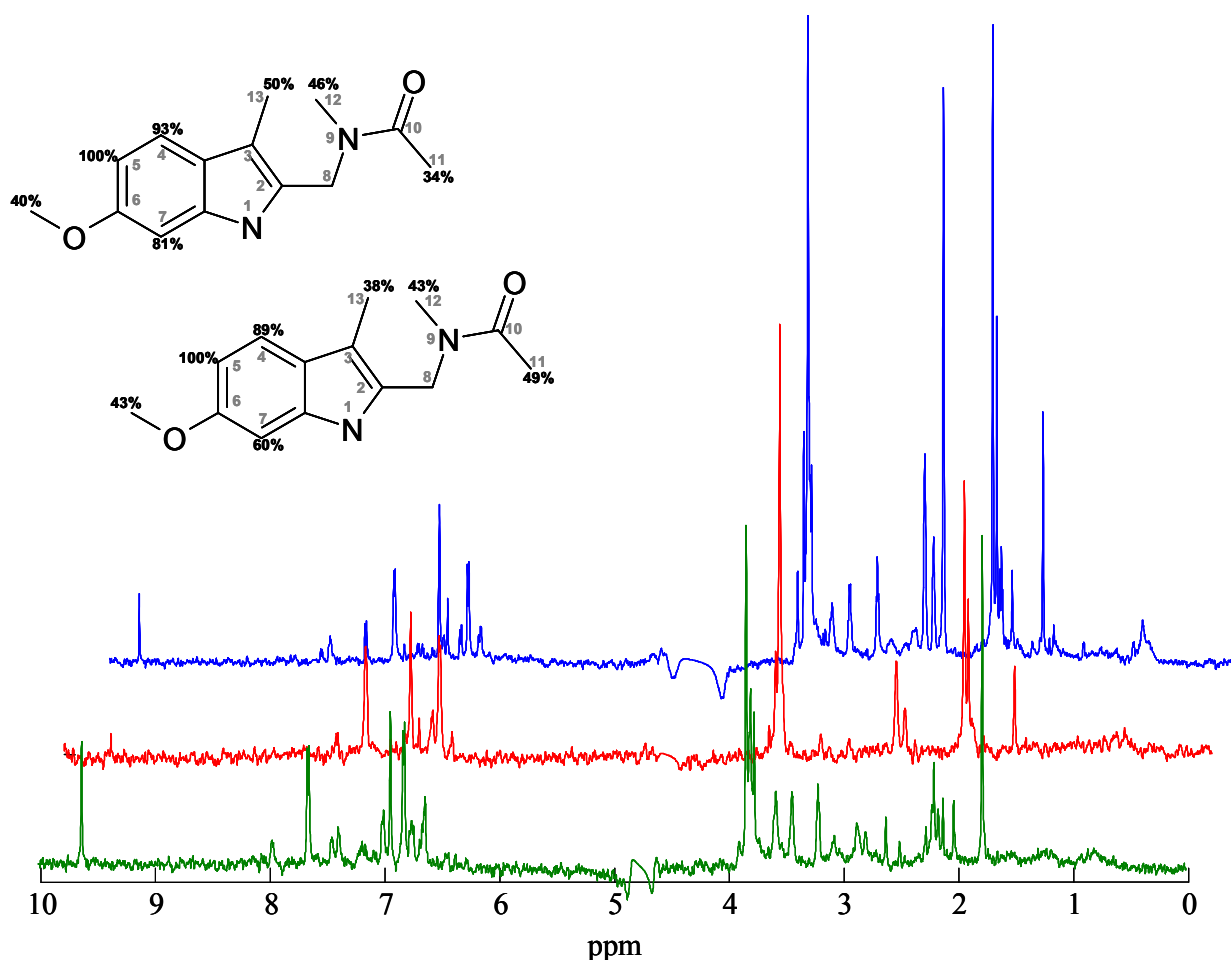


Abbildung 3.32: STD-Messungen am Ligand 85, blau: Referenz-Spektrum von 85 (855 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), rot: STD-Spektrum von 85 (855 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), grün: STD-Spektrum von 85 (285 μ M) mit 17 β HSD2 (4 μ M),

Darstellung der relativen STD-Effekte am Liganden in Prozent, oben: 17 β HSD1, unten: 17 β HSD2

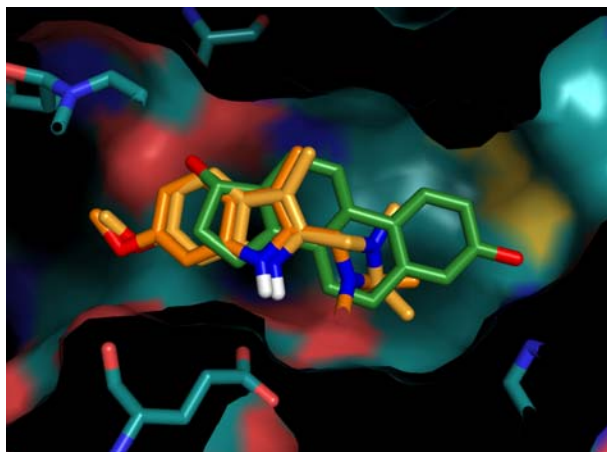


Abbildung 3.33: Vergleich der Docking-Position des Liganden 85 (orange) mit der kristallographisch bestimmten Position von Estradiol (grün)

sind es die Protonen an den Positionen 12, 13 und 14. Die Resonanzen der übrigen Protonen konnten aufgrund der Überlagerung durch das Wassersignal nicht ausgewertet werden.

Die beiden im Docking berechneten energetisch günstigsten Cluster (26% und 12%) positionieren den Indolrest im Bereich des D-Rings bezüglich Estradiol in der Steroidbindungsebene, unterscheiden sich jedoch in der Position des Amins. Im einen Fall deutet die C12-Methylgruppe in Richtung der β -Seite von Estradiol, im anderen Fall zur

α -Seite. Die Bildung von Wasserstoffbrücken scheint zwischen N1 und O ϵ von Glu194 sowie der Ketogruppe und Tyr218 möglich.

Die Ergebnisse der STD-Experimente korrelieren gut mit denen des Dockings. Die höchste Signalintensität ist erwartungsgemäß im Bereich des aromatischen Rings zu finden, der in der Verengung hin zur NADP⁺-Bindungstasche liegt, während die Methoxygruppe noch tiefer in die sich wieder erweiternde NADP⁺-Bindungstasche eindringt und aufgrund dessen geringere STD-Signalintensitäten zeigt. Die Methylprotonen im Inneren der Steroid-Bindungstasche haben größere Abstände zur Proteinoberfläche und dementsprechend schwächere STD-Effekte.

3.2.3.2 Ligand 5C

Die Verbindung 5C besteht aus Pyrazol, an dessen C4 ein Methylphenol-Ring und an N2 ein Phenylring substituiert sind. Für die Wechselwirkung des Liganden 5C mit 17 β HSD1 und 2 können in Abbildung 3.27 eindeutig STD-Effekte identifiziert werden. Die stärksten STD-Effekte werden in beiden Fällen jeweils für die Aromatenprotonen H15, H16 und H17 beobachtet. Den Resonanzen der Methylprotonen (71%–76%) und der Methylen-Protonen H6 α und β (50 bzw. 58%) können vergleichsweise schwächere Effekte zugeordnet werden. Allerdings weisen die Aromatenprotonen H8, H9, H11 und H12 bei Ligandenbindung an die 17 β HSD1 durchweg stärkere STD-Effekte auf als bei der Bindung an die 17 β HSD2. Gleiches gilt für die Aromatenprotonen H14 und H18.

14 der 50 gedockten Strukturen ergaben die in **Abbildung 3.35** dargestellte Bindungsposition. Der Pyrazolring und der Phenylring sind um etwa 80° gegeneinander gedreht und ordnen sich mit einer Abweichung von jeweils etwa 40° um die Steroidbindungsebene. Der Phenolring ist um

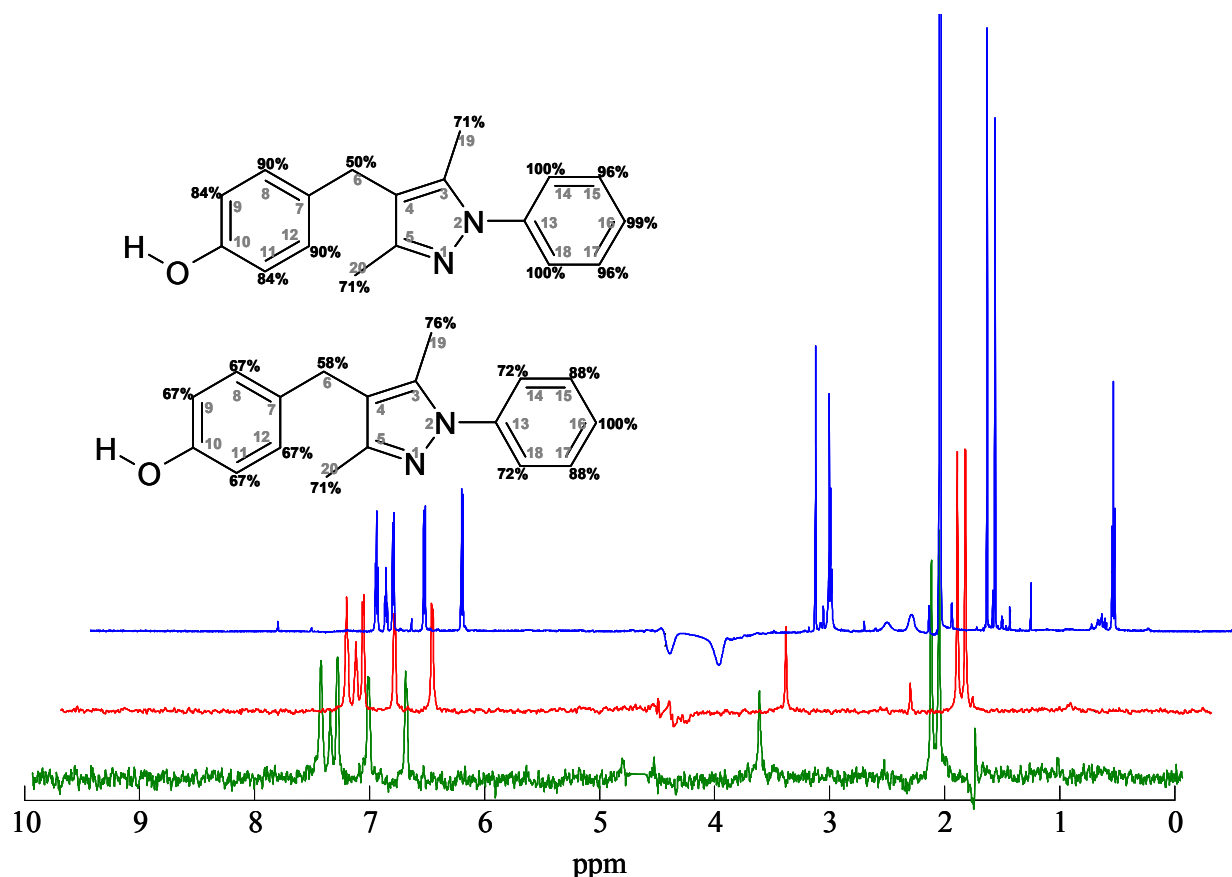


Abbildung 3.34: STD-Messungen am Ligand 5C, blau: Referenz-Spektrum von 5C (285μM) mit 17βHSD1 (4μM), rot: STD-Spektrum von 5C (285μM) mit 17βHSD1 (4μM), grün: STD-Spektrum von 5C (285μM) mit 17βHSD2 (4μM),

Darstellung der relativen STD-Effekte am Liganden in Prozent, oben: 17βHSD1 unten:17βHSD2

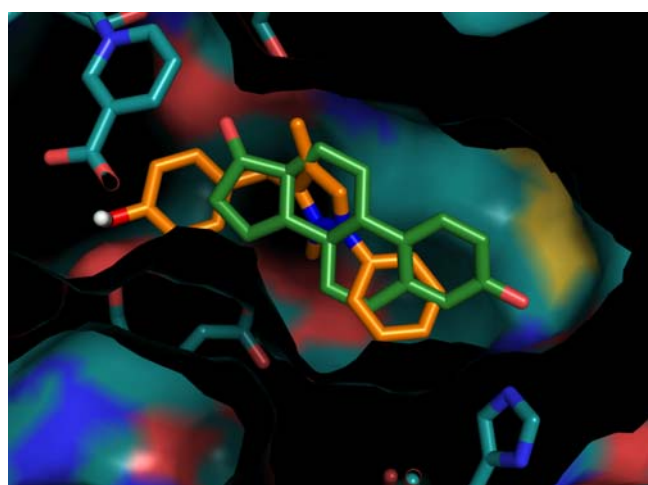


Abbildung 3.35: Vergleich der Docking-Position des Liganden 5C (orange) mit der kristallographisch bestimmten Position von Estradiol (grün)

etwa 110° abgewinkelt und deutet in die NADP⁺-Bindungstasche, so dass die Hydroxylgruppe nahe genug an Glu194 liegt, um möglicherweise eine Wasserstoffbrücke auszubilden.

Der Phenylring kommt in der postulierten Bindungsposition sehr nah an der Proteinoberfläche zum Liegen, was mit den stärksten STD-Effekten korreliert ist. Aber auch der Phenolring, der im

Bereich der Verengung zur NADP⁺-Bindungstasche liegt, zeigt hohe relative STD-Signalintensitäten. Kleinere Werte

weisen erwartungsgemäß die Methylprotonen auf, die im Inneren der Bindungstasche liegen.

3.2.3.3 Ligand 7C

Die Verbindung 7C besteht aus einem Isoxazol-Ring, an dessen C4 Position Methylphenol substituiert ist. In den Spektren der Abbildung 3.25 sind für die Bindung des Liganden 7C-052 an die beiden 17 β HSD's STD-Signale erkennbar. Die relativen Signalintensitäten sind in den beiden Fällen deutlich voneinander verschieden. Für die Wechselwirkung des Liganden 7C-052 mit der 17 β HSD1 treten für die Resonanzen des Aromaten die stärksten STD-Effekte auf, während bei der 17 β HSD2 die beiden Methyl-Gruppen die stärksten STD-Effekte verursachen. Die Methylenprotonen H6 α und β führen zu dem geringsten STD-Effekt bei der 17 β HSD1, bei der 17 β HSD2 kann aufgrund der Überlagerung dieser Resonanz im Referenzspektrum keine Integration vorgenommen werden.

Das ePHOGSY-Spektrum zeigt die spezifische Bindung des Liganden 7C an die 17 β HSD1 im

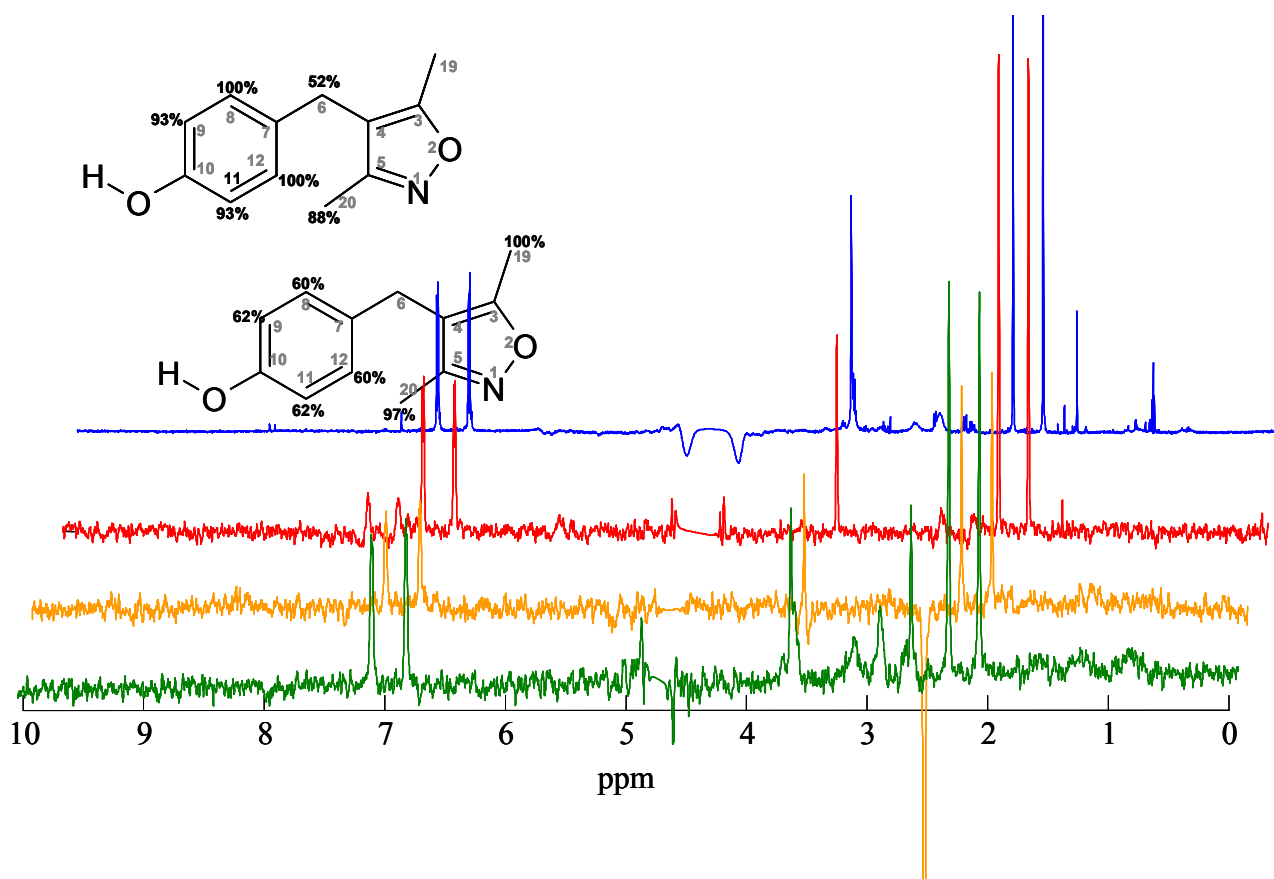


Abbildung 3.36: STD-Messungen am Ligand 7C, blau: Referenz-Spektrum von 7C (855 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), rot: STD-Spektrum von 7C (855 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), ePhogsy-Spektrum von 7C (150 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M) 17 β grün: STD-Spektrum von 7C (400 μ M) mit 17 β HSD2 (4 μ M), Darstellung der relativen STD-Effekte am Liganden in Prozent, oben: 17 β HSD1, unten: 17 β HSD2

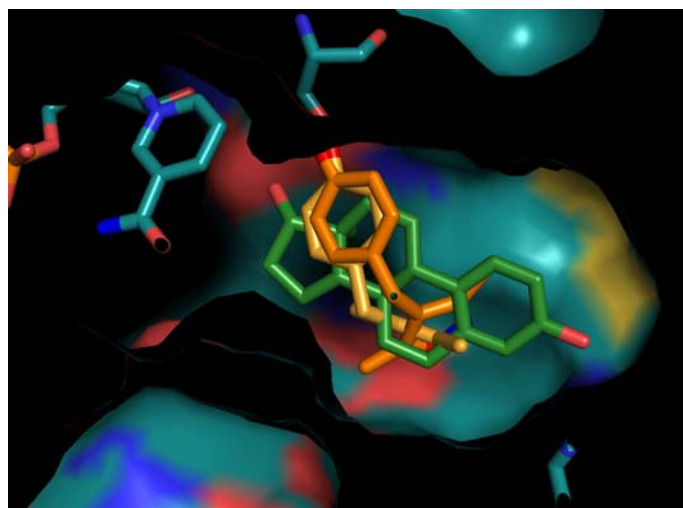


Abbildung 3.37: Vergleich der Docking-Position des Liganden 7C (orange) mit der kristallographisch bestimmten Position von Estradiol (grün)

sowohl durch Wasserstoffbrücken zwischen der Hydroxylgruppe und Ser142 oder Tyr155 als auch zwischen dem Stickstoff oder Sauerstoff des Isoxazolringes zu Tyr218 möglich.

Die Protonen des aromatischen Rings liegen deutlich näher an der Proteinoberfläche als die Methylprotonen, dies korreliert gut mit den Ergebnissen der STD-Experimente, nach denen die Aromatenprotonen die stärkeren Effekte zeigen.

Gegensatz zur unspezifischen Wechselwirkung mit DMSO, ausgedrückt durch das umgekehrte Vorzeichen.

10% bzw. 14% der gedockten Strukturen ergaben die in **Abbildung 3.37** dargestellten Bindungspositionen. Dabei befindet sich der Phenolring in der Steroidbindungsebene, während der Isoxazolring um etwa 120° abgewinkelt aus der Ebene heraussteht. Eine Stabilisierung dieser Position scheint

3.2.4 Cosubstrat NAD(P)⁺

Wie die in **Abbildung 3.38** dargestellten Spektren zeigen, sind weder für die 17 β HSD1 noch für die 17 β HSD2 STD-Effekte des Cofaktors NADP⁺ bzw. NAD⁺ zu beobachten. Auch eine

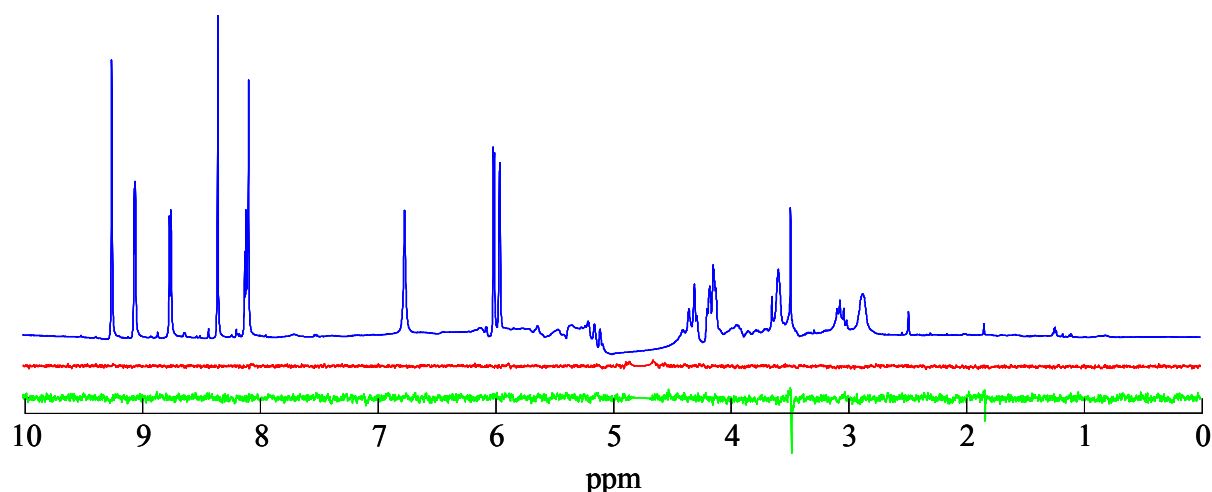


Abbildung 3.38: STD-Messungen an NAD(P)⁺, blau: Referenz-Spektrum von NADP⁺ (850 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), rot: STD-Spektrum von NADP⁺ (850 μ M) mit 17 β HSD1 (4 μ M), grün: STD-Spektrum von NAD⁺ (850 μ M) mit 17 β HSD2 (4 μ M)

Erhöhung des pH-Wertes von 6,5 auf 9,2 führte zu keiner Veränderung der STD-Signale. Fehlende STD-Effekte können zwei Ursachen haben: Bei besonders großer Affinität des Liganden an das Protein kann kein STD-Signal auftreten, da aufgrund der starken Bindung zwar Magnetisierung übertragen wird aber nur ein geringer Austausch des Liganden stattfindet. Bei besonders schwacher Bindung ist die durchschnittliche Verweildauer des Liganden im Protein zu gering um effizient Magnetisierung zu übertragen.

3.2.5 Konkurrenzexperimente

Konkurrenzexperimente geben Auskunft darüber, ob zwei Liganden um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren. Konkurrenz zwischen den Liganden macht sich durch eine Erniedrigung der STD-Signalintensität der vorgelegten Substanz bei Zugabe eines Inhibitors bemerkbar.

Für Konkurrenzexperimente muss der STD-Verstärkungsfaktor eingeführt werden. Dieser Faktor erlaubt eine bessere Beurteilung der tatsächlichen Größe eines STD-Signals. Der STD-Verstärkungsfaktor berechnet sich indem der relative STD-Effekt mit dem Überschuss des Liganden ($L\ddot{U}$) relativ zum Protein multipliziert wird.

$$VF_{STD} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \times L\ddot{U}$$

In dieser Gleichung beschreibt I_0 die Intensität eines Signals im *off-resonance*- oder Referenz-Spektrum, I_{sat} ist die Intensität desselben Signals im *on-resonance* Spektrum und $I_0 - I_{sat}$ verkörpert die Intensität im STD-Spektrum. Der STD-Verstärkungsfaktor kann deutlich höher als 1 sein, wenn die Verweilzeit des Liganden am Protein deutlich kürzer als die Sättigungszeit und die Konzentration des Liganden deutlich größer als die des Proteins ist.

Wie in Abbildung 3.39 B zu erkennen nimmt der Anteil des gesättigten Liganden kontinuierlich ab, wenn der Ligandenüberschuss wächst. Durch die Multiplikation des relativen STD-Effekts mit dem Ligandenüberschuss wird dies ausgeglichen. Dadurch ist es möglich, den Anteil der „aktiven“ Liganden-Konzentration zu bestimmen. Ein Verstärkungsfaktor von 10 führt bei einer Proteinkonzentration von 5 μM zu einer Konzentration des gesättigten Liganden von 50 μM .

Bei diesen Konkurrenzexperimenten wurde Estradiol in einer Konzentration von 200 μM (100facher Überschuss) vorgelegt und der Inhibitor 10650925 zutitriert.

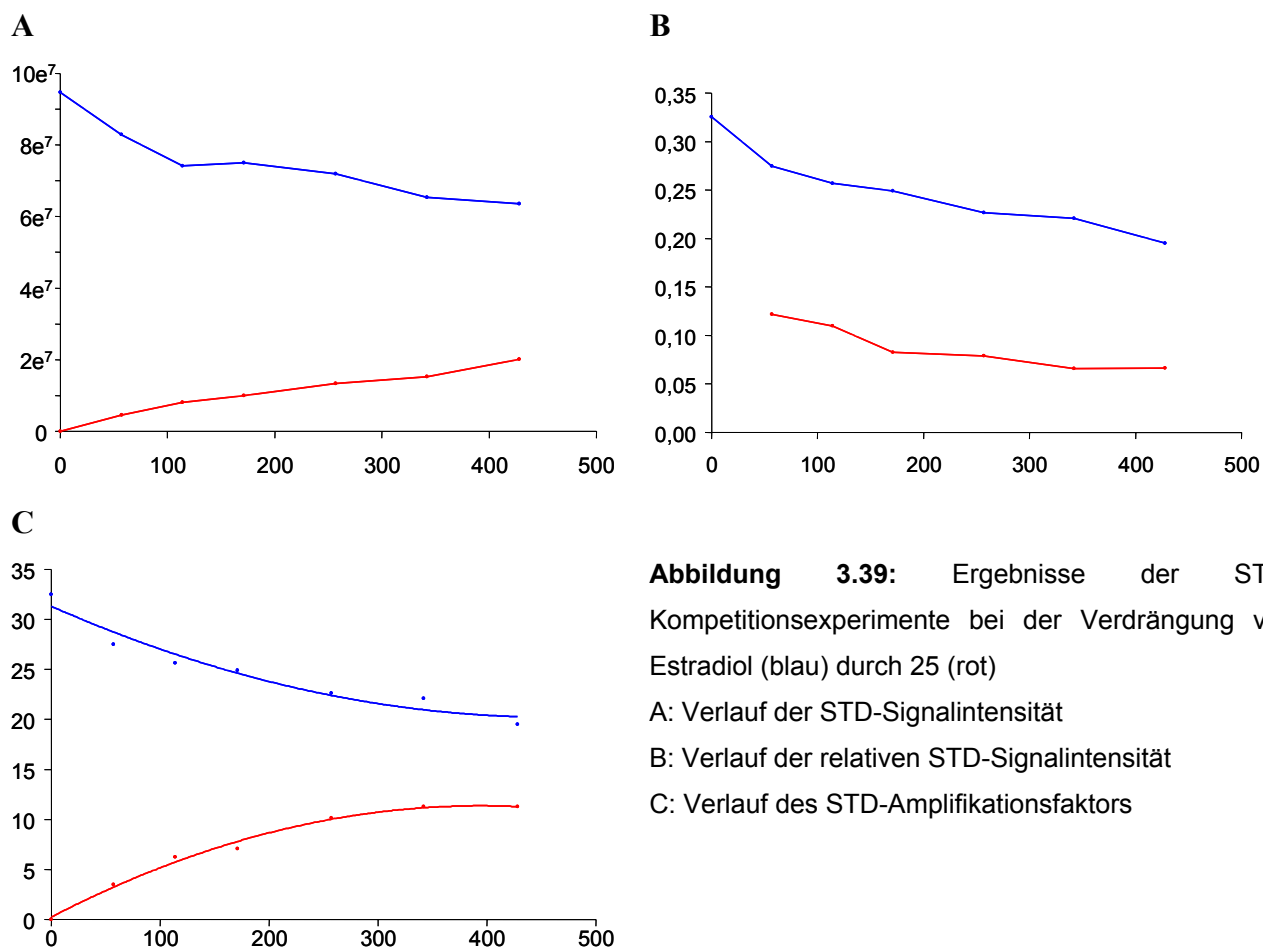


Abbildung 3.39: Ergebnisse der STD-Kompetitionsexperimente bei der Verdrängung von Estradiol (blau) durch 25 (rot)
 A: Verlauf der STD-Signalintensität
 B: Verlauf der relativen STD-Signalintensität
 C: Verlauf des STD-Amplifikationsfaktors

Als Resultat dieser Titration wurden die STD-Verstärkungsfaktoren als Funktion der Konzentration des hinzutitrierten Liganden erhalten. Die Signalintensität der Methylprotonen von Estradiol nimmt bei zunehmender Konzentration des Inhibitors 25 ab, während die Signalintensität der Protonen H11 und H15 des Liganden 25 zunimmt. Die in Abbildung 3.39 C gezeigten Daten belegen, dass Estradiol vom Inhibitor 25 aus seiner Bindungstasche verdrängt wird. Dem Verlauf beider Kurven kann entnommen werden, dass bei gleicher Konzentration beider Liganden ($200\mu\text{M}$) die Signalintensität von Estradiol deutlich höher ist als die des Liganden 25. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus weiteren STD-Experimenten nach denen die Sättigungseffizienz von Estradiol etwa doppelt so hoch (VF 32 bei $200\mu\text{M}$ und 100x Überschuss) ist wie die des Liganden 25 (VF 16 bei $200\mu\text{M}$ und 100x Überschuss).

Ein quantitativer Vergleich der Verstärkungsfaktoren ist nicht möglich, da nur korrespondierende Protonen strukturell ähnlicher Liganden verglichen werden können. Aber selbst unter diesen Bedingungen kann aus dem Verlauf des STD-Verstärkungsfaktors nicht auf die Anzahl der besetzten Bindungsplätze geschlossen werden, da die Sättigungseffizienz nicht nur von der Konzentration sondern auch von der Dissoziationskonstanten des Liganden abhängt.

Innerhalb einer Sättigungszeit können mehr Moleküle eines Liganden mit einer höheren Wechselzahl gesättigt werden, was in einer höheren Signalintensität resultiert. Demzufolge kann aus einem hohen STD-Verstärkungsfaktor in einem Substanzgemisch nicht geschlossen werden, dass die Substanz mit dem großen STD-Signal der bessere Binder ist. Diese Unterscheidung gilt nur innerhalb eines Liganden, bei dem das größte STD-Signal dem größten Kontakt zur Proteinoberfläche entspricht.

Weitere, hier nicht quantifizierte Competitionsexperimente wurden durchgeführt. So konnte für der Bindung an die 17 β HSD1 gezeigt werden, dass der Ligand 25 neben Estradiol sowohl den Liganden 35 als auch Coumestrol aus der Bindungstasche verdrängt ebenso konkurrieren Estradiol und 7C um dieselbe Bindungsposition.

3.2.6 Schlussfolgerungen

STD-NMR Spektroskopie liefert Aussagen über die Wechselwirkungen zwischen einem Protein und verschiedenen Liganden. Sie bietet damit einen wertvollen Beitrag zur Charakterisierung und Optimierung neuer biologisch aktiver Substanzen. Besonders interessant ist dabei die Möglichkeit, das Bindungsepitop der einzelnen Liganden genauer bestimmen zu können. In Kombination mit Docking-Experimenten können dann sehr detaillierte Aussagen über die Bindungsgeometrie und die an der Bindung beteiligten Gruppen gemacht werden.

Die Hydroxyprotonen können mit der STD-Methode nicht untersucht werden, da sie aufgrund ihres schnellen Austauschs mit Protonen des Wassers im ein-dimensionalen Spektrum nicht aufgelöst werden können. Aus der Kristallstruktur der 17 β HSD1 ist bekannt, dass die Wasserstoffbrücke zwischen der 3-Hydroxylgruppe des Steroids mit His221 entscheidend zur Substraterkennung beiträgt.

Stark an das Protein bindende Liganden ($KD < 10^{-9}M$) können mit der STD-Methode nicht von Molekülen unterschieden werden, die nicht an das Protein binden. Für den Cofaktor NADP⁺ beispielsweise konnte kein STD-Spektrum aufgenommen werden. Da NADP⁺ als Cosubstrat an das Protein binden muss und durch Kristallisationsexperimente einer große Anzahl an möglichen Wasserstoffbrücken zwischen dem Cosubstrat und der 17 β HSD1 gezeigt wurde, muss davon ausgegangen werden, dass die Affinität zwischen NADP⁺ und der 17 β HSD1 zu hoch ist, um STD-Effekte zu erhalten.

Beim *semi-flexible docking*, wie es AUTODOCK 3.0 durchführt, wird der Ligand als flexibel modelliert, des Protein wird hingegen starr gehalten. Der Vergleich der Gestaltung der Bindungstaschen aller verfügbaren 17 β HSD1-Kristallstrukturen lässt erkennen, dass die Steroid-

Bindungsregion sehr rigide ist und es selbst in Gegenwart verschiedener Steroide zu keinen nennenswerten konformationellen Veränderungen kommt (Shi und Lin, 2004). Diese Beobachtung stellt eine sehr gute Grundlage für das Docking und die Aussagekraft der daraus gewonnenen Ergebnisse dar.

17 β HSD1

Die gute Korrelation, mit der AUTODOCK Estradiol in die Ausgangsstruktur 1FDT dockt (100%) konnte beim Docking von Dihydrotestosteron in 1DHT (98%) und von Estradiol in 1A27 (100%) ebenfalls erreicht werden. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass AUTODOCK eine leistungsstarke Methode für theoretische Aussagen über Ligandenbindung repräsentiert.

Für die meisten im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Liganden lieferte die STD-NMR-Methode gute Ergebnisse für die Bindung an die 17 β HSD1, für einen großen Teil der Liganden auch für die Bindung an die 17 β HSD2. Eine quantitative Auswertung zur Bestimmung des Bindungsepitops war im Allgemein möglich. Die so gewonnenen Informationen konnten anschließend mit den Docking-Ergebnissen verglichen werden und standen durchweg gut mit diesen im Einklang.

Beim Vergleich der Bindungsepitope verschiedener Liganden traten deutliche Unterschiede hervor. Estradiol zeigt im Bereich der Aromaten und der Methylprotonen die stärksten STD-Effekte. Equilin, strukturell sehr ähnlich zu Estradiol, bei dem jedoch eine zusätzliche Doppelbindung im B-Ring zu einer planaren Konformation im Bereich der Ringe A und B führt, zeigt nur bei den Aromaten besonders hohe STD-Effekte. Die Methylprotonen (47%) und das H11 α Proton (41%) scheinen nur schwach an der Bindung beteiligt zu sein. Die veränderte Konformation von Equilin, verglichen mit Estradiol, scheint die Bindung dahingehend zu beeinflussen, dass der aromatische Ring an derselben Position bindet, die Ringe C und D jedoch eine leicht verschobene Position annehmen. Die Docking-Ergebnisse stützen diese Annahmen.

Vergleicht man die STD-Effekte des steroidalen Liganden 35 mit Estradiol, fällt auf, dass hier nicht die Aromaten- sondern die Methylprotonen sowie die Protonen H7 β , H12 β und H16 α die stärksten Effekte verursachen. Der am C3 addierte Zucker verursacht demzufolge eine Veränderung der Bindungsposition im Bereich des aromatischen Rings, der mit einer verminderten Wechselwirkung des Liganden mit dem Protein einhergeht. Die Docking-Ergebnisse zeigen, dass sich das Steroid-Gerüst in einer verschobenen Position aber grundsätzlich in derselben Orientierung wie Estradiol befindet. Der Zucker kommt vermutlich außerhalb der Bindungstasche, zum Solvent exponiert zum Liegen. Diese These wird von den ePHOGSY-

Ergbnissen gestützt. Ein Einfügen einer flexibleren und möglicherweise längeren Bindung zwischen dem Zucker-Rest und dem Steroid könnte die Verschiebung des Steroid-Teils des Liganden minimieren und so die Wechselwirkung zum Protein positiv beeinflussen.

Im Docking des Liganden 89 ist der am C3 addierte Phenylrest aufgrund seiner Hydrophobizität anders als der Zucker bei 35 im Inneren lokalisiert, was zu einer Drehung des Steroids um 180° führt, so dass das Steroidgerüst ähnlich wie die Androgene in umgekehrter Richtung zu finden ist. Günstig scheint sich hier die stapelförmige Anordnung des Phenylrestes mit dem Nicotinamidring auszuwirken. STD-Experimente konnten mit diesem Liganden aufgrund seiner schlechten Löslichkeit nicht durchgeführt werden.

Als weiterer steoidaler Ligand wurde 83 untersucht. Die geringen STD-Effkte im Bereich der Ringe A und B legen die Vermutung nahe, dass der an der Position C15 α -ständig addierte Butyl-Rest das Steroid-Gerüst in eine ungünstigere Bindungsposition zwingt. Umfangreiche Aktivitätsuntersuchungen an C6, C16 und C17 modifiziertem Estron (Allan *et al.*, 2006) brachten einen potenten Inhibitor hervor, an dessen C16 β -ständig über eine Methyl-Carboxyl-Gruppe ein Pyridyl-Ring addiert ist. Docking mit diesem Liganden an die 17β HSD1 zeigte, dass sich das Steroidgerüst trotz des großen Substituenten in derselben Bindungsposition befindet wie bei Estradiol. Bei der Optimierung von steroidalen Inhibitoren muss demnach das Ziel verfolgt werden, die Substituenten so zu wählen, dass das Steroid-Gerüst in seiner ursprünglichen Bindungsposition verbleiben kann. Aufgrund der räumlichen Erweiterung der Bindungstasche im Bereich der *active site* (Abbildung 3.40) scheinen sich C16 β -Derivate besser anzubieten als C15 α -Derivate.

Für Androgene (C19-Steroide) wurde eine Pseudo-Symmetrie des Steroidgerüsts beschrieben, die eine Bindung in umgekehrter Orientierung ermöglicht. Kristallisationsexperimente an

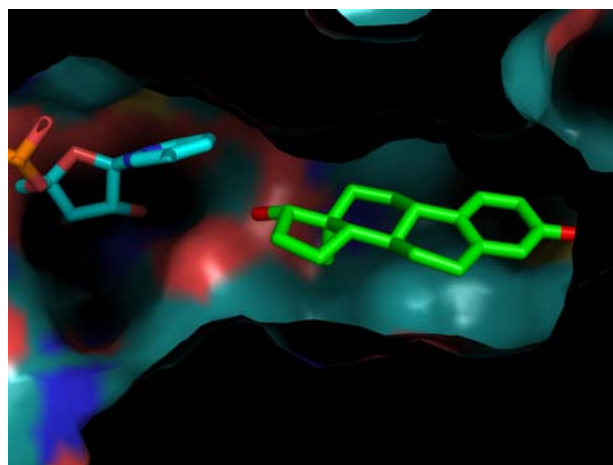


Abbildung 3.40: Estradiol (grün) und NADP^+ (blau) in der Bindungstasche

Androstandion und Androstendion, sowie kinetische Untersuchungen, nach denen sowohl eine 17β Oxidation als auch eine 3β Reduktion katalysiert wird, belegen diese These. In Übereinstimmung dazu konnten im Docking für Androstandion beide alternative Bindungsmodi gefunden werden (54% und 46%). Aufgrund einer sterischen Hinderung mit der C19Methylgruppe verhindert Leu149 die Bindung von Androgenen in der

„normalen“ Orientierung und zwingt sie entweder zu einer Drehung um die Querachse, so dass die 3-Ketogruppe im Bereich der active site liegt oder um die Längsachse (17-Ketogruppe in der *active site*), so dass die Methylgruppen auf der gegenüberliegenden Seite der Steroidebene liegen.

Der Vergleich diverser Flavone auf ihre Fähigkeit die 17 β HSD1 zu hemmen, machte deutlich, dass die Existenz der 7, 5 und 4' Hydroxylgruppe die inhibitorische Wirkung verstärkt, die 7 Hydroxylgruppe auf jeden Fall essentiell ist (Le Bail *et al.*, 1998; Le Bail *et al.*, 2001; Makela *et al.*, 1998). Eine Substitution der 7 oder 4' Hydroxylgruppe durch eine Methoxygruppe führte zum vollständigen Verlust der hemmenden Wirkung, ebenso eine zusätzliche Hydroxylgruppe an C3. Im Gegensatz dazu ist die hemmende Wirkung auf die 17 β HSD2 für 3,5,7-tri-Hydroxyflavon am größten, die 3-Hydroxylgruppe steigert die Aktivität sogar. Die durchgeführten STD- und Docking-Experimente geben Aufschluss über die Bindungsepitope und die wahrscheinliche Konformation und Lage in der Bindungstasche. Leu149 auf der β -Seite der Steroidebene bildet zusammen mit dem gegenüberliegenden Val225 eine gestapelte Anordnung, zwischen der der Steroid-A-Ring eingespannt ist (Nahoum *et al.*, 2003). Die Positionierung von aromatischen Ringen in diesem Bereich scheint für die Bindung von Liganden vorteilhaft zu sein.

Mit abnehmender inhibitorischer Aktivität (Apigenin $IC_{50}=0,3\mu M$, 7-Hydroxyflavon $IC_{50}=0,9\mu M$, Chrysin $IC_{50}=3,6\mu M$) nimmt im Docking auch die Eindeutigkeit der gefundenen Konformationen ab. Dennoch zeigen alle genannten Flavone dieselbe Bindungskonformation. Je nach Vorhandensein der Hydroxylgruppe stabilisieren Wasserstoffbrücken zu Tyr155, Ser142, Glu194 und His221 die Bindung an das Protein. Das Doppelringssystem befindet sich im etwas hydrophileren Teil der Bindungstasche, nämlich zur active site orientiert. Der Phenylring hingegen liegt im hydrophoben inneren Teil der Bindungstasche. Eine Methoxygruppe an Position 4' führt zum völligen Verlust der inhibitorischen Fähigkeiten eines Liganden. Im Docking ist zu erkennen, dass die 4'-Methoxygruppe des Liganden 84 eine Verschiebung des gesamten Moleküls zur Folge hat, was in einer ungünstigeren Bindungsposition resultiert. Die Addition einer 3-Hydroxylgruppe verringert ebenfalls die inhibitorische Leistung, was durch die Positionierung dieser Hydroxylgruppe im hydrophoben Inneren der Bindungstasche erklärt werden kann. Eine Substitution der 7-Hydroxy- durch eine Methoxygruppe verhindert das Ausbilden einer Wasserstoffbrücke zu Glu194. Da diese Substitution mit einem vollständigen Verlust der Hemmung einhergeht, scheint diese Bindung von besonderer Bedeutung zu sein. Die STD-Ergebnisse bestätigen diese These durch hohe relative STD-Effekte in diesem Bereich

sowohl bei 84 als auch 25. Im Einklang dazu kommen den Protonen der Methoxygruppe bei 84 nur sehr schwache relative STD-Effekte zu. Die Bindung des deutlich voluminöseren Liganden 25 an die 17 β HSD1 resultiert in einer grundsätzlich vergleichbaren Position, allerdings verbunden mit einer Verschiebung des gesamten Moleküls. Hier scheinen nur Wasserstoffbrücken zu Glu194 und His221 möglich zu sein. Die beiden Phenylringe liegen parallel zueinander und bilden mit den Aminosäureresten Tyr218 und Phe259 eine stapelförmige Anordnung.

Die kürzlich veröffentlichte neue Klasse von 17 β HSD1 Inhibitoren, die auf einem Pyrimidon-Gerüst basieren, zeigen eine grundsätzlich vergleichbare Bindungskonformation. Das einen Aromaten und zwei Heterozyklen umfassende Grundgerüst bindet wie der Doppelring der Flavone in einer Orientierung zur NADP-Bindungstasche, während die zwei Substituenten eine stapelförmige Anordnung aufweisen.

Coumestrol, strukturell mit den Flavonen verwandt, nimmt ebenfalls eine Bindungsposition ein, die der der Flavone entspricht. Da Coumestrol keine Methylgruppe besitzt und völlig planar ist, kann die im Docking gefundene Bevorzugung der einen Orientierung gegenüber der um 180° gedrehten (wie bei Androgenen) nur durch eine bessere Stabilisierung durch Wasserstoffbrücken hervorgerufen werden.

Abgesehen von den Liganden 35 und 83, deren Steroidgerüst aufgrund ihrer Substituenten in eine unvorteilhafte Position gezwungen wird, weist bei allen anderen Liganden einer der vorhandenen Aromaten die höchste Signalintensität auf. Das Vorhandensein eines oder mehrerer aromatischer Ringe scheint demzufolge für die Entwicklung neuer 17 β -HSD1-Inhibitoren essentiell zu sein.

17 β HSD2

Für die Bindung einzelner Liganden an die 17 β HSD2 brachte die Bestimmung der Bindungs epitope teilweise große Ähnlichkeiten aber auch stellenweise deutliche Unterschiede im Vergleich zur Bindung an die 17 β HSD1 hervor. Die Verteilung der relativen Signalintensitäten bei Estradiol ist durchweg vergleichbar. Bei Equilin hingegen ist die Signalintensität der Methylgruppe in etwa so hoch wie die der Aromaten, so dass von einer größeren räumlichen Nähe zwischen der Proteinoberfläche und der Methylgruppe ausgegangen werden kann. Coumestrol, dessen inhibitorische Fähigkeit gegenüber der 17 β HSD2 bekannt ist, scheint so stark zu binden, dass keine STD-Effekte zu beobachten sind. Ähnlich wie bei der 17 β HSD1 macht es den Eindruck, dass auch bei der 17 β HSD2 das Vorhandensein eines aromatischen Ringes essentiell ist, was sich durch besonders große STD-Effekte im Bereich der

Aromaten ausdrückt. Einzig der Ligand 7C macht dabei eine Ausnahme, hier zeigen die Methylgruppen die höchsten relativen STD-Effekte, während die Aromaten-Protonen mit 60-62% verhältnismäßig geringe relative STD-Intensitäten aufweisen.

4 Zusammenfassung

Das Steroid-Hormon 17β Estradiol ist maßgeblich an der Entstehung und Entwicklung von Brustkrebs, der mit Abstand häufigsten Krebserkrankung bei Frauen, beteiligt. Die intrazelluläre Verfügbarkeit des aktiven Estrogens, Estradiol, wird durch die 17β Hydroxysteroid-Dehydrogenase reguliert, die die NADPH-abhängige Reduktion von Estron zu Estradiol katalysiert. Damit stellt die 17β HSD1 einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Inhibitoren im Hinblick auf potente Wirkstoffe gegen Brustkrebs dar. Genaue Kenntnisse des Enzym-Substrat-Komplexes, besonders die detaillierte Bestimmung des Bindungsepitops, ermöglichen die Charakterisierung und Klassifikation und als Folge daraus die gezielte Verbesserung vorhandener Inhibitoren.

Die Verwendung der 17β HSD1 für derartige funktionelle Untersuchungen erfordert die Expression von löslichem, rekombinanten Protein. Im Rahmen dieser Arbeit wird zum ersten Mal die heterologe Expression der 17β HSD1 in *E. coli* beschrieben. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der 17β HSD1 erfolgte die Expression als Fusionsprotein mit diversen Löslichkeitsvermittelnden Proteinen. Durch die Verwendung von bakteriellen Expressionssystemen mit *E. coli* eigenen Promotoren und einer Optimierung des Expressions- und Wachstumsverhaltens der Bakterien konnte die Expressionsrate bis auf 200 mg/l MBP-HSD1 Fusionsprotein gesteigert werden. Für die weiteren Untersuchungen mußte aber zusätzlich ein Isolationsverfahren für die Darstellung homogenen Proteins entwickelt werden.

Da die 17β HSD1 bei den für NMR-Untersuchungen des Proteins notwendigen, hohen Proteinkonzentrationen aggregierte, wurde die 17β HSD1 mit der eigens für diesen Zweck vorgestellten B1-Domäne des Proteins G fusioniert, die aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes nicht proteolytisch abgetrennt werden muss.

Für STD-NMR- und ePHOGSY-Experimente wurde die 17β HSD1 fusioniert mit dem *maltose-binding protein* verwendet, da das Protein in dieser Form in nur einem Schritt zu großer Homogenität aufgereinigt werden konnte.

STD-NMR-Experimente, in Kombination mit ePHOGSY-NMR-Experimenten, liefern Informationen über die Wechselwirkung zwischen einem Protein und verschiedenen Liganden und lassen sich quantitativ auswerten, um die Bindungsepitope der Liganden zu bestimmen. In Kombination mit Docking Experimenten können detaillierte Aussagen über die Bindungsgeometrie und die an der Bindung beteiligten Gruppen gemacht werden. AUTODOCK

kann die in der Kristallstruktur gefundenen Bindungspositionen von Estradiol und Dihydrotestosteron mit erstklassiger Korrelation reproduzieren.

Die Bestimmung des Bindungsepitops von Estradiol bei der Bindung an die 17 β HSD1 ergab im Bereich des aromatischen A-Rings und der Methylprotonen die stärksten Wechselwirkungen. Bei den untersuchten steroidaligen Liganden wurde deutlich, dass bei der Wahl der Art und der Position von Substituenten darauf zu achten ist, dass sie die optimale Bindungsposition des Steroidgerüsts möglichst wenig beeinflussen. Die Addition eines hydrophoben Phenylrestes an Position C3 zum Beispiel führt zu einer vollständigen Drehung des Liganden. Ein an der Position C15 α -ständig addierter Butylrest führt aufgrund sterischer Hinderung zu einer starken Verschiebung des Steroidgerüsts. C16 β -ständig addierte Substituenten hingegen ermöglichen eine mehr oder weniger unveränderte Bindungsposition des Steroids (Allan *et al.*, 2006).

Die Untersuchung verschiedener Flavone ergab, dass alle Flavone eine im Wesentlichen ähnliche Bindungsposition einnehmen, bei der das etwas hydrophilere Doppelringssystem zur active site orientiert ist und sich der zusätzliche Phenylrest im hydrophoben Inneren der Bindungstasche befindet. Da dieser Phenylrest frei drehbar ist, kann er entweder durch die sich gegenüberliegenden Aminosäuren Leu149 und Val225 aufgespannt sein (ähnlich des A-Rings in Estrogenen) oder durch eine stapelförmige Anordnung der Aminosäuren Phe259 oder Tyr218 stabilisiert werden. Alle Hydroxylgruppen der Flavone können Wasserstoffbrücken zu verschiedenen Resten (Tyr155, Ser142, Glu194, His221) ausbilden.

Abgesehen von den Liganden 35 und 83, deren Steroidgerüst aufgrund ihrer Substituenten in eine unvorteilhafte Position gezwungen wird, weist bei allen anderen Liganden einer der vorhandenen Aromaten die höchste Signalintensität auf. Das Vorhandensein eines oder mehrerer aromatischer Ringe scheint demnach für 17 β HSD1-Inhibitoren essentiell zu sein.

Bei der Bindung von Estradiol an die 17 β HSD2 zeigen sich große Ähnlichkeiten in den Bindungsepitopen. Auch hier läßt der Vergleich der Bindungsepitope der untersuchten Liganden den Schluß zu, dass das Vorhandensein eines aromatischen Rings für die Bindung an die 17 β HSD2 von besonderer Bedeutung ist.

Zusammenfassend wurden Strategien und Methoden entwickelt, die 17 β HSD1 durch heterologe Expression erstmals in *E coli* darzustellen. Durch NMR-Spektroskopie in Kombination mit Docking konnten detaillierte Aussagen über die Bindungsepitope der untersuchten Liganden gemacht werden. Diese Informationen sind für eine gerichtete Optimierung von Leitstrukturen von großer Bedeutung.

5 Anhang

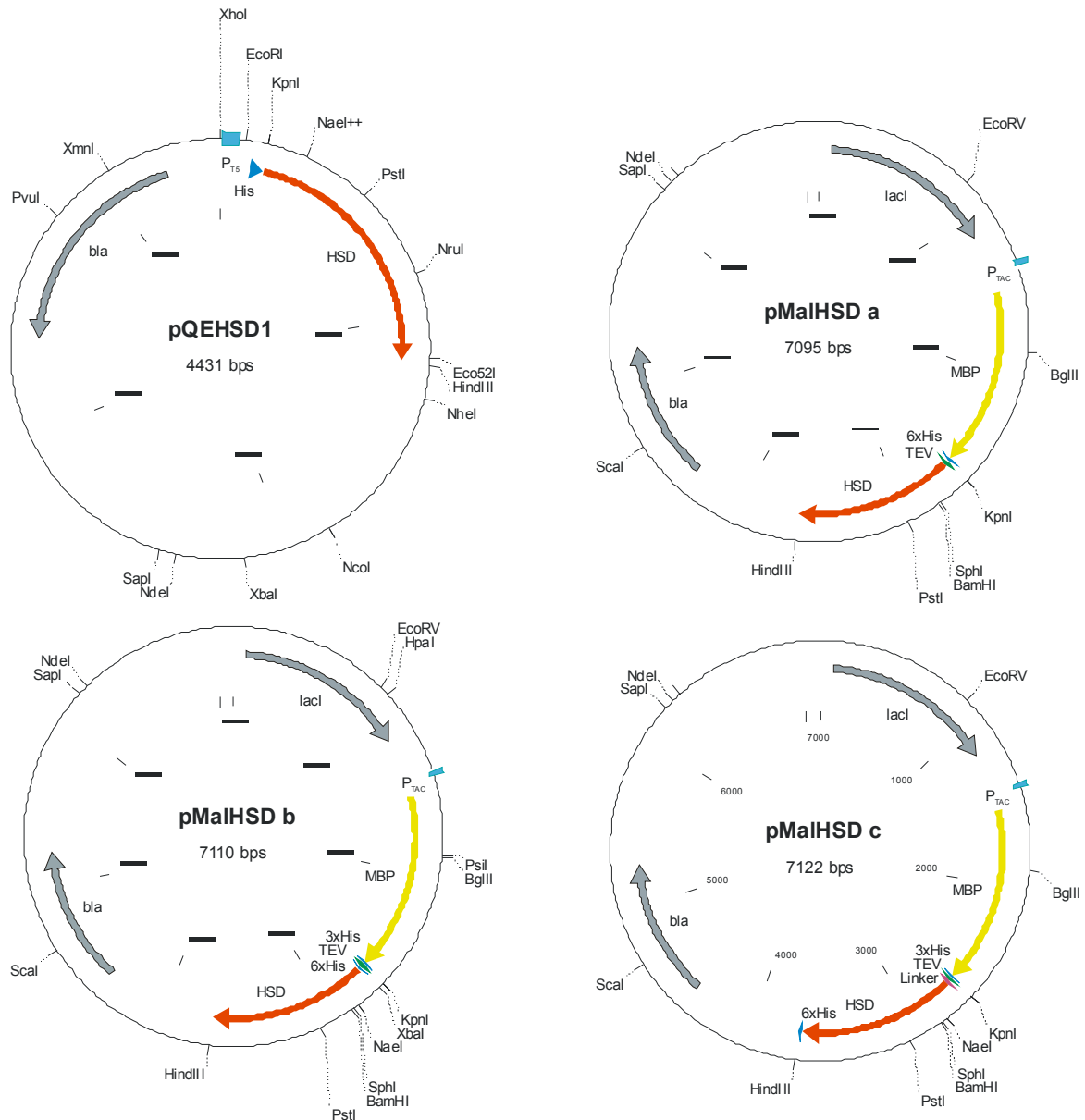


Abbildung 5.1: Plasmidkarten der Expressionsplasmide pQEHS1, pMalHSD a, pMalHSD b und pMalHSD c

17 β HSD1 (HSD; rot), *maltose-binding protein* (malE; gelb), *his-tag* (His; blau), Proteolysesequenz der TEV-Protease (TEV; grün), Linker (Linker; magenta), T5-Promotor (P_{T5}; blau), tac-Promotor (P_{TAC}; blau), β -acLtamase (bla; grau), lac Repressor (lacI; grau),

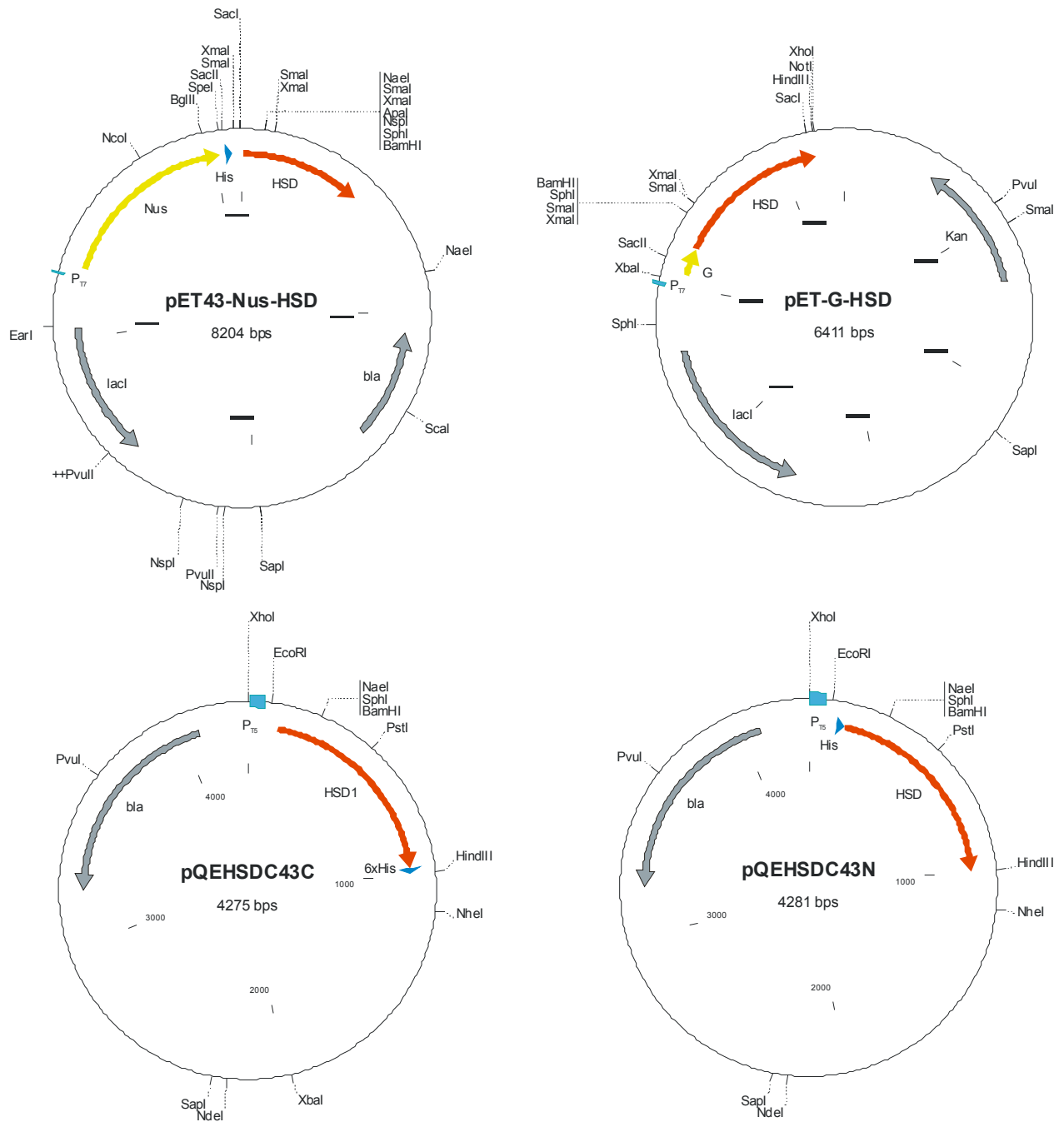


Abbildung 5.2: Plasmidkarten der Expressionsplasmide pET-Nus-HSD, pET-G-HSD, pQE-HSD-C43C und pQE-HSD-C43N

17 β HSD1 (HSD; rot), Sequenz für das Protein G (G, gelb), Sequenz für das Protein NusA (Nus, gelb), *his-tag* (His; blau), T5-Promotor (P_{T5}; blau), T7-Promotor (P_{T7}; blau), β -Lactamase (bla; grau), lac Repressor (lacI; grau),

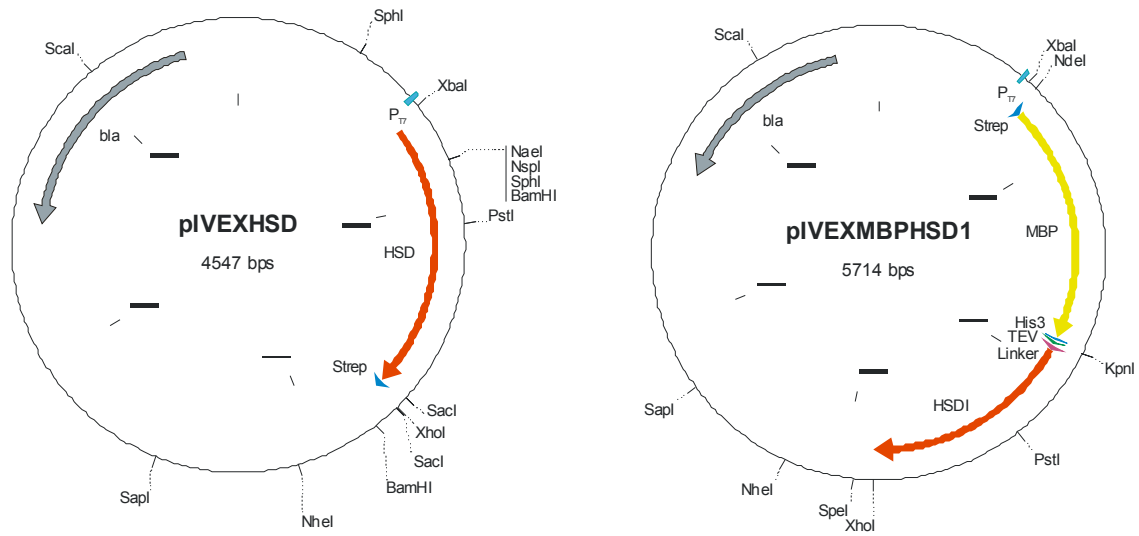


Abbildung 5.3: Plasmidkarten der Expressionsplasmide pIVEXHSD und pIVEXMBPHSD1
 17 β HSD1 (HSD; rot), *maltose-binding protein* (malE; gelb), *his-tag* (His; blau), Proteolysesequenz der TEV-Protease (TEV; grün), Linker (Linker; magenta), T7-Promotor (P_{T7}; blau), β -Lactamase (bla; grau), , Strep-tag (Strep blau)

5.1 Pulsprogramme

STD	ePHOGSY
<pre> ;zgstdwg.ug "p2=p1*2" "d5=1m" #include <Avance.incl> #include <Grad.incl> 1 ze 2 d12 fq1:f1 ;4u BLKGRAD d12 pl31:f1 ; STD 3 (p5:sp5 ph1):f1 d5 lo to 3 times 13 d12 fq1:f1 d12 pl1:f1 50u UNBLKGRAD p1 ph1 ; WATERGATE d12 pl31:f1 p16:gp1 d16 (p7:sp7 ph2:r):f1 4u d12 pl1:f1 p1*2 ph1 4u d12 pl31:f1 (p7:sp7 ph2:r):f1 d12 p16:gp1 d16 4u BLKGRAD go=2 ph31 wr #0 ;4u BLKGRAD exit ph1=0 ph2=2 ph31=0 2 </pre>	<pre> ;ephogsy1.ug "p2=p1*2" #include <Avance.incl> #include <Grad.incl> 1 ze 2 d1 pl1:f1 50u UNBLKGRAD p1 ph0 p15:gp1 d15 pl31:f1 (p5:sp5 ph1):f1 p15:gp1 d15 pl1:f1 p1 ph0 ; mixing p17:gp4 d17 (p2 ph0):f1 p17:gp5 d17 ;pl31:f1 ; (p6:sp6 ph5):f1 ;flip back (p7:sp7 ph5):f1 ;flip back 4u d12 pl1:f1 (p1 ph0):f1 ; watergate p16:gp2 d16 pl31:f1 (p7:sp7 ph6:r):f1 4u d12 pl1:f1 p2 ph0 4u d12 pl31:f1 p16:gp2 d16 p18:gp3 d18 (p7:sp7 ph2:r):f1 4u d12 pl1:f1 p2 ph3 p18:gp3 d18 4u BLKGRAD go=2 ph31 wr #0 exit ph0=0 ph1=0 3 2 1 ph2=2 2 2 2 1 1 1 1 0 0 0 0 3 3 3 3 ph3=0 0 0 0 3 3 3 3 2 2 2 2 1 1 1 1 ph4=0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 ph5=2 0 ph6=2 ph31=0 2 0 2 2 0 2 0 </pre>

5.2 Chemische Verschiebungen der Liganden

5.2.1 Steroidale Liganden

Estradiol

Proton	Chemical shift [ppm]	Proton	chemical shift [ppm]
H1	7,22 / 7,20	H9 α	2,13
H2	6,65 / 6,64	H16 α	2,02
H4	6,59	H12 α	1,86
H17 α	3,69	H7 β	1,1652
H6 α + β	2,75	H15 α	1,45
H11 α	2,28	H18 (CH ₃)	0,71

Equilin

Proton	Chemical shift [ppm]	Proton	chemical shift [ppm]
H1	8,41 / 8,12	H11 α	3,38 / 3,31
H2	7,86 / 7,85	H9 α	3,18
H4	7,79	H16 α	2,80 / 2,77
H7	7,53 / 7,52 / 7,51	H12 α	2,64
H6 α + β	3,55	H18 (CH ₃)	0,81

Ligand 35

Proton	Chemical shift [ppm]	Proton	chemical shift [ppm]
H1	7,29 / 7,28	H11 α	2,50
H2	6,88 / 6,86	H9 α	2,36
H4	6,84	H16 α	2,20
H1'	3,81	H12 α	2,03 / 1,99
H5'	3,73	H7 β	1,80
H3'+ H4'	3,57	H15 α	1,60
H2'	3,09	H18 (CH ₃)	0,88
H6 α + β	2,83		

Ligand 83

Proton	Chemical shift [ppm]	Proton	chemical shift [ppm]
H1	7,34	H16 α	2,14
H2 + H4	6,77	H12 α	1,91
H6 α + β	2,97	H7 β	1,28
H19	2,48	H21	1,71
H11 α	2,59	H22	1,14
H9 α	2,48	H18 (CH ₃)	0,99
H20	2,36		

5.2.2 Phytoestrogene

Coumestrol

Proton	Chemical shift [ppm]	Proton	chemical shift [ppm]
H2'	7,78 / 7,76	H8	6,91 / 6,90
H5	7,68 / 7,67	H3'	6,72 / 6,71
H5'	7,10	H6	6,60

Ligand 84

Proton	Chemical shift [ppm]	Proton	chemical shift [ppm]
H2' + H6'	8,14 / 8,13	H6	5,94
H3' + H5'	7,11 / 7,09	H7'	3,86
H8	6,13		

Ligand 25

Proton	Chemical shift [ppm]	Proton	chemical shift [ppm]
H2' + H6'	7,83	H6	6,96
H11 + H15	7,58	H8	6,88
H13	7,30	H3' + H5'	6,84
H12 + H14	7,24	H9	5,77

5.2.3 Nicht-steroidale Liganden

Ligand 85

Proton	Chemical shift [ppm]	Proton	chemical shift [ppm]
H4	7,40	H14	2,78
H7	7,10	H13	2,20
H5	6,76	H11	1,74
H12	3,80		

Ligand 5C

Proton	chemical shift [ppm]	Proton	chemical shift [ppm]
H15 + H17	7,54	H9 + H11	6,80 / 6,79
H16	7,45	H6	3,72
H14 + H18	7,40 / 7,39	H20	2,23
H8 + H12	7,13 / 7,11	H19	2,16

Ligand 7C

Proton	chemical shift [ppm]	Proton	chemical shift [ppm]
H8+12	7,04 / 7,03	H13	2,26
H9+11	6,77 / 6,76	H14	2,01
H6	3,60		

5.3 Abkürzungen

17 β HSD1	17 β Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1
17 β HSD2	17 β Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2
AKR	Aldoketoreduktasen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
CECF	<i>continuous exchange cell free</i>
Da	Dalton
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxy-Nucleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E2	Estradiol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ePHOGSY	<i>enhanced protein hydration observed through gradient spectroscopy</i>
HTS	<i>high-throughput screening method</i>
IEC	Ionenaustauschchromatographie (<i>ion exchange chromatographie</i>)
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
LB	Luria Broth Medium
M	mol/l
MBP	<i>maltose binding protein</i>
MCAC	Metallchelat-Affinitätschromatographie
MCS	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MWCO	Molecular weight cut off
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	Kernmagnetische Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOE	<i>Nuclear Overhauser effect</i>

NTA	Nitrilotriessigsäure
NusA	<i>N-utilisation substance protein A</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
P	Progesteron
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
SAP	Alkalische Phosphatase aus Shrimps (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
SAR	<i>structure-activity relationship</i>
SDR	<i>Short-Chain-Dehydrogenase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
STD	<i>saturation transfer difference</i>
T	Testosteron
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	<i>transverse-relaxation-optimized-spectroscopy</i>
WaterLOGSY	<i>water-ligand observed via gradient spectroscopy</i>
ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge

6 Literaturverzeichnis

- Adamski, J. und F. Jakob (2001):** A guide to 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases, *Molecular and cellular Endocrinology* **171**: 1-4.
- Adamski, J., T. Normand, F. Leenders, D. Monte, A. Begue, D. Stehelin, P. W. Jungblut und Y. de Launoit (1995):** Molecular cloning of a novel widely expressed human 80 kDa 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV, *Biochem J* **311 (Pt 2)**: 437-43.
- Allan, G. M., H. R. Lawrence, J. Cornet, C. Bubert, D. S. Fischer, N. Vicker, A. Smith, H. J. Tutill, A. Purohit, J. M. Day, M. F. Mahon, M. J. Reed und B. V. Potter (2006):** Modification of estrone at the 6, 16, and 17 positions: novel potent inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *J Med Chem* **49(4)**: 1325-45.
- Andersson, S. (1995):** Molecular genetics of androgenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases, *J Steroid Biochem Mol Biol* **55(5-6)**: 533-4.
- Andersson, S., W. M. Geissler, L. Wu, D. L. Davis, M. M. Grumbach, M. I. New, H. P. Schwarz, S. L. Blethen, B. B. Mendonca, W. Bloise, S. F. Witchel, G. B. Cutler, Jr., J. E. Griffin, J. D. Wilson und D. W. Russel (1996):** Molecular genetics and pathophysiology of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency, *J Clin Endocrinol Metab* **81(1)**: 130-6.
- Ando, A., Y. Y. Kikuti, A. Shigenari, H. Kawata, N. Okamoto, T. Shiina, L. Chen, T. Ikemura, K. Abe, M. Kimura und H. Inoko (1996):** cDNA cloning of the human homologues of the mouse Ke4 and Ke6 genes at the centromeric end of the human MHC region, *Genomics* **35(3)**: 600-2.
- Auchus, R. J. und D. F. Covey (1986):** Mechanism-based inactivation of 17 beta,20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase by an acetylenic secoestradiol, *Biochemistry* **25(23)**: 7295-300.
- Azzi, A., P. H. Rehse, D. W. Zhu, R. L. Campbell, F. Labrie und S. X. Lin (1996):** Crystal structure of human estrogenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase complexed with 17 beta-estradiol, *Nat Struct Biol* **3(8)**: 665-8.
- Bairoch, A. und B. Boeckmann (1993):** *Nucleic Acids Research* **21**: 3093-3096.
- Beaudoin, C., C. H. Blomquist und Y. Tremblay (1995):** Gene expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 isozyme in primary cultures of human trophoblasts

- predicts different mechanisms regulating type 1 and type 2 enzymes, *Endocrinology* **136**(9): 3807-14.
- Bleau, G., K. D. Roberts und A. Chapdelaine (1974):** The in vitro and in vivo uptake and metabolism of steroids in human adipose tissue, *J Clin Endocrinol Metab* **39**(2): 236-46.
- Blomquist, C. H. (1995):** Kinetic analysis of enzymic activities: prediction of multiple forms of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *J Steroid Biochem Mol Biol* **55**(5-6): 515-24.
- Blomquist, C. H., D. G. Bealka, H. C. Hensleigh und G. E. Tagatz (1994):** A comparison of 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase type 1 and type 2 activity of cytosol and microsomes from human term placenta, ovarian stroma and granulosa-luteal cells, *J Steroid Biochem Mol Biol* **49**(2-3): 183-9.
- Blomquist, C. H., C. E. Kotts und E. Y. Hakanson (1983):** Characterization of a nonenzymatic component in the isomerization of 5-pregnene-3,20-dione catalyzed by human placental microsomes in vitro, *Arch Biochem Biophys* **224**(2): 405-15.
- Blomquist, C. H., N. J. Lindemann und E. Y. Hakanson (1984):** Inhibition of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17 beta-HSD) activities of human placenta by steroids and non-steroidal hormone agonists and antagonists, *Steroids* **43**(5): 571-86.
- Blomquist, C. H., N. J. Lindemann und E. Y. Hakanson (1985):** 17 beta-hydroxysteroid and 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activities of human placental microsomes: kinetic evidence for two enzymes differing in substrate specificity, *Arch Biochem Biophys* **239**(1): 206-15.
- Bogovich, K. und A. H. Payne (1980):** Purification of rat testicular microsomal 17-ketosteroid reductase. Evidence that 17-ketosteroid reductase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase are distinct enzymes, *J Biol Chem* **255**(12): 5552-9.
- Brereton, P., T. Suzuki, H. Sasano, K. Li, C. Duarte, V. Obeyesekere, F. Haeseleer, K. Palczewski, I. Smith, P. Komesaroff und Z. Krozowski (2001):** *Molecular and cellular Endocrinology* **171**: 111-117.
- Breton, R., D. Housset, C. Mazza und J. C. Fontecilla-Camps (1996):** The structure of a complex of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and NADP⁺ identifies two principal targets for the design of inhibitors, *Structure* **4**(8): 905-15.
- Breton, R., F. Yang, J. Z. Jin, B. Li, F. Labrie und S. X. Lin (1994):** Human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: overproduction using a baculovirus expression system and characterization, *J Steroid Biochem Mol Biol* **50**(5-6): 275-82.

- Breuer, H., R. Knuppen und M. Haupt (1966):** Metabolism of oestrone and oestradiol-17-beta in human liver in vitro, *Nature* **212**(57): 76.
- Brown, W. M., L. E. Metzger, J. P. Barlow, L. A. Hunsaker, L. M. Deck, R. E. Royer und D. L. Vander Jagt (2003):** 17-beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: computational design of active site inhibitors targeted to the Rossmann fold, *Chem Biol Interact* **143-144**: 481-91.
- Bydal, P., S. Auger und D. Poirier (2004):** Inhibition of type 2 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase by estradiol derivatives bearing a lactone on the D-ring: structure-activity relationships, *Steroids* **69**(5): 325-42.
- Calle, E. E., H. L. Miracle-McMahill, M. J. Thun und C. W. Heath, Jr. (1995):** Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women, *J Natl Cancer Inst* **87**(7): 517-23.
- Carrington, J. C. und W. G. Dougherty (1988):** A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing, *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(10): 3391-5.
- Carsol, J. L., P. M. Martin und Y. de Launoit (1994):** Characterization of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and mRNA abundance in human meningioma tumors, *Neuroendocrinology* **60**(4): 445-51.
- Casey, M. L., P. C. MacDonald und S. Andersson (1994):** 17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2: chromosomal assignment and progestin regulation of gene expression in human endometrium, *J Clin Invest* **94**(5): 2135-41.
- Chai, Z., P. Brereton, T. Suzuki, H. Sasano, V. Obeyesekere, G. Escher, R. Saffery, P. Fuller, C. Enriquez und Z. Krozowski (2003):** 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type XI localizes to human steroidogenic cells, *Endocrinology* **144**(5): 2084-91.
- Cohen, S. N., A. C. Chang und L. Hsu (1972):** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(8): 2110-4.
- Collins, B. M., J. A. McLachlan und S. F. Arnold (1997):** The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast, *Steroids* **62**(4): 365-72.

- Dalvit, C., G. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesi und B. Stockman (2001):** WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: practical aspects and range of applicability, *J Biomol NMR* **21**(4): 349-59.
- Davis, G. D., C. Elisee, D. M. Newham und R. G. Harrison (1999):** New fusion protein systems designed to give soluble expression in Escherichia coli, *Biotechnol Bioeng* **65**(4): 382-8.
- di Guan, C., P. Li, P. D. Riggs und H. Inouye (1988):** Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in Escherichia coli by fusion to maltose-binding protein, *Gene* **67**(1): 21-30.
- Dougherty, W. G., T. D. Parks, S. M. Cary, J. F. Bazan und R. J. Fletterick (1989):** Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49-kDa proteinase, *Virology* **172**(1): 302-10.
- Durocher, F., J. Morissette, Y. Labrie, F. Labrie und J. Simard (1995):** Mapping of the HSD17B2 gene encoding type II 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase close to D16S422 on chromosome 16q24.1-q24.2, *Genomics* **25**(3): 724-6.
- El-Alfy, M., V. Luu-The, X. F. Huang, L. Berger, F. Labrie und G. Pelletier (1999):** Localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry, *Endocrinology* **140**(3): 1481-91.
- Elo, J. P., L. A. Akinola, M. Poutanen, P. Vihko, A. P. Kyllonen, O. Lukkarinen und R. Vihko (1996):** Characterization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoenzyme expression in benign and malignant human prostate, *Int J Cancer* **66**(1): 37-41.
- Elo, J. P., P. Harkonen, A. P. Kyllonen, O. Lukkarinen, M. Poutanen, R. Vihko und P. Vihko (1997):** Loss of heterozygosity at 16q24.1-q24.2 is significantly associated with metastatic and aggressive behavior of prostate cancer, *Cancer Res* **57**(16): 3356-9.
- Elo, J. P., P. Harkonen, A. P. Kyllonen, O. Lukkarinen und P. Vihko (1999):** Three independently deleted regions at chromosome arm 16q in human prostate cancer: allelic loss at 16q24.1-q24.2 is associated with aggressive behaviour of the disease, recurrent growth, poor differentiation of the tumour and poor prognosis for the patient, *Br J Cancer* **79**(1): 156-60.
- English, M. A., S. V. Hughes, K. F. Kane, M. J. Langman, P. M. Stewart und M. Hewison (2000):** Oestrogen inactivation in the colon: analysis of the expression and regulation of

- 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in normal colon and colonic cancer, *Br J Cancer* **83**(4): 550-8.
- English, M. A., K. F. Kane, N. Cruickshank, M. J. Langman, P. M. Stewart und M. Hewison (1999):** Loss of estrogen inactivation in colonic cancer, *J Clin Endocrinol Metab* **84**(6): 2080-5.
- English, M. A., P. M. Stewart und M. Hewison (2001):** Estrogen metabolism and malignancy: analysis of the expression and function of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in colonic cancer, *Mol Cell Endocrinol* **171**(1-2): 53-60.
- Filling, C., K. D. Berndt, J. Benach, S. Knapp, T. Prozorovski, E. Nordling, R. Ladenstein, H. Jornvall und U. Oppermann (2002):** Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases, *J Biol Chem* **277**(28): 25677-84.
- Fink, J. (2003):** *Diplomarbeit am Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt.*
- Fox, J. D., R. B. Kapust und D. S. Waugh (2001):** Single amino acid substitutions on the surface of Escherichia coli maltose-binding protein can have a profound impact on the solubility of fusion proteins, *Protein Sci* **10**(3): 622-30.
- Fox, J. D. und D. S. Waugh (2003):** Maltose-binding protein as a solubility enhancer, *Methods Mol Biol* **205**: 99-117.
- Gangloff, A., A. Garneau, Y. W. Huang, F. Yang und S. X. Lin (2001):** Human oestrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase specificity: enzyme regulation through an NADPH-dependent substrate inhibition towards the highly specific oestrone reduction, *Biochem J* **356**(Pt 1): 269-76.
- Gangloff, A., R. Shi, V. Nahoum und S. X. Lin (2003):** Pseudo-symmetry of C19 steroids, alternative binding orientations, and multispecificity in human estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Faseb J* **17**(2): 274-6.
- Garfin, D. E. (1990):** One-dimensional gel electrophoresis, *Methods Enzymol* **182**: 425-41.
- Geissler, W. M., D. L. Davis, L. Wu, K. D. Bradshaw, S. Patel, B. B. Mendonca, K. O. Elliston, J. D. Wilson, D. W. Russell und S. Andersson (1994):** Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3, *Nat Genet* **7**(1): 34-9.
- Gesellschaft, der, e. K. i. D. e.V. und R. Koch-Institut (2006):** Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends.

- Ghosh, D., M. Erman, Z. Wawrzak, W. L. Duax und W. Pangborn (1994):** Mechanism of inhibition of 3 alpha, 20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase by a licorice-derived steroidal inhibitor, *Structure* **2**(10): 973-80.
- Ghosh, D., V. Z. Pletnev, D. W. Zhu, Z. Wawrzak, W. L. Duax, W. Pangborn, F. Labrie und S. X. Lin (1995):** Structure of human estrogenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase at 2.20 A resolution, *Structure* **3**(5): 503-13.
- Ghosh, D. und P. Vihko (2001):** Molecular mechanisms of estrogen recognition and 17-keto reduction by human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1, *Chem Biol Interact* **130-132**(1-3): 637-50.
- Ghosh, D., Z. Wawrzak, C. M. Weeks, W. L. Duax und M. Erman (1994):** The refined three-dimensional structure of 3-alpha,20-beta-hydroxysteroid dehydroganse and possible roles of the residues conserved in short-chain-dehydrogenases, *Structure* **2**: 629-40.
- Gronenborn, A. M., D. R. Filpula, N. Z. Essig, A. Achari, M. Whitlow, P. T. Wingfield und G. M. Clore (1991):** A novel, highly stable fold of the immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G, *Science* **253**(5020): 657-61.
- Gunther, U. L., C. Fischer und H. Ruterjans (2004).** Nuclear Magnetic Resonance-based Drug Discovery. Molecular Biology in Medicinal Chemistry. G. Folkers. Weinheim, Germany, Wiley-VCH: 242-268.
- Gunther, U. L., C. Ludwig und H. Ruterjans (2000):** NMRLAB-Advanced NMR data processing in matlab, *J Magn Reson* **145**(2): 201-8.
- Gunther, U. L., C. Ludwig und H. Ruterjans (2002):** WAVEWAT-improved solvent suppression in NMR spectra employing wavelet transforms, *J Magn Reson* **156**(1): 19-25.
- Hajduk, P. J., R. P. Meadows und S. W. Fesik (1997):** Discovering high-affinity ligands for proteins, *Science* **278**(5337): 497,499.
- Han, Q., R. L. Campbell, A. Gangloff, Y. W. Huang und S. X. Lin (2000):** Dehydroepiandrosterone and dihydrotestosterone recognition by human estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. C-18/c-19 steroid discrimination and enzyme-induced strain, *J Biol Chem* **275**(2): 1105-11.
- Hanahan, D. (1983):** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids, *J Mol Biol* **166**(4): 557-80.

- Hayhurst, A. und W. J. Harris (1999):** Escherichia coli skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of single-chain antibody fragments, *Protein Expr Purif* **15**(3): 336-43.
- He, X. Y., G. Merz, P. Mehta, H. Schulz und S. Y. Yang (1999):** Human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase is a single-domain multifunctional enzyme. Characterization of a novel 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *J Biol Chem* **274**(21): 15014-9.
- He, X. Y., G. Y. Wen, G. Merz, D. Lin, Y. Z. Yang, P. Mehta, H. Schulz und S. Y. Yang (2002):** Abundant type 10 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the hippocampus of mouse Alzheimer's disease model, *Brain Res Mol Brain Res* **99**(1): 46-53.
- High, S., N. Flint und B. Dobberstein (1991):** Requirements for the membrane insertion of signal-anchor type proteins, *J Cell Biol* **113**(1): 25-34.
- Hsu, T. A. und M. J. Betenbaugh (1997):** Coexpression of molecular chaperone BiP improves immunoglobulin solubility and IgG secretion from *Trichoplusia ni* insect cells, *Biotechnol Prog* **13**(1): 96-104.
- Inano, H. und B. Tamaoki (1983):** Affinity labeling of arginyl residues at the catalytic region of estradiol 17 beta-dehydrogenase from human placenta by 16-oxoestrone, *Eur J Biochem* **129**(3): 691-5.
- Inano, H. und B. Tamaoki (1986):** Testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: molecular properties and reaction mechanism, *Steroids* **48**(1-2): 1-26.
- Jackson, M. R., T. Nilsson und P. A. Peterson (1990):** Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum, *Embo J* **9**(10): 3153-62.
- Jacobsohn, G. M. und R. B. Hochberg (1968):** 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase from human red blood cells, *J Biol Chem* **243**(11): 2985-94.
- Jarabak, J., J. A. Adams, H. G. Williams-Ashman und P. Talalay (1962):** Purification of a 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta and studies on its transhydrogenase function, *J Biol Chem* **237**: 345-57.
- Jordan, V. C. (1988):** The development of tamoxifen for breast cancer therapy: a tribute to the late Arthur L. Walpole, *Breast Cancer Res Treat* **11**(3): 197-209.
- Jornvall, H., B. Persson, M. Krook, S. Atrian, R. Gonzalez-Duarte, J. Jeffery und D. Ghosh (1995):** Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR), *Biochemistry* **34**(18): 6003-13.

- Kapust, R. B. und D. S. Waugh (1999):** Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused, *Protein Sci* **8**(8): 1668-74.
- Kapust, R. B. und D. S. Waugh (2000):** Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease, *Protein Expr Purif* **19**(2): 312-8.
- Khan, N., K. K. Sharma, S. Andersson und R. J. Auchus (2004):** Human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases types 1, 2, and 3 catalyze bi-directional equilibrium reactions, rather than unidirectional metabolism, in HEK-293 cells, *Arch Biochem Biophys* **429**(1): 50-9.
- Klammt, C., F. Lohr, B. Schafer, W. Haase, V. Dotsch, H. Ruterjans, C. Glaubitz und F. Bernhard (2004):** High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins, *Eur J Biochem* **271**(3): 568-80.
- Krazeisen, A., R. Breitling, K. Imai, S. Fritz, G. Moller und J. Adamski (1999):** Determination of cDNA, gene structure and chromosomal localization of the novel human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7(1), *FEBS Lett* **460**(2): 373-9.
- Kyhse-Andersen, J. (1984):** Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J Biochem Biophys Methods* **10**(3-4): 203-9.
- Labrie, C., C. Martel, J. M. Dufour, C. Levesque, Y. Merand und F. Labrie (1992):** Novel compounds inhibit estrogen formation and action, *Cancer Res* **52**(3): 610-5.
- Labrie, F. (1991):** Intracrinology, *Mol Cell Endocrinol* **78**(3): C113-8.
- Labrie, F., V. Luu-The, S. X. Lin, C. Labrie, J. Simard, R. Breton und A. Belanger (1997):** The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology, *Steroids* **62**(1): 148-58.
- Labrie, Y., F. Durocher, Y. Lachance, C. Turgeon, J. Simard, C. Labrie und F. Labrie (1995):** The human type II 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene encodes two alternatively spliced mRNA species, *DNA Cell Biol* **14**(10): 849-61.
- Lacassagne, A. (1936):** Hormonal pathogenesis of adenocarcinoma of the breast, *Am. J. Cancer* **27**: 217-225.
- Langer, L. J. und L. L. Engel (1958):** Human placental estradiol-17 beta dehydrogenase. I. Concentration, characterization and assay, *J Biol Chem* **233**(3): 583-8.

- Lawate, S. S. und D. F. Covey (1990):** Trifluoromethylacetylenic alcohols as affinity labels: inactivation of estradiol dehydrogenase by a trifluoromethylacetylenic secoestradiol, *J Med Chem* **33**(9): 2319-21.
- Le Bail, J. C., T. Laroche, F. Marre-Fournier und G. Habrioux (1998):** Aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids, *Cancer Lett* **133**(1): 101-6.
- Le Bail, J. C., C. Pouget, C. Fagnere, J. P. Basly, A. J. Chulia und G. Habrioux (2001):** Chalcones are potent inhibitors of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities, *Life Sci* **68**(7): 751-61.
- Leenders, F., G. Prescher, V. Dolez, A. Begue, Y. de Launoit und J. Adamski (1996):** Assignment of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV to chromosome 5q2 by fluorescence in situ hybridization, *Genomics* **37**(3): 403-4.
- Levesque, C., Y. Merand, J. M. Dufour, C. Labrie und F. Labrie (1991):** Synthesis and biological activity of new halo-steroidal antiestrogens, *J Med Chem* **34**(5): 1624-30.
- Li, L., C. J. Falzone, P. E. Wright und S. J. Benkovic (1992):** Functional role of a mobile loop of Escherichia coli dihydrofolate reductase in transition-state stabilization, *Biochemistry* **31**(34): 7826-33.
- Lin, S. X., F. Yang, J. Z. Jin, R. Breton, D. W. Zhu, V. Luu-The und F. Labrie (1992):** Subunit identity of the dimeric 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from human placenta, *J Biol Chem* **267**(23): 16182-7.
- Lottspeich, F. und H. Zorbach (1998):** Bioanalytik, *Spektrum Verlag*.
- Lu, M. L., Y. W. Huang und S. X. Lin (2002):** Purification, reconstitution, and steady-state kinetics of the trans-membrane 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2, *J Biol Chem* **277**(25): 22123-30.
- Ludwig, C., P. J. A. Michiels, C. Fischer, J. Ride, C. Bunce und U. L. Gunther (2007):** SALMON: Solvent Accessibility, Ligand binding and Mapping of ligand Orientation by NMR spectroscopy, *submitted*.
- Luu The, V., C. Labrie, H. F. Zhao, J. Couet, Y. Lachance, J. Simard, G. Leblanc, J. Cote, D. Berube, R. Gagne und et al. (1989):** Characterization of cDNAs for human estradiol 17 beta-dehydrogenase and assignment of the gene to chromosome 17: evidence of two mRNA species with distinct 5'-termini in human placenta, *Mol Endocrinol* **3**(8): 1301-9.
- Luu-The, V. (2001):** Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *J Steroid Biochem Mol Biol* **76**(1-5): 143-51.

- Luu-The, V., C. Labrie, J. Simard, Y. Lachance, H. F. Zhao, J. Couet, G. Leblanc und F. Labrie (1990):** Structure of two in tandem human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase genes, *Mol Endocrinol* **4**(2): 268-75.
- Luu-The, V., Y. Zhang, D. Poirier und F. Labrie (1995):** Characteristics of human types 1, 2 and 3 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: oxidation/reduction and inhibition, *J Steroid Biochem Mol Biol* **55**(5-6): 581-7.
- Maina, C. V., P. D. Riggs, A. G. Grandea, 3rd, B. E. Slatko, L. S. Moran, J. A. Tagliamonte, L. A. McReynolds und C. D. Guan (1988):** An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein, *Gene* **74**(2): 365-73.
- Makela, S., V. L. Davis, W. C. Tally, J. Korkman, L. Salo, R. Vihko, R. Santti und K. S. Korach (1994):** Dietary Estrogens Act through Estrogen Receptor-Mediated Processes and Show No Antiestrogenicity in Cultured Breast Cancer Cells, *Environ Health Perspect* **102**(6-7): 572-8.
- Makela, S., M. Poutanen, M. L. Kostian, N. Lehtimaki, L. Strauss, R. Santti und R. Vihko (1998):** Inhibition of 17beta-hydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells, *Proc Soc Exp Biol Med* **217**(3): 310-6.
- Martel, C., E. Rheume, M. Takahashi, C. Trudel, J. Couet, V. Luu-The, J. Simard und F. Labrie (1992):** Distribution of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and activity in rat and human tissues, *J Steroid Biochem Mol Biol* **41**(3-8): 597-603.
- Maxwell, M. M., J. Nearing und N. Aziz (1995):** Ke 6 gene. Sequence and organization and aberrant regulation in murine polycystic kidney disease, *J Biol Chem* **270**(42): 25213-9.
- Mayer, M. und B. Meyer (2001):** Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor, *J Am Chem Soc* **123**(25): 6108-17.
- Mazza, C., R. Breton, D. Housset und J. C. Fontecilla-Camps (1998):** Unusual charge stabilization of NADP⁺ in 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *J Biol Chem* **273**(14): 8145-52.
- McMichael, A. J. und J. D. Potter (1982):** Colon cancer and sex, *Lancet* **1**(8282): 1190-1.
- Messinger, J., L. Hirvela, B. Husen, L. Kangas, P. Koskimies, O. Pentikainen, P. Saarenketo und H. Thole (2006):** New inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *Mol Cell Endocrinol* **248**(1-2): 192-8.

- Meyer, B. und T. Peters (2003):** NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors, *Angew Chem Int Ed Engl* **42**(8): 864-90.
- Miettinen, M., M. Mustonen, M. Poutanen, V. Isomaa, M. Wickman, G. Soderqvist, R. Vihko und P. Vihko (1999):** 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenases in normal human mammary epithelial cells and breast tissue, *Breast Cancer Res Treat* **57**(2): 175-82.
- Miettinen, M. M., M. V. Mustonen, M. H. Poutanen, V. V. Isomaa und R. K. Vihko (1996):** Human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 isoenzymes have opposite activities in cultured cells and characteristic cell- and tissue-specific expression, *Biochem J* **314** (Pt 3): 839-45.
- Milewich, L., R. L. Garcia und L. W. Gerrity (1985):** 17 beta-Hydroxysteroid oxidoreductase: a ubiquitous enzyme. Interconversion of estrone and estradiol-17 beta in BALB/c mouse tissues, *Metabolism* **34**(10): 938-44.
- Milewich, L., T. S. Hendricks und L. H. Romero (1982):** Interconversion of estrone and estradiol-17 beta in lung slices of the adult human, *J Steroid Biochem* **17**(6): 669-74.
- Mindnich, R., G. Moller und J. Adamski (2004):** The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases, *Mol Cell Endocrinol* **218**(1-2): 7-20.
- Miyoshi, Y., A. Ando, E. Shiba, T. Taguchi, Y. Tamaki und S. Noguchi (2001):** Involvement of up-regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in maintenance of intratumoral high estradiol levels in postmenopausal breast cancers, *Int J Cancer* **94**(5): 685-9.
- Moghrabi, N. und S. Andersson (1998):** 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases : Physiological roles in health and disease, *Trends in endocrinology and metabolism* **9**(7): 265-270.
- Moghrabi, N., J. R. Head und S. Andersson (1997):** Cell type-specific expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human placenta and fetal liver, *J Clin Endocrinol Metab* **82**(11): 3872-8.
- Moon, Y. A. und J. D. Horton (2003):** Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade, *J Biol Chem* **278**(9): 7335-43.
- Morris, G. M., D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew und A. J. Olson (1998):** Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and and Empirical Binding Free Energy Function, *J. Computational Chemistry* **19**: 1639-1662.
- Mullis, K. B. und F. A. Faloona (1987):** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol* **155**: 335-50.

- Murdock, G. L., C. C. Chin und J. C. Warren (1986):** Human placental estradiol 17 beta-dehydrogenase: sequence of a histidine-bearing peptide in the catalytic region, *Biochemistry* **25**(3): 641-6.
- Murdock, G. L., J. C. Warren und F. Sweet (1988):** Human placental estradiol 17 beta-dehydrogenase: evidence for inverted substrate orientation ("wrong-way" binding) at the active site, *Biochemistry* **27**(12): 4452-8.
- Mustonen, M. V., V. V. Isomaa, T. Vaskivuo, J. Tapanainen, M. H. Poutanen, F. Stenback, R. K. Vihko und P. T. Vihko (1998):** Human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 messenger ribonucleic acid expression and localization in term placenta and in endometrium during the menstrual cycle, *J Clin Endocrinol Metab* **83**(4): 1319-24.
- Nahoum, V., A. Gangloff, R. Shi und S. X. Lin (2003):** How estrogen-specific proteins discriminate estrogens from androgens: a common steroid binding site architecture, *Faseb J* **17**(10): 1334-6.
- Nishihara, K., M. Kanemori, M. Kitagawa, H. Yanagi und T. Yura (1998):** Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol* **64**(5): 1694-9.
- Oduwole, O. O., V. V. Isomaa, P. A. Nokelainen, F. Stenback und P. T. Vihko (2002):** Downregulation of estrogen-metabolizing 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression correlates inversely with Ki67 proliferation marker in colon-cancer development, *Int J Cancer* **97**(1): 1-6.
- Oduwole, O. O., J. M. Makinen, V. V. Isomaa, T. J. Karttunen und P. T. Vihko (2003):** Sex steroid metabolism in human gastric mucosa: 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in normal, inflamed and neoplastic gastric tissues, *Anticancer Res* **23**(5A): 3889-97.
- Okamoto, M., C. Lee und R. Oyasu (1997):** Autocrine effect of androgen on proliferation of an androgen responsive prostatic carcinoma cell line, LNCAP: role of interleukin-6, *Endocrinology* **138**(11): 5071-4.
- Oppermann, U., C. Filling, M. Hult, N. Shafqat, X. Wu, M. Lindh, J. Shafqat, E. Nordling, Y. Kallberg, B. Persson und H. Jornvall (2003):** Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update, *Chem Biol Interact* **143-144**: 247-53.
- Owen, C. P. und S. Ahmed (2004):** The derivation of a potential transition state for the reduction reaction catalysed by 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase--an approximate

- representation of its active site for use in drug design and discovery, *Biochem Biophys Res Commun* **318**(1): 131-4.
- Peltoketo, H., V. Isomaa, O. Maentausta und R. Vihko (1988)**: Complete amino acid sequence of human placental 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deduced from cDNA, *FEBS Lett* **239**(1): 73-7.
- Peltoketo, H., V. Isomaa, M. Poutanen und R. Vihko (1996)**: Expression and regulation of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *J Endocrinol* **150 Suppl**: S21-30.
- Peltoketo, H., V. Luu-The, J. Simard und J. Adamski (1999)**: 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes, *J Mol Endocrinol* **23**(1): 1-11.
- Phan, J., A. Zdanov, A. G. Evdokimov, J. E. Tropea, H. K. Peters, 3rd, R. B. Kapust, M. Li, A. Wlodawer und D. S. Waugh (2002)**: Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease, *J Biol Chem* **277**(52): 50564-72.
- Piotto, M., V. Saudek und V. Sklenar (1992)**: Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions, *J Biomol NMR* **2**(6): 661-5.
- Pittaway, D. E., R. N. Andersen, S. A. Coleman, Jr., J. R. Givens und W. L. Wisner (1983)**: Human ovarian 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase activity: a comparison of normal and polycystic ovarian tissues, *J Clin Endocrinol Metab* **56**(4): 715-9.
- Poirier, D., P. Bydal, M. R. Tremblay, K. M. Sam und V. Luu-The (2001)**: Inhibitors of type II 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Mol Cell Endocrinol* **171**(1-2): 119-28.
- Poirier, D., H. J. Chang, A. Azzi, R. P. Boivin und S. X. Lin (2006)**: Estrone and estradiol C-16 derivatives as inhibitors of type 1 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, *Mol Cell Endocrinol* **248**(1-2): 236-8.
- Poirier, D., P. Dionne und S. Auger (1998)**: A 6beta-(thiaheptanamide) derivative of estradiol as inhibitor of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *J Steroid Biochem Mol Biol* **64**(1-2): 83-90.
- Porath, J., J. Carlsson, I. Olsson und G. Belfrage (1975)**: Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature* **258**(5536): 598-9.
- Poulin, R., D. Baker, D. Poirier und F. Labrie (1989)**: Androgen and glucocorticoid receptor-mediated inhibition of cell proliferation by medroxyprogesterone acetate in ZR-75-1 human breast cancer cells, *Breast Cancer Res Treat* **13**(2): 161-72.

- Poutanen, M., V. Isomaa, K. Kainulainen und R. Vihko (1990):** Progesterin induction of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzyme protein in the T-47D human breast-cancer cell line, *Int J Cancer* **46**(5): 897-901.
- Pryor, K. D. und B. Leiting (1997):** High-level expression of soluble protein in Escherichia coli using a His6-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system, *Protein Expr Purif* **10**(3): 309-19.
- Puranen, T., M. Poutanen, D. Ghosh, P. Vihko und R. Vihko (1997):** Characterization of structural and functional properties of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 using recombinant enzymes and site-directed mutagenesis, *Mol Endocrinol* **11**(1): 77-86.
- Puranen, T. J., R. M. Kurkela, J. T. Lakkakorpi, M. H. Poutanen, P. V. Itaranta, J. P. Melis, D. Ghosh, R. K. Vihko und P. T. Vihko (1999):** Characterization of molecular and catalytic properties of intact and truncated human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzymes: intracellular localization of the wild-type enzyme in the endoplasmic reticulum, *Endocrinology* **140**(7): 3334-41.
- Puranen, T. J., M. H. Poutanen, H. E. Peltoketo, P. T. Vihko und R. K. Vihko (1994):** Site-directed mutagenesis of the putative active site of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *Biochem J* **304** (Pt 1): 289-93.
- Qiu, W., R. L. Campbell, A. Gangloff, P. Dupuis, R. P. Boivin, M. R. Tremblay, D. Poirier und S. X. Lin (2002):** A concerted, rational design of type 1 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors: estradiol-adenosine hybrids with high affinity, *Faseb J* **16**(13): 1829-31.
- Reed, M. J. (1991):** Oestradiol-17 beta hydroxysteroid dehydrogenase: its family and function, *J Endocrinol* **129**(2): 163-5.
- Reed, M. J., A. Singh, M. W. Ghilchik, N. G. Coldham und A. Purohit (1991):** Regulation of oestradiol 17 beta hydroxysteroid dehydrogenase in breast tissues: the role of growth factors, *J Steroid Biochem Mol Biol* **39**(5B): 791-8.
- Renart, J., J. Reiser und G. R. Stark (1979):** Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure, *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(7): 3116-20.
- Russo, J., M. Hasan Lareef, G. Balogh, S. Guo und I. H. Russo (2003):** Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells, *J Steroid Biochem Mol Biol* **87**(1): 1-25.

- Ryan, K. J. und L. L. Engel (1953):** The interconversion of estrone and estradiol by human tissue slices, *Endocrinology* **52**(3): 287-91.
- Sam, K., F. Labrie und D. Poirier (2000):** N-Butyl-N-methyl-11-(3'-hydroxy-21', 17'-carbopactone-19'-nor-17'alpha-pregna-1',3', 5'(10')-trien-7'alpha-yl)-undecanamide: an inhibitor of type 2 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase that does not have oestrogenic or androgenic activity, *Eur J Med Chem* **35**(2): 217-25.
- Sam, K. M., S. Auger, V. Luu-The und D. Poirier (1995):** Steroidal spiro-gamma-lactones that inhibit 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human placental microsomes, *J Med Chem* **38**(22): 4518-28.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989):** *Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Sasano, H., A. R. Frost, R. Saitoh, N. Harada, M. Poutanen, R. Vihko, S. E. Bulun, S. G. Silverberg und H. Nagura (1996):** Aromatase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human breast carcinoma, *J Clin Endocrinol Metab* **81**(11): 4042-6.
- Sawicki, M. W., M. Erman, T. Puranen, P. Vihko und D. Ghosh (1999):** Structure of the ternary complex of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 with 3-hydroxyestra-1,3,5,7-tetraen-17-one (equilin) and NADP⁺, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(3): 840-5.
- Shi, R. und S. X. Lin (2004):** Cofactor hydrogen bonding onto the protein main chain is conserved in the short chain dehydrogenase/reductase family and contributes to nicotinamide orientation, *J Biol Chem* **279**(16): 16778-85.
- Shimizu, Y., A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa und T. Ueda (2001):** Cell-free translation reconstituted with purified components, *Nat Biotechnol* **19**(8): 751-5.
- Shuker, S. B., P. J. Hajduk, R. P. Meadows und S. W. Fesik (1996):** Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR, *Science* **274**(5292): 1531-4.
- Soderqvist, G., M. Poutanen, M. Wickman, B. von Schoultz, L. Skoog und R. Vihko (1998):** 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in normal breast tissue during the menstrual cycle and hormonal contraception, *J Clin Endocrinol Metab* **83**(4): 1190-3.
- Speirs, V., A. R. Green und S. L. Atkin (1998):** Activity and gene expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I in primary cultures of epithelial and stromal cells

- derived from normal and tumorous human breast tissue: the role of IL-8, *J Steroid Biochem Mol Biol* **67**(3): 267-74.
- Spirin, A. S. (2004)**: High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins, *Trends Biotechnol* **22**(10): 538-45.
- Spirin, A. S., V. I. Baranov, L. A. Ryabova, S. Y. Ovodov und Y. B. Alakhov (1988)**: A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield, *Science* **242**(4882): 1162-4.
- Stockman, B. J. und C. Dalvit (2002)**: NMR screening techniques in drug discovery and drug design, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **41**(3-4): 187.
- Strickler, R. C., B. Tobias und D. F. Covey (1981)**: Human placental 17 beta-estradiol dehydrogenase and 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. Two activities at a single enzyme active site, *J Biol Chem* **256**(1): 316-21.
- Su, J., M. Lin und J. L. Napoli (1999)**: Complementary deoxyribonucleic acid cloning and enzymatic characterization of a novel 17beta/3alpha-hydroxysteroid/retinoid short chain dehydrogenase/reductase, *Endocrinology* **140**(11): 5275-84.
- Sweet, F., J. Boyd, O. Medina, L. Konderski und G. L. Murdock (1991)**: Hydrogen bonding in steroidogenesis: studies on new heterocyclic analogs of estrone that inhibit human estradiol 17 beta-dehydrogenase, *Biochem Biophys Res Commun* **180**(2): 1057-63.
- Tait, G. H., C. J. Newton, M. J. Reed und V. H. James (1989)**: Multiple forms of 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase in human breast tissue, *J Mol Endocrinol* **2**(1): 71-80.
- Takeyama, J., H. Sasano, T. Suzuki, K. Iinuma, H. Nagura und S. Andersson (1998)**: 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in human placenta: an immunohistochemical study with correlation to placental development, *J Clin Endocrinol Metab* **83**(10): 3710-5.
- Theriault, C. und F. Labrie (1991)**: Multiple steroid metabolic pathways in ZR-75-1 human breast cancer cells, *J Steroid Biochem Mol Biol* **38**(2): 155-64.
- Thomas, D. B. (1984)**: Do hormones cause breast cancer?, *Cancer* **53**(3 Suppl): 595-604.
- Thomas, J. L., M. C. LaRochelle, D. F. Covey und R. C. Strickler (1983)**: Inactivation of human placental 17 beta,20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase by 16-methylene estrone, an affinity alkylator enzymatically generated from 16-methylene estradiol-17 beta, *J Biol Chem* **258**(19): 11500-4.

- Timmons, T. M. und B. S. Dunbar (1990):** Protein blotting and immunodetection, *Methods Enzymol* **182**: 679-88.
- Tobias, B., D. F. Covey und R. C. Strickler (1982):** Inactivation of human placental 17 beta-estradiol dehydrogenase and 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase with active site-directed 17 beta-propynyl-substituted progestin analogs, *J Biol Chem* **257**(6): 2783-6.
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon (1979):** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4.
- Tremblay, M. R., S. Auger und D. Poirier (1995):** Synthesis of 16-(bromoalkyl)-estradiols having inhibitory effect on human placental estradiol 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17 beta-HSD type 1), *Bioorg Med Chem* **3**(5): 505-23.
- Tremblay, M. R., V. Luu-The, G. Leblanc, P. Noel, E. Breton, F. Labrie und D. Poirier (1999):** Spironolactone-related inhibitors of type II 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: chemical synthesis, receptor binding affinities, and proliferative/antiproliferative activities, *Bioorg Med Chem* **7**(6): 1013-23.
- Tremblay, M. R. und D. Poirier (1998):** Overview of a rational approach to design type I 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors without estrogenic activity: chemical synthesis and biological evaluation, *J Steroid Biochem Mol Biol* **66**(4): 179-91.
- Tseng, L., A. Stolee und E. Gurbide (1972):** Quantitative studies on the uptake and metabolism of estrogens and progesterone by human endometrium, *Endocrinology* **90**(2): 390-404.
- Utsunomiya, H., T. Suzuki, K. Ito, T. Moriya, R. Konno, S. Sato, N. Yaegashi, K. Okamura und H. Sasano (2003):** The correlation between the response to progestogen treatment and the expression of progesterone receptor B and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human endometrial carcinoma, *Clin Endocrinol (Oxf)* **58**(6): 696-703.
- Veech, R. L., L. V. Eggleston und H. A. Krebs (1969):** The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver, *Biochem J* **115**(4): 609-19.
- Vihko, P., P. Harkonen, O. Oduwale, S. Torn, R. Kurkela, K. Porvari, A. Pulkka und V. Isomaa (2002):** 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases and cancers, *J Steroid Biochem Mol Biol* **83**(1-5): 119-22.
- Vihko, P., P. Harkonen, P. Soronen, S. Torn, A. Herrala, R. Kurkela, A. Pulkka, O. Oduwale und V. Isomaa (2004):** 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases--their role in pathophysiology, *Mol Cell Endocrinol* **215**(1-2): 83-8.

- Weinstein, G. D., P. Frost und S. L. Hsia (1968):** In vitro interconversion of estrone and 17-beta-estradiol in human skin and vaginal mucosa, *J Invest Dermatol* **51**(1): 4-10.
- Wilkinson, D. L. und R. G. Harrison (1991):** Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*, *Biotechnology (N Y)* **9**(5): 443-8.
- Williamson, D. H., P. Lund und H. A. Krebs (1967):** The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver, *Biochem J* **103**(2): 514-27.
- Wu, L., M. Einstein, W. M. Geissler, H. K. Chan, K. O. Elliston und S. Andersson (1993):** Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity, *J Biol Chem* **268**(17): 12964-9.
- Yan, S. D., J. Fu, C. Soto, X. Chen, H. Zhu, F. Al-Mohanna, K. Collison, A. Zhu, E. Stern, T. Saido, M. Tohyama, S. Ogawa, A. Roher und D. Stern (1997):** An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease, *Nature* **389**(6652): 689-95.
- Zhou, P., A. A. Lugovskoy und G. Wagner (2001):** A solubility-enhancement tag (SET) for NMR studies of poorly behaving proteins, *J Biomol NMR* **20**(1): 11-4.
- Zubay, G. (1973):** In vitro synthesis of protein in microbial systems, *Annu Rev Genet* **7**: 267-87.