

Stereoselektive enzymatische Brønsted-Säure-Katalyse unter Verwendung einer Squalen-Hopen Cyclase

Von der Fakultät 3 (Chemie) der Universität Stuttgart zur Erlangung
der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Silke A. Bastian
aus Ludwigsburg

Hauptberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter: Prof. Dr. René Peters
Vorsitzender: Prof. Dr. Albert Jeltsch
Tag der Verteidigung: 20.12.2016

**Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart
2016**

ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGKEIT DER DISSERTATION

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „*Stereoselektive enzymatische Brønsted-Säure-Katalyse unter Verwendung einer Squalen-Hopen Cyclase*“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

DECLARATION OF AUTHORSHIP

I hereby certify that the dissertation entitled „*Stereoselective enzymatic Brønsted acid-catalysis by use of a squalene-hopene cyclase*“ is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Stuttgart, 10.10.2016

Silke A. Bastian

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Bernhard Hauer für die großartige Unterstützung und Betreuung während meiner gesamten Doktorandenzeit herzlich danken. Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. René Peters und Prof. Dr. Albert Jeltsch für die freundliche Übernahme der Ämter des Mitberichters und des Mitprüfers.

Ganz besonders danke ich Dr. Bettina Nestl für die herausragende, motivierende Betreuung und vertrauensvolle Unterstützung während meiner Arbeit, für zahlreiche wertvolle Anregungen, Diskussionen und Ratschläge.

Großer Dank gilt außerdem Dr. Bernd Nebel für seinen niemals ruhenden Einsatz bei der Wartung und Instandhaltung nahezu aller Analytikgeräte des Instituts (–insbesondere der „Masse“–), für ein stets offenes Ohr und außerordentliche Hilfsbereitschaft bei jeglichen analytischen oder technischen Problemen.

Bei Dr. Sandra Facey möchte ich mich herzlich v.a. für alle Hilfestellungen bei molekularbiologischen Arbeiten und die tolle Arbeitsatmosphäre im „Sandy Land“ bedanken. Sven Richter gilt mein besonderer Dank für viele hilfreiche Ratschläge sowie die sehr angenehme Zusammenarbeit - nicht nur während unzähliger Stunden der Proteinreinigung.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Technische Biochemie für die ausgesprochen nette Aufnahme in den Arbeitskreis, die tolle Zusammenarbeit und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre; speziell danken möchte ich dabei Dr. Christine Gally, Jennifer Bischoff, Julia Halder, Maïke Lenz, Dr. Konrad Otte, Dr. Philipp Scheller, Dr. Lisa Kühnel, Dr. Martin Weissenborn, Dr. Stephan Hammer, Sara Hoffmann, Jan Klenk, Max Fischer, Dr. Silvia Fademrecht, Philipp Trauzettel, Leonie Weinmann, Dr. Janosch Klebensberger, Dr. Juliane Stahmer und Dr. Per-Olof Syrén. Vielen Dank für alle spaßigen, gemeinsamen Abende und Unternehmungen auch außerhalb des Labors.

Die Forschung der vorliegenden Dissertation war Teil des EU-Projekts *KyroBio – Biocatalysis for Chiral Compounds*, eine Kooperation von 17 Instituten und Firmen aus mehreren europäischen Ländern. Für die finanzielle Förderung dieser Arbeit danke ich daher der Europäischen Union (*KyroBio*, Nr. 289646) sowie der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) für die großzügige finanzielle Unterstützung bei diversen Tagungsreisen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und allen meinen Freunden für deren Liebe, Freundschaft und ständige Unterstützung von ganzem Herzen bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung	5
Inhaltsverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	10
Abstract	13
Zusammenfassung	15
I Einleitung	17
1.1 Chirale Brønsted-Säure-Katalyse - Stand der Forschung	17
1.2 Identifizierung und Entwicklung neuer Biokatalysatoren (<i>Protein-Engineering</i>)	21
1.3 Squalen-Hopen Cyclasen	23
1.3.1 Die Squalen-Hopen Cyclase aus <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> (<i>AacSHC</i>)	24
1.3.2 Die Squalen-Hopen Cyclase aus <i>Zymomonas mobilis</i> (<i>ZmoSHC1</i>)	28
1.4 Zielsetzung	30
1.4.1 Kristallstrukturaufklärung der <i>ZmoSHC1</i>	30
1.4.2 SHC-Varianten für neue Brønsted-Säure-katalysierte Reaktionen	30
II Material und Methoden	33
2.1 Chemikalien	33
2.2 Plasmide und Oligonukleotide	33
2.2.1 Oligonukleotide	33
2.3 Plasmide	35
2.4 Enzyme für molekularbiologische Arbeiten	40
2.5 <i>E. coli</i> -Stämme	40
2.6 Herstellung von Lösungen und Sterilisierung	41
2.7 Molekularbiologische Methoden	41
2.7.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA	41
2.7.2 Ortsgerichtete Mutagenese (QuikChange-Reaktion)	42
2.7.3 DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> (Miniprep)	43
2.7.4 DNA-Konzentrationsbestimmung	44
2.7.5 DNA-Sequenzierung	44
2.7.6 Agarosegelelektrophorese	44
2.7.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Gel-Extraktion)	45
2.7.8 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten	45
2.7.9 Ligation	45
2.7.10 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Rubidiumchlorid-Methode)	45
2.7.11 Transformation von <i>E. coli</i>	46
2.8 Proteinbiochemische Methoden	47
2.8.1 Medien für die Zellkultivierung	47
2.8.2 Zellwachstum und Dauerkulturen	47
2.8.3 Proteinexpression in <i>E. coli</i>	47
2.8.4 Mechanischer Aufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen	48
2.8.5 Solubilisierung und Reinigung der Membranproteine	49
2.8.6 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	53
2.8.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
2.8.8 Sensitive kolloidale Coomassie-Färbung	55
2.8.9 Western Blot und Immundetektion	56

2.9 Gaschromatographie	58
2.10 Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie	58
2.11 Flüssigchromatographie (HPLC).....	59
2.12 Analytische Biotransformation.....	59
2.13 Präparative Biotransformationen.....	60
2.13.1 Enzymatische Synthese von (-)-Isopulegol (-)- 5	60
2.14 Chemische Synthesen.....	60
2.14.1 Darstellung von 1-(4,5-Dihydrofuran-2-yl)-cyclobutan-1-ol (7)	60
2.14.2 Darstellung von 1-(3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -pyran-6-yl)cyclobutan-1-ol (9)	61
2.14.3 Darstellung von 1-(4,5-Dihydrofuran-2-yl)cyclopentan-1-ol (11)	61
2.14.4 Darstellung von 1-(3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -pyran-6-yl)cyclopentan-1-ol (13)	62
2.14.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Darstellung von Spiro-Verbindungen (AAV1)	63
III Ergebnisse	65
3.1 Herstellung und Reinigung von <i>ZmoSHC1</i> -Varianten für die Kristallstrukturaufklärung	65
3.1.1 Zur Notwendigkeit der Kristallstrukturaufklärung von <i>ZmoSHC1</i>	65
3.1.2 Das Design der <i>ZmoSHC1</i> -Deletionsmutanten für die Kristallisierung.....	66
3.1.3 Klonierung der <i>ZmoSHC1</i> -Varianten.....	68
3.1.4 Studien zur Expression der <i>ZmoSHC1</i> -Varianten in <i>E. coli</i>	69
3.1.5 Reinigung und Charakterisierung der <i>ZmoSHC1</i> -Varianten	71
3.2 <i>AacSHC</i> -Varianten für die enzymatische Brønsted-Säure-Katalyse neuer, nicht-natürlicher Reaktionen	77
3.2.1 Design und Charakterisierung neuer <i>AacSHC</i> -Mutanten für die Umsetzung nicht-natürlicher Substrate.....	77
3.2.2 Die enzymatische Cyclisierung von Citronellal (4) zu Isopulegol (5)	81
3.2.3 Die enzymatische Isomerisierung von (+)- β -Pinen (+)- β - 6	91
3.2.4 Die enzymatische Spirocyclisierung allylischer Alkohole	96
IV Diskussion.....	99
4.1 Herstellung und Reinigung von <i>ZmoSHC1</i> -Varianten für die Kristallstrukturaufklärung	99
4.1.1 Zur Notwendigkeit der Kristallstrukturaufklärung von <i>ZmoSHC1</i>	99
4.1.2 <i>ZmoSHC1</i> -Varianten für die Kristallisierung.....	100
4.1.3 Studien zur Herstellung der <i>ZmoSHC1</i> -Varianten in <i>E. coli</i>	101
4.1.4 Reinigung und Charakterisierung der <i>ZmoSHC1</i> -Varianten	102
4.2 <i>AacSHC</i> -Varianten für die enzymatische Brønsted-Säure-Katalyse neuer, nicht-natürlicher Reaktionen	105
4.2.1 Design und Charakterisierung neuer <i>AacSHC</i> -Mutanten für die Umsetzung nicht-natürlicher Substrate.....	105
4.2.2 Die enzymatische Cyclisierung von Citronellal (4) zu Isopulegol (5)	106
4.2.3 Die enzymatische Isomerisierung von (+)- β -Pinen (+)- β - 6	113
4.2.4 Die enzymatische Spirocyclisierung allylischer Alkohole	119
V Fazit und Ausblick.....	123
A Anhang	125
A.1 Sequenzen der verwendeten SHCs	125
A.1.1 Gensequenz der Squalen-Hopen Cyclase aus <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> (<i>AacSHC</i>)....	125
A.1.2 Aminosäuresequenz der <i>AacSHC</i>	126
A.1.3 Gensequenz der Squalen-Hopen Cyclase aus <i>Zymomonas mobilis</i> (<i>ZmoSHC1</i>).....	126
A.1.4 Aminosäuresequenz der <i>ZmoSHC1</i>	127

A.2 Klonierung und Expressionsstudien der <i>ZmoSHC1</i> -Varianten	127
A.3 Reinigung und Charakterisierung der <i>ZmoSHC1</i> -Varianten.....	130
A.3.1 Anreicherung und Reinigung über Metallaffinitätschromatographie	130
A.3.2 Verfeinerung der Proteinreinigung über Größenausschluss-Chromatographie (SEC)	133
A.4 Reinigung und Charakterisierung der <i>AacSHC</i> -Varianten.....	136
A.4.1 Herstellung und Reinigung neuer <i>AacSHC</i> -Varianten.....	136
A.5 <i>AacSHC</i> -Varianten für die Brønsted-Säure-Katalyse nicht-natürlicher Reaktionen.....	140
A.5.1 Die enzymatische Spirocyclisierung	140
Literaturverzeichnis.....	141

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius (phys. Einheit der Temperatur <i>T</i>)
μ-	mikro (10^{-6})
δ	chemische Verschiebung [ppm]
A	Adenin (Nukleinbase)
<i>AacSHC</i>	Squalen-Hopen Cyclase aus <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumine)
C	Cytosin (Nukleinbase)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat
CMC	kritische Mizellkonzentration (engl.: critical micelle concentration)
C-terminal	am Carboxy-Terminus eines Proteins
CV	Säulenvolumen (engl.: column volume)
Da	Dalton (atomare Masseneinheit <i>u</i>)
DDAO	N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
DNAseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N = A, T, G, C)
<i>DpnI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Diplococcus pneumonia</i>
DTT	Dithiothreitol, Butan-2,3-diol-1,4-dithiol
ECL	verstärkte Chemolumineszenz (engl.: enhanced chemiluminescence)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
FPLC	Flüssigchromatographie zur Proteinaufreinigung (engl.: fast protein liquid chromatography)
fw	vorwärts (engl.: forward)
g	Gramm (phys. Einheit der Masse <i>m</i>)
G	Guanin (Nukleinbase)
h	Stunde (engl.: hour)
<i>HindIII</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Haemophilus influenzae</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatography)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.: horseradish peroxidase)
IEX	Ionenaustauschchromatographie (engl.: ion exchange chromatography)
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (engl.: immobilized metal ion affinity chromatography)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k-	kilo (10^3)

kb	Kilobasen(paar)
l	Liter (phys. Einheit des Volumens V)
LB	lysogeny broth
m	Meter (phys. Einheit der Länge l)
m-	milli (10^{-3})
M	Molar ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
mAU	Milliabsorptionseinheiten (engl.: milli absorption units)
min	Minute (phys. Einheit der Zeit t)
MW	Molekulargewicht (engl.: molecular weight)
n-	nano ($\cdot 10^{-9}$)
<i>NdeI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Neisseria denitrificans</i>
N-terminal	am Amino-Terminus eines Proteins
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PDB	Proteindatenbank (Protein Data Bank)
p-	pico (10^{-12})
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
QW-Motiv	Glutaminsäure- und Tryptophan-reiche Aminosäuresequenzen der Abfolge QxxDGGWG oder QxxDGSWG
rcf	relative Zentrifugalkraft (engl.: relative centrifugal force)
rev	rückwärts (engl.: reverse)
UpM	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde (phys. Einheit der Zeit t)
SEC	Größenausschluss-Chromatographie (engl.: size exclusion chromatography)
SHC	Squalen-Hopen Cyclase
T	Thymin (Nukleinbase)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB-Medium	Terrific broth, Komplexmedium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
U	Einheit der Enzymaktivität (engl.: unit) [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
UV	ultraviolett
V	Volt (phys. Einheit der elektrischen Spannung U)
WT	Wildtyp
<i>XhoI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Xanthomonas holcicola</i>
<i>ZmoSHC1</i>	Squalen-Hopen Cyclase aus <i>Zymomonas mobilis</i>

ABSTRACT

Enzymes embody exceptionally useful biocatalysts that can be applied efficiently in aqueous solution at moderate pH and mild temperatures. Especially the synthesis of complex molecules can often be reached through enzymatic approaches with exceptionally high selectivity and even specificity.

Squalene-hopene cyclases (SHCs) are a remarkable example of precise, enzymatic Brønsted acid catalysis: Naturally, these enzymes perform the polycyclization of squalene into the pentacyclic products hopene and hopanol. To initiate this reaction, the enzyme possesses a highly conserved aspartic acid that provides a strongly acidic proton. This way, the enzyme activates the terminal C-C double bond of the terpene substrate *via* protonation, generating an initial carbocation that starts the polycyclization cascade in which subsequently a complex carbon ring system with several new stereo centers is built in an one-step reaction. One key feature besides the strong catalytic amino acid machinery is the enzyme's hydrophobic pocket. This cavity functions as template to prefold the substrate into a reactive conformation and simultaneously stabilizes carbocationic intermediates that emerge during the reaction. The interplay of these two characteristics makes SHCs promising biocatalysts for enzymatic Brønsted acid-induced reactions.

The objective of this PhD thesis was the development of squalene-hopene cyclases for the conversion of non-natural compounds and was therefore devoted to two SHCs that displayed different substrate spectra: the SHC1 of *Zymomonas mobilis* (*ZmoSHC1*) as well as the SHC of *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*AacSHC*).

One part of this work was thereby dedicated to the establishment of a protocol for the production and purification of *ZmoSHC1* to determine the protein's crystal structure. By setting up an efficient purification strategy consisting of immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) and size exclusion chromatography (SEC), different (dimeric) *ZmoSHC1* variants could be isolated in very good purity (> 95 %). In cooperation with the RUG Groningen (Netherlands), first protein crystals of this cyclase could be yielded and a preliminary crystal structure with yet low resolution was obtained. Further optimization is now ongoing to improve the symmetry of the protein crystals and the resolution of the crystal structure, respectively.

To further generate improved SHC variants for novel enzymatic Brønsted acid catalysis, the catalytic power of *AacSHC* was exploited. As *AacSHC*'s native active center is rather spacious, small (monoterpene) compounds are mainly unreactively unfolded and therefore cannot be bound in the productive manner that is necessary for catalysis. To enable such arrangements, a rationally designed *AacSHC* mutant library was generated by means of protein engineering, giving a diverse collection of active sites with different sizes and shapes. This set of reshaped hydrophobic enzyme pockets offered a portfolio of suitable chiral surroundings for smaller terpene substrates to support folding and stabilization of such compounds in reactive conformations. By screening of the mutant library towards the Prins reaction of citronellal, several enzyme variants could be identified that promoted certain substrate conformations due to their modified active site shapes and thus revealed altered substrate as well as product selectivities. The reshaping strategy further allowed to substantially improve *AacSHC*'s diastereoselectivity towards certain isopulegol products. This way, numerous substrate specific *AacSHC* variants were generated of which several also diastereoselectively synthesized only certain product isomers, such as (-)-*neo*-isopulegol (*AacSHC*/W312G), (+)-isopulegol (*AacSHC*/Y609A), (-)-*iso*-isopulegol (*AacSHC*/W169A) and (+)-*neo*-isopulegol (*AacSHC*/F365A/Y420W/G600F) with > 99 % *de*. Also for the formation of (-)-isopulegol, a valuable

precursor compound for the large-scale production of (-)-menthol, was it possible to create a highly selective *AacSHC* variant (A419G/Y420C/G600A). This one delivered the target compound with a strong surplus (about 90 %) together with (+)-*neo*-isopulegol as the only diastereomeric byproduct. By optimizing the reaction parameters, yields of the reaction could be additionally enhanced by factors of five (temperature) and ten (detergent concentration), respectively.

Another topic of this work was *AacSHC*'s capability to handle carbocationic intermediates occurring during the isomerization reaction of (+)- β -pinene, which is only very hard to achieve with chemical catalysts, yet. Depending on the stabilization given through the enzymatic environment, these intermediate cations can follow alternative reaction pathways. Also for this case, several interesting cyclase variants were identified that effectively altered the course of the reaction and thereby allowed to significantly vary the product scope. This way, by applying more product selective *AacSHC* variants, it was possible to further specialize the initially broad product spectrum of the wildtype enzyme, thus producing certain industrially important terpene products with a strong surplus, e.g. (-)- α -pinene (86 %, *AacSHC*/Y609W) or (+)-limonene (75 %, *AacSHC*/W312V).

Additionally, a set of allylic alcohols was tested with the *AacSHC* mutant library towards the enzymatic semi-pinacol rearrangement, yielding various spiro compounds of different ring sizes. This way, the portfolio of enzymatic Brønsted acid catalysis by SHCs was extended towards this novel non-natural reaction. This type of reaction was used to obtain different spiro ketals but can in general give access to the synthesis of various further bioactive compounds, as it allows for the quick setup of complex carbon scaffolds as well as for quaternary carbon centers. While sterically less demanding bicyclic substrates could be converted well bis excellently (10 % to total conversion), biotransformations with bigger analogues were far more impeded. Interestingly, the successful conversion of some of the substrates was thereby rather depending on the choice of a suitable *AacSHC* variant than on the chemical reactivity.

ZUSAMMENFASSUNG

Enzyme stellen ausgesprochen nützliche Biokatalysatoren dar, die effizient in wässriger Lösung, bei moderatem pH-Wert und milden Temperaturen eingesetzt werden können. Vor allem erreichen enzymatische Ansätze die Synthese von komplexen Molekülen oft mit ausgesprochen hoher Selektivität oder sogar Spezifität.

Squalen-Hopen Cyclasen (SHCs) sind ein exzellentes Beispiel solch präziser, hochselektiver enzymatischer Brønsted-Säure-Katalyse: SHCs führen in der Natur die Brønsted-Säure-getriebene Polycyclisierung von Squalen in die Pentacyclen Hopen und Hopanol durch. Um diese Reaktion einzuleiten, besitzt das Enzym eine konservierte Asparaginsäure, die ein stark acides Proton zur Substrataktivierung bereitstellt. Dieses ist in der Lage, die terminale C-C-Doppelbindung des Substrates durch Protonierung zu aktivieren, wodurch ein initiales Carbokation generiert wird, welches die nachfolgende Polycyclisierungskaskade einleitet, wodurch in einem Schritt ein komplexes Ringsystem mit mehreren neuen Stereozentren aufgebaut wird. Neben der starken katalytischen Aminosäure-Maschinerie ist die hydrophobe Tasche eine wichtige Eigenheit der SHC, da sie als ideales Templat dazu dient, das Substrat in einer reaktiven Konformation zu falten und gleichzeitig während der Reaktion entstehende, kationische Intermediate zu stabilisieren. Das Zusammenspiel dieser beiden Charakteristika macht SHCs zu vielversprechenden Biokatalysatoren für Brønsted-Säure-induzierte Reaktionen.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Weiterentwicklung von Squalen-Hopen Cyclasen zu solchen enzymatischen Brønsted-Säure-Katalysatoren für die Umsetzung nicht-natürlicher Verbindungen. Diese Dissertation fokussierte sich daher auf zwei unterschiedliche SHCs, welche voneinander deutlich verschiedene Substratspektren aufweisen - der SHC1 aus *Zymomonas mobilis* (*ZmoSHC1*) sowie der SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*AacSHC*).

Ein Teil dieser Arbeit widmete sich der Erstellung eines Protokolls zur Herstellung und Reinigung der *ZmoSHC1* zur Aufklärung der Kristallstruktur des Proteins. Durch eine effektive Reinigungsstrategie aus Immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) und Größenausschluss-Chromatographie (SEC) konnten verschiedene (dimere) *ZmoSHC1*-Varianten mit sehr guten Reinheiten (> 95 %) isoliert werden. Diese gereinigten Proteinlösungen neigten jedoch leicht zur Aggregation, wodurch der Kristallisierungsprozess erheblich erschwert war. Nichtsdestotrotz führte die Kooperation mit dem Projektpartner an der RUG Groningen (Niederlande) bis zur Fertigstellung dieser Arbeit bereits zu ersten *ZmoSHC1*-Kristallen und einer vorläufigen, noch vglw. wenig aufgelösten Kristallstruktur. Weitere Optimierungen werden nun dahingehend durchgeführt, die Symmetrie der Proteinkristalle bzw. die Auflösung der Kristallstruktur zu verbessern.

Zur Generierung verbesserter SHC-Varianten für die enzymatische Brønsted-Säure-Katalyse wurde *AacSHC* verwendet. Da die native Kavität der *AacSHC* im Vergleich zu kleinen (Monoterpenoid)substraten zu geräumig ist, liegen diese großteils unreaktiv vor und können nicht in der für die Katalyse nötigen produktiven Weise gebunden werden. Um eine solche Anordnung nun zu ermöglichen, wurde mittels Protein-Engineering eine rational erstellte *AacSHC*-Mutantenbibliothek entwickelt. Diese vielseitige Auswahl an umgeformten Enzymtaschen stellte kleinen Substraten geeignete chirale Umgebungen zur Verfügung, die Faltung und Stabilisierung solcher Verbindungen in reaktiven Konformationen unterstützten. Durch das Screening der Bibliothek gegenüber der Prins-Reaktion von *rac*-Citronellal konnten Enzymvarianten gefunden werden, die durch Modifizierungen innerhalb der aktiven Tasche bestimmte Substratkonformationen bevorzugten und dadurch sowohl

unterschiedliche Substrat- als auch Produktselektivitäten aufwiesen. Darauf aufbauend erlaubte diese Strategie es, die Diastereoselektivität der *AacSHC* bzgl. bestimmter Produkte erheblich zu verbessern. So konnten zahlreiche substratspezifische *AacSHC*-Varianten generiert werden, welche die diastereoselektive Synthese der Produktisomere (-)-*neo*-Isopulegol (*AacSHC*/W312G), (+)-Isopulegol (*AacSHC*/Y609A), (-)-*iso*-Isopulegol (*AacSHC*/W169A) und (+)-*neo*-Isopulegol (*AacSHC*/F365A/Y420W/G600F) mit > 99 % *de* ermöglichten. Ebenfalls konnte für die Bildung von (-)-Isopulegol, einer wichtigen Vorläuferverbindung zur großtechnischen Herstellung von (-)-Menthol, eine hochselektive *AacSHC*-Variante (A419G/Y420C/G600A) geschaffen werden. Diese lieferte der Zielverbindung in deutlichem Überschuss (ca. 90 %) zusammen mit (+)-*neo*-Isopulegol als einzigem diastereomeren Nebenprodukt. Durch Optimierung der Reaktionsparameter ließen sich die Ausbeuten der Reaktion zusätzlich um den Faktor fünf (Temperatur) bzw. zehn (Detergenskonzentration) steigern.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Handhabung von carbokationischen Intermediaten während der Isomerisierung von (+)- β -Pinen, welche mit chemischen Katalysatoren nur sehr schwer zu erreichen ist. Abhängig von der Stabilität bzw. Stabilisierung intermediärer Kationen durch das enzymatische Milieu können diese alternativen Reaktionspfaden folgen. Auch hier konnten einige interessante Varianten identifiziert werden, die in der Lage waren, den Verlauf der Reaktion im Vergleich zum Wildtyp-Enzym signifikant zu verändern und dadurch deutliche Variationen des Produktspektrums ermöglichten. Auf diese Weise war es durch den Einsatz von produktselektiveren *AacSHC*-Varianten möglich, die anfänglich breite Produktverteilung des Wildtyp-Enzyms stärker zu spezialisieren und industriell bedeutende Terpenprodukte wie (-)- α -Pinen (86 %, *AacSHC*/Y609W) oder (+)-Limonen (75 %, *AacSHC*/W312V) deutlich bevorzugt herzustellen.

Zusätzlich wurde ein Set an allylischen Alkoholen für die Bildung von Spiro-Verbindungen eingesetzt, wobei die Präferenz der Cyclase bzgl. bestimmter Ringgrößen untersucht wurde. So konnte die Bandbreite der von *AacSHC* durchgeführten Umsetzungen um eine neue, nicht-natürliche Reaktion, die enzymatische Semi-Pinacol-Umlagerung, ergänzt und Zugang zu verschiedenen Spiroketalen geschaffen werden. Dieser Reaktionstyp ist für die Synthese zahlreicher weiterer, bioaktiver Verbindungen entscheidend, da er den schnellen Aufbau komplexer Kohlenstoffgerüste sowie quarternärer Kohlenstoffzentren erlaubt. Während die sterisch weniger anspruchsvollen bicyclischen Substrate dabei gut bis exzellent umgesetzt werden konnten (10 % bis vollständiger Umsatz), waren Biotransformationen größerer Analoga deutlich gehemmter. Interessanterweise war dabei die erfolgreiche Umsetzung einiger Substrate eher von der Wahl einer geeigneten *AacSHC*-Mutante für das jeweilige Substrat und weniger von dessen chemischer Reaktivität abhängig.

I EINLEITUNG

1.1 Chirale Brønsted-Säure-Katalyse - Stand der Forschung

Der Begriff der Brønsted-Säure beschreibt eine Spezies, welche im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt einer chemischen Reaktion als Protonendonator fungiert und dadurch ein bestimmtes Substrat aktiviert. Entscheidender Faktor dabei ist die Acidität der Säure bzw. Basizität des Substrates. Prinzipiell kann die Übertragung eines Protons auf eine große Bandbreite unterschiedlicher funktioneller Gruppen angewendet werden, weshalb Wasserstoffbrückenbindungen in vielen Reaktionen eine wichtige Funktion einnehmen, wobei sie sowohl zur Orientierung von Substraten als auch zu deren Aktivierung dienen. Brønsted-Säuren werden daher auch in der Naturstoffsynthese für vielfältige C-C- und C-X-Bindungsbildungen eingesetzt. Im Gegensatz zur häufig komplexe Liganden tragenden Lewis-Säure wird in der klassischen Brønsted-Säure-Katalyse dabei oftmals keine Stereoinformation vermittelt. Lange Zeit blieb letztere deshalb vergleichsweise wenig entwickelt, wohingegen das Feld der Lewis-Säure-Katalyse stärker vorangetrieben wurde. Mit dem Aufkommen der Organokatalyse entwickelte sich die asymmetrische Brønsted-Säure-Katalyse zu einem wirkungsvollen Teilbereich, der es erlaubte, die intrinsische Reaktionsdiversität der Brønsted-Säuren auf eine Vielzahl verschiedener diastereo- und enantioselektiver Transformationen zu übertragen. Die Entwicklung immer neuerer chiraler Säuren vergrößerte dabei den Anwendungsbereich asymmetrischer Brønsted-Säure-katalysierter Reaktionen dramatisch.^[1] Wasserstoffbrückenbildende Katalysatoren können dabei entweder als allgemeine oder spezifische Brønsted-Säuren eingestuft werden. Allgemeine Brønsted-Säuren protonieren das Substrat nicht direkt, sondern nur *partiell*, wobei die Wasserstoffbrückenbildung *während* des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes stattfindet. Spezifische Brønsted-Säuren hingegen sind stärkere Säuren, welche das Substrat durch *vollständigen* Protonentransfer *vor* dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt aktivieren und so den Reaktionsfortgang einleiten. Prominente Spezies sind dabei v.a. Derivate des BINOLs,^{[2],[3]} TADDOLs^{[4]-[6]} oder (Thio)Harnstoff-Derivate^{[7],[8]} (s. Abb. 1.1). TADDOL- sowie und (Thio)harnstoff-Derivate stellen dabei meist schwächere, allgemeine Brønsted-Säuren dar, welche als Wasserstoffbrücken-Donoren fungieren, während Derivate des BINOLs als spezifischere Brønsted-Säuren fungieren und Substrate über direkte Protonierung aktivieren.

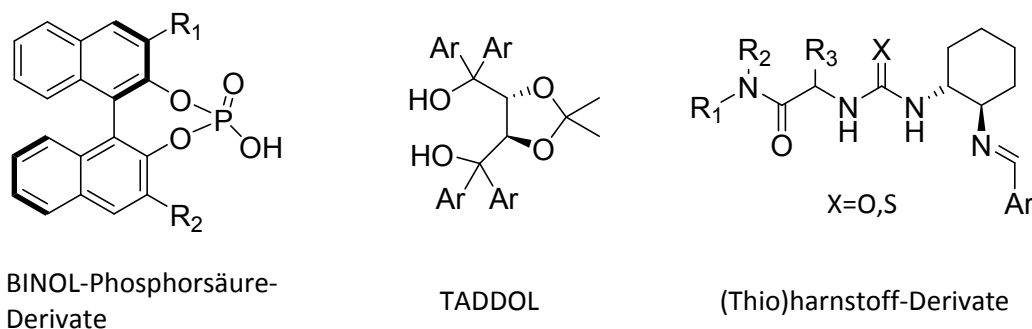
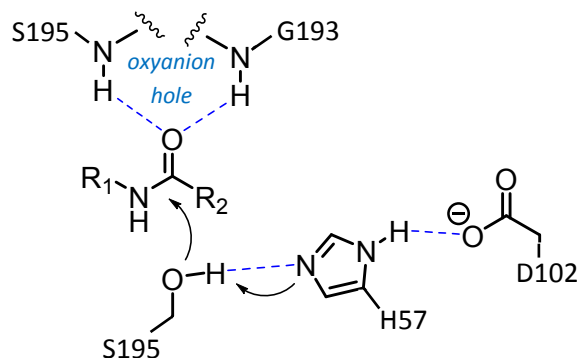


Abbildung 1.0.1: Beispiele chiraler Brønsted-Säuren, die in der asymmetrischen Katalyse breite Anwendung finden. Links: Von BINOL abgeleitete Phosphorsäuren.^{[2],[9]} Mitte: TADDOL-Derivate.^[5] Rechts: (Thio)harnstoff-Derivate.^[7]

So sind mittlerweile beispielsweise asymmetrische Mannich-Reaktionen,^{[9],[10]} Friedel-Crafts-Alkylierungen,^{[2],[11]} Strecker-Reaktionen^{[8],[12]} sowie zahlreiche Cycloadditionen^{[4],[13]-[15]} beschrieben, welche von einer mindestens ebenso großen Bandbreite unterschiedlich modifizierter Brønsted-Säure-Katalysatoren Gebrauch machen.

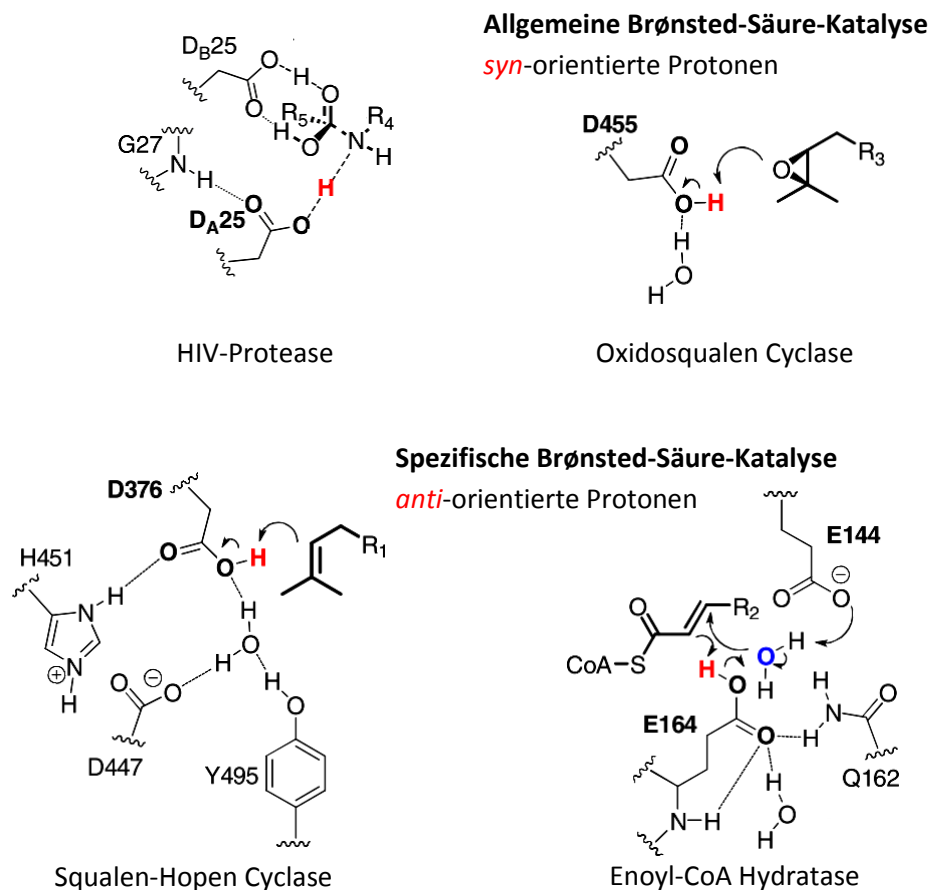
Enzyme stellen mit ihren aktiven Zentren von Natur aus solche komplexen chiralen Mikro-Umgebungen zur Verfügung, die über Wasserstoffbrücken selektiv Substrate aktivieren, stabilisieren und kontrolliert über bestimmte reaktive Konformationen zum jeweiligen Produkt führen. Solche Umfelder wurden evolutionär effektiv dafür entwickelt, oft selbst solche Substrate zu diskriminieren, die keine funktionellen Gruppen tragen, mit welchen sie in Interaktion mit dem Katalysator treten könnten. Da in der enzymvermittelten Brønsted-Säure-Katalyse Aminosäuren unter physiologischen Bedingungen die Rolle der Brønsted-Säure übernehmen, sind reaktive Gruppen (Aminosäuren) dabei v.a. Imidazole (Histidin), Carboxygruppen (Glutaminsäure, Asparaginsäure), Thiole (Cystein), Guanidin- (Arginin) oder aromatische Hydroxygruppen (Tyrosin), wobei deren Protonierungsgrad vom pH-Bereich abhängig ist. Ein Beispiel für eine vergleichsweise schwache, (allgemeine) enzymatische Brønsted-Säure ist das sog. *oxyanion hole*, welches bspw. eine Carbonylfunktion eines Substrates durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken am Katalysator koordiniert und aktiviert. Im Zuge des nachfolgenden nukleophilen Angriffes führt die negative Ladung am Carbonyl-Sauerstoff zu einer stärkeren Wasserstoffbrückenbindung zwischen Substrat und *oxyanion hole*. Durch diese Stabilisierung wird die freie Energie des Übergangszustandes abgesenkt und die Reaktion beschleunigt. Dieser Reaktionsmechanismus ist wesentlicher Bestandteil zahlreicher Biokatalysatoren wie bspw. Keto-/Aldoreduktasen,^[16] Lipasen,^{[17]-[19]} oder Serin-Proteasen, wobei für letztere Chymotrypsin-artige Proteasen in der Natur am häufigsten sind.^[20] In vielen Serin-Proteasen nimmt die katalytische Triade aus einem Serin, einer Asparaginsäure und einem Histidin eine Schlüsselfunktion ein; im Chymotrypsin sind dies D102, S195 und H57 (s. Schema 1.1).



Schema 1.0.1: Enzymatisches Beispiel allgemeiner Brønsted-Säure-Katalyse: das *oxyanion hole*. Ausschnitt aus dem Reaktionsmechanismus der Serin-Protease Chymotrypsin. Der Amid-Sauerstoff des Substrates koordiniert über zwei Wasserstoffbrückenbindungen an Aminosäuren S195 und G193 des Proteinerückgrats. So wird das Substrat für den nukleophilen Angriff durch S195 positioniert und der reaktive Übergangszustand stabilisiert.

Protonen der Aminosäuren S195 und G193 aus dem Proteingerüst positionieren den Amid-Sauerstoff des Substrates über Wasserstoffbrückenbindungen (*oxyanion hole*). Der nukleophile Angriff des S195 an den Amid-Kohlenstoff wird durch Abstraktion des Protons durch H57 erleichtert, dessen Acidität wiederum durch Wasserstoffbrückenbindung zur benachbarten D102 erhöht wird. Das *oxyanion hole* stabilisiert während des Vorgangs die negative Ladung des reaktiven Intermediates. Auf diese Weise beschleunigen Serin-Proteasen die Peptidbindungshydrolyse um $\sim 10^{10}$ im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion. Allgemeine Brønsted-Säuren sind allerdings nicht immer für die Aktivierung eines Substrates ausreichend: Zur Protonierung vglw. schwach basischer Gruppen ist oftmals die höhere Acidität stärkerer, spezifischer Brønsted-Säuren nötig. Durch Enzyme kann dies im Vergleich zu chemischen Katalysatoren deutlich seltener erreicht werden, da normale enzymatische Säuren

häufig nicht stark genug sind, um weniger basische Substratmoleküle zu protonieren. Der pKa einer enzymatischen Brønsted-Säure kann jedoch maßgeblich von der strukturellen Umgebung des Enzyms bzw. durch die Ausbildung von (Wasserstoffbrücken-) Netzwerken mit angrenzenden Aminosäuren beeinflusst werden. Wird das Proton einer Carboxygruppe in *anti*-Orientierung ausgerichtet, kann die Acidität der Brønsted-Säure im Vergleich zur „normalen“ *syn*-Orientierung um mehrere Größenordnungen erhöht werden.^{[21],[22]} Aufgrund ihrer breiten Anwendbarkeit stellt die spezifische Brønsted-Säure-Katalyse von Enzymen eine wertvolle Bereicherung des Portfolios biokatalytischer Reaktionen dar, ist bisher jedoch nur relativ wenig beschrieben. Zwei der seltenen Beispiele sind die Enoyl-CoA Hydratase (EC 4.2.1.17) oder die Squalen-Hopen Cyclase (EC 5.4.99.17), deren katalytische Aminosäurenetzwerke in Schema 1.2 (unten) gezeigt und exemplarisch den weniger aciden, *syn*-orientierten Protonen (Schema 1.2 oben) der HIV-Protease (EC 3.4.23.16) sowie der Oxidosqualen Cyclase (EC 5.4.99.7) vergleichend gegenübergestellt sind: Während *anti*-orientierte Protonen zur Aktivierung von Kohlenstoff-Doppelbindungen in der Lage sind, werden *syn*-orientierte Protonen eher für weniger anspruchsvolle Protonierungen aktivierter funktioneller Gruppen eingesetzt.^[23]



Schema 1.2: Ausschnitte aus Reaktionsmechanismen allgemeiner und spezifischer enzymatischer Brønsted-Säure-Katalysatoren. Oben: Anordnungen katalytischer Aminosäurenetzwerke mit *syn*-orientierten Protonen sind am Beispiel der HIV-Protease und der Oxidosqualen Cyclase gezeigt. Unten: zwei Beispiele der außergewöhnlichen, *anti*-orientierten Protonen der Squalen-Hopen Cyclase sowie der Enoyl-CoA Hydratase. Abkürzungen der wesentlichen Aminosäuren sind fettgedruckt. Mechanistisch relevante Protonen sind rot eingefärbt. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien angezeigt. Abbildungen aus [23].

Bei der Herstellung von Natur-, Duft- und Geschmacksstoffen sowie bioaktiver Verbindungen nimmt die Kontrolle über Chemo-, Regio- und Stereoselektivität einen enorm hohen Stellenwert ein. Diesem Anspruch können die aktiven Taschen vieler Biokatalysatoren mit Leichtigkeit nachkommen: Katalytische Zentren in Enzymen sind komplexe, hochoptimierte reaktive Milieus, die als Matrizen für spezifische Reaktionstypen fungieren und Substratkonformationen entlang ganz bestimmter Reaktionspfade führen. Dies bewirkt die enzymcharakteristische Stereokontrolle während der katalytischen Umsetzung. Dass enzymatische Brønsted-Säure-Katalysatoren dabei ohne den Einsatz von Metallen auskommen, macht sie zudem v.a. für die pharmazeutische Industrie zu einer attraktiven Alternative gegenüber dem Einsatz von metallhaltigen Katalysatoren, da für letztere oft schon die Entfernung von Spuren toxischer metallischer Verunreinigungen vom pharmazeutischen Endprodukt problematisch sein kann. Diese Vorteile verdeutlichen, dass Biokatalysatoren nicht nur umweltfreundliche, sondern vor allem auch synthetisch wertvolle Optionen zu chemischen Katalysatoren eröffnen. So werden auch Enzyme seit wenigen Jahren als gleichwertige Alternativen zur konventionellen chemischen Synthese eingesetzt, etablieren sich zunehmend als „grüne“, hochselektive und effiziente Biokatalysatoren, die in wässrigen Lösungen, bei moderaten pH-Werten und Temperaturen arbeiten und auch die entsprechenden verfahrenstechnischen Entwicklungen schreiten immer weiter voran. Doch bringt die Verwendung von Enzymen für industrielle Prozesse auch Limitierungen mit sich. Schwierigkeiten sind dabei hauptsächlich die hohe Substratspezifität und begrenzte (Thermo)Stabilität sowie die niedrige Toleranz vieler nativer Enzyme gegenüber organischen Lösungsmitteln, welche für bestimmte Produktionsschritte oftmals unabdingbar sind. Weiterhin sind Enzyme nur begrenzt wiederverwendbar. Mittlerweile sind derartige Hindernisse jedoch immer besser durch Enzym-Immobilisierung auf Trägermaterialien oder Stabilisierungstechniken der Enzymstruktur auf Aminosäureebene (z.B. durch B-FIT-Analyse) zu überwinden.^[24] So werden Enzyme bereits in einigen großindustriellen Bereichen wie der Textil-, Leder-, Waschmittel-, Zellstoff- und Papier-Herstellung oder der Nahrungsmittelproduktion eingesetzt. Ökologische Bewertungen konnten dabei zeigen, dass durch den dortigen Einsatz von Enzymen im Vergleich zum rein chemischen Pendant in fast allen Fällen eine deutliche Reduzierung der Treibhausgasemissionen erreicht werden konnte. Zudem hat die Anwendung enzymatischer Prozesse erhebliches Potenzial hinsichtlich der Einsparung von Rohstoffen, Frischwasser sowie toxischen Abwässern, wodurch nachteilige Auswirkungen auf die Umwelt sowie der Energieverbrauch verringert werden können. Die Implementierung von Biokatalysatoren stellt damit ein vielversprechendes Mittel für eine saubere, umweltfreundlichere Produktionsweise dar. Einige der vielfältigen Beispiele von bisher erfolgreich in industriellen und/oder pharmazeutischen Prozessen verwendeten Enzyme sind bspw. Amylasen, (Phospho)Lipasen, Esterasen, Proteasen, Ketoreduktasen oder Hydrolasen.^{[25],[26]} Das Potenzial enzymatischer Katalyse für industrielle Anwendungen ist dabei bei weitem noch nicht voll ausgeschöpft. Vor allem nicht-natürliche Reaktionen mit dafür maßgeschneiderten Enzymen eröffnen ein weites Feld neuer katalytischer Möglichkeiten. So besitzen Enzyme zwar oftmals höhere Selektivitäten als ihre chemischen Gegenstücke – jedoch vielfach nur bezüglich eines eher begrenzten Reaktionsspektrums, welches keine breite Anwendbarkeit erlaubt. Vor diesem Hintergrund wurden in den letzten Jahren geeignete Methoden entwickelt, um die katalytischen Eigenschaften von Enzymen von ihrem natürlichen Substratspektrum zu lösen und auf neue, nicht-natürliche Reaktionen und Substrate zu übertragen. Diese Vorgehensweise trägt maßgeblich dazu bei, die (industriellen) Anwendungsmöglichkeiten von Biokatalysatoren zu erweitern bzw. gezielt für die Synthese bestimmter Zielverbindungen anzupassen.

1.2 Identifizierung und Entwicklung neuer Biokatalysatoren (*Protein-Engineering*)

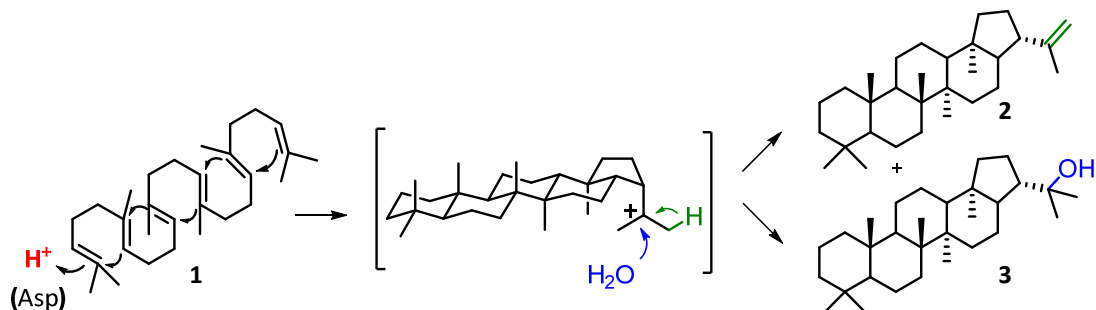
Enzyme arbeiten selektiv, unter milden Reaktionsbedingungen und können zu umweltfreundlicheren, effizienteren Prozessen in industriellen Verfahren beitragen. Allerdings ist dafür oftmals die Verbesserung der Enzymaktivität, -stabilität und/oder -selektivität bzgl. einer bestimmten Reaktion nötig, um einen Biokatalysator zu einem geeigneten, konkurrenzfähigen Ersatz für bestehende chemische Prozesse maßzuschneidern. Für die erfolgreiche Substitution konventioneller Prozesse durch biokatalytische sind daher die Identifizierung und Entwicklung robuster Enzyme mit verbesserten Fähigkeiten hinsichtlich der gewünschten Reaktionen (oftmals nicht-natürlicher Substrate) unabdingbar. Für die Suche nach neuen Enzymen mit optimierten Eigenschaften (Selektivitäten, Spezifitäten, Aktivitäten) haben sich in den letzten Jahren bestimmte Vorgehensweisen als besonders geeignet herauskristallisiert. Zum einen stellt die Durchforstung der bereits in der Natur vorhandenen Enzymvielfalt eine naheliegende Option dar. Metagenomdatenbanken oder das Studium relevanter Biosynthesewege können dabei zielführend sein. Um eine gewünschte Enzymfunktion aufzuspüren, ist in der Regel allerdings das Vorhandensein eines geeigneten Hochdurchsatzverfahrens (*high throughput screening*) zusammen mit großem Screening-Aufwand nötig. Desweiteren sind neue vielversprechende Enzyme z.T. nur schwer über derartige Screenings zu identifizieren oder die zugehörigen Organismen im Labor nur schwer kultivierbar. Kann auf die Nutzbarmachung der vorhandenen natürlichen Diversität nicht zurückgegriffen werden oder ist diese nicht zeit- und kosteneffizient, ist die Generierung von zusätzlicher artifizieller Enzym-Diversität eine elegante Alternative. Protein-Engineering bietet hierbei einige extrem hilfreiche Strategien, um das Portfolio enzymatischer Katalysatoren auszubauen, neue (spezifische) Reaktivitäten zu entwickeln oder bereits vorhandene Eigenschaften zu verbessern: Zum einen bestehen computergestützte Vorgehensweisen wie die Datenbanksuche oder das *de novo* Design. Bei diesem wird anhand eines *in silico* modellierten, reaktiven Übergangszustandes eine neuartige, diesen Übergangszustand durch katalytische Aminosäurereste stabilisierende Struktur entworfen („*theozyme*“) und in ein geeignetes Proteinerückgrat eingepasst. Zum anderen kann ein Enzym durch Mutation verändert werden.^{[27]-[29]} Eine hilfreiche Maßnahme hierfür ist die vorangehende Verbesserung der Stabilität des Enzyms, um dieses robuster gegenüber der nachfolgenden Mutagenese zu machen. Eine Möglichkeit dafür bietet der Konsensus-Ansatz. Dieser beruht auf dem Prinzip, dass die häufigsten Aminosäuren an bestimmten strukturellen Positionen in homologen Enzymen überdurchschnittlich zur Funktionalität des Enzyms beitragen (bzw. dass das Nicht-Vorhandensein bestimmter Aminosäuren an bestimmten Positionen in einer Enzymstruktur sehr wahrscheinlich mit Inaktivität oder Instabilität verknüpft ist). Aminosäuresubstitutionen hin zur Konsensus-Sequenz sollten daher die Stabilität eines Enzyms mit hoher Wahrscheinlichkeit steigern. Aufbauend auf stabilisierten Proteingerüsten lassen sich nachfolgend oft deutlich erfolgreicher funktions- oder aktivitätsverändernde Mutationen in ein Enzym einführen. Ergänzend zu computerbasierten Methoden existiert eine Bandbreite an Techniken für das Design neuer oder die Verbesserung bestehender enzymatischer Eigenschaften.^[30] (Semi-)rationale Mutationsstrategien bspw. nutzen bereits vorhandene katalytische Zentren von Enzymen und passen diese für die Umsetzung nicht-natürlicher Substrate und/ oder die Katalyse neuer Reaktionen an. Offensichtliches und daher häufiges Ziel des Protein-Engineerings ist die aktive Tasche eines Biokatalysators, welche durch eine Zusammenstellung reaktiver Gruppen das geeignete Umfeld für eine bestimmte katalytische Funktion bereitstellt. Vor allem Ladung, Polarität, Hydrophobizität oder die Ausbildung von Wasserstoffbrücken bestimmter Aminosäurereste haben dabei oftmals immensen Einfluss auf das Substratbindungsvermögen eines Enzyms, die Stabilisierung von Übergangszuständen und damit

auf die Produktbildung. Der Austausch von Aminosäureresten innerhalb der aktiven Tasche kann deshalb die Fähigkeiten eines Biokatalysators im Hinblick auf Aktivität oder Spezifität drastisch beeinflussen. Schon einzelne derartige Modifikationen können daher schon ausreichen, um alternative Substratbindungsmodi zu erlauben und das Substratrepertoire eines Enzymes entscheidend zu verändern.^[31] Oftmals ist das Einbringen mehrere Modifikationen in einen Biokatalysator nötig, um diesen besonders gut an ein neues Zielsubstrat oder eine neue Zielreaktion anzupassen. Allerdings ist die Akkumulation mehrerer positiver Mutationen statistisch unwahrscheinlich, durch zufallsgerichtete Mutagenese (gerichtete Evolution) daher vglw. schwierig zu erreichen und mit großem Screening-Aufwand verbunden.^[32] Das Screening großer Mutantenbibliotheken ist allerdings oftmals limitiert. In vielen Fällen kann weder eine Genotyp-Phänotyp-Verbindung für ein Display-Screening noch ein optisch detektierbares Substrat für ein Mechanismus-basiertes Screening (bspw. über Durchflusszytometrie) verwendet werden, sodass eine Hochdurchsatz-Sortierung der generierten Mutanten nicht möglich ist. In solchen Fällen ist eine Taktik zur Reduzierung der Größe einer Mutantenbibliothek essentiell. Eine praktikable Vorgehensweise für solche Enzymdesigns, bei denen keine Möglichkeit zum Hochdurchsatz-Screening zur Verfügung steht, sind semi-rationale Ansätze wie die Iterative Sättigungsmutagenese, CASTing oder das räumliche Umformen der reaktiven Kavität eines Enzyms (*reshaping*), welche die Erstellung kleinerer, speziell ausgerichteter Enzybibliotheken erlauben.^[33] Im Gegensatz zur gerichteten Evolution, für die keine genaue Kenntnis der Proteinstruktur, sondern lediglich ein geeignetes Screening-System nötig ist, zielen neuere Mutationsstrategien für das (Re)design von Biokatalysatoren vermehrt auf semi-rationale, struktur- und funktionsbasierte Veränderungen bestimmter Bereiche eines Proteins ab. Die Schaffung solcher „intelligenter“ Enzybibliotheken (*smart' libraries*) basiert dabei oftmals auf der Additivität und synergistischen Effekten von Mutationen und erfordert häufig die Kenntnis des Enzym-vermittelten Reaktionsmechanismus - zumindest jedoch das Vorhandensein einer Kristallstruktur.

1.3 Squalen-Hopen Cyclasen

Terpencyclasen sind ein exzellentes Beispiel für die evolvierte Raffinesse enzymatischer Katalyse, da sie eine der komplexesten Reaktionen in der Naturstoffsynthese verwirklichen: Das flexible Polyisoprengerüst von Terpenen kann aufgrund mangelnder funktioneller Gruppen nur durch die passgenaue, enganliegende Kontur der aktiven Tasche der Terpencyclase geformt werden. Diese Schablone der reaktiven Kavität „codiert“ so für das jeweilige Cyclisierungsprodukt.^[34] Die Unterteilung der Terpencyclasen findet anhand zweier unterschiedlicher Substrataktivierungsmechanismen in Klasse I und II statt: Klasse I-Terpencyclasen umfassen v.a. Mono-, Sesqui- und Diterpencyclasen, welche nur solche Substratmoleküle umsetzen können, die in einer aktivierten Form, d.h. als diphosphathaltige Verbindungen vorliegen. Im anfänglichen Reaktionsschritt, der Substrataktivierung, wird die Abspaltung der Diphosphatgruppe vom Substrat durch ein Mg^{2+} -haltiges Aminosäure-Netzwerk initiiert, welches als Lewis-Säure fungiert und charakteristisch für diese Enzymklasse ist. Dieser Schritt generiert eine carbokationische Spezies, welche hochreaktiv und essentiell für den Fortlauf des Reaktionsmechanismus ist.

Klasse II Terpencyclasen, zu denen auch Triterpencyclasen wie Squalen-Hopen Cyclasen (SHCs) zählen, sind in ihren Substratanforderungen nicht derart eingeschränkt. Diese membranständigen Proteine besitzen zwei Domänen (β - und γ -Domäne) mit je einer $(\alpha/\alpha)_6$ -Fass-Struktur, wobei sich in der γ -Domäne zusätzlich eine α -Helix befindet. Über diesen strukturellen „Membran-Anker“ ist die SHC mit der Zellmembran assoziiert, durchdringt diese jedoch nicht. Im Zwischenbereich der beiden Domänen befindet sich die große hydrophobe aktive Tasche der Enzyme. Strukturell sind weiterhin v.a. die sogenannten QW-Motive interessant, welche die Enzymstabilität während der exergonischen Cyclisierungsreaktion ($\Delta H_R = 40 - 50$ kJ/mol) gewährleisten. QW-Motive sind konservierte Bereiche mit nicht-repetitiven Sequenzen der Aminosäureabfolge QxxDGGWG oder QxxDGSWG und befinden sich an C-terminalen Enden exponierter α -Helices. Es wird angenommen, dass diese Motive bei der Forcierung von hochenergetischen Substratkonformationen stabilisierend auf die Enzymstruktur wirken. Bakterielle SHCs katalysieren die Polycyclisierung von Squalen (**1**) in die pentacyclischen Produkte Hopen (**2**) und Hopanol (**3**) (Schema 1.3). Die Hopanoidsynthese ist ein wichtiger Prozess für die Sicherstellung der Fluidität und Stabilität der Zellmembran. Besonders während des Zellwachstums unter extremen Umweltbedingungen (wie erhöhter Temperatur) ist die Produktion von Hopanoiden für die Zusammensetzung der Zellmembran für viele Organismen deshalb (über)lebensnotwendig.^[35]



Schema 1.3: Die natürliche Reaktion der SHCs, die Umsetzung von Squalen (**1**) zu Hopen (**2**) und Hopanol (**3**). Die Substrataktivierung erfolgt Brønsted-Säure-vermittelt durch Protonierung einer endständigen C-C-Doppelbindung durch eine katalytische Asparaginsäure (Asp) innerhalb des katalytischen Zentrums der Cyclase. Das dabei generierte initiale Kation wird von einer benachbarten C-C-Doppelbindung angegriffen, woraufhin die Polycyclisierungskaskade einsetzt. Terminiert wird die Reaktion entweder durch Deprotonierung unter Bildung von **2** oder durch nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls unter Bildung von **3**.

Der bemerkenswerte Polycyclisierungsmechanismus der Triterpencyclasen ist eine der komplexesten enzymatischen Reaktionen und besteht aus mehreren Reaktionsschritten, welche konzertierte Ringschlüsse sowie den selektiven Aufbau mehrerer neuer Stereozentren beinhalten. Um die terminale C-C-Doppelbindung des unfunktionalisierten, linearen Polyisoprensubstrates zu protonieren und das initiale Carbokation zu erzeugen, machen SHCs von einer starken Asparaginsäure Gebrauch, welche am Ende der aktiven Tasche positioniert und Teil des hochkonservierten DxDD-Motives ist. Nach der Generierung dieses kationischen Intermediates durchläuft das Substrat eine Polycyclisierungskaskade, wobei das jeweils entstandene Carbokation vom benachbarten π -System einer nahestehenden C-C-Doppelbindung angegriffen und ein neues Kation gebildet wird. Während des Reaktionsverlaufes entstehende, hochreaktive kationische Intermediate werden innerhalb der aktiven Tasche der SHC v.a. durch elektronenreiche aromatische Reste über Kation- π -Wechselwirkungen stabilisiert und so vor dem frühzeitigen Abfangen durch Nucleophile geschützt. Die Form der reaktiven Kavität des Enzyms spielt dabei eine maßgebliche Rolle, da sie die nötige chirale Umgebung darstellt, um das Substrat in eine vordefinierte Anordnung zu bringen. Denn da die Polycyclisierung in einem Schritt verläuft, setzt dies voraus, dass das Substrat im aktiven Zentrum bereits vor Reaktionsbeginn vollständig in einem produktartigen Zustand vorgefaltet ist. Dazu ist das Volumen der hydrophoben aktiven Tasche einer SHC typischerweise nur geringfügig größer als das umzusetzende, natürliche Substrat, wodurch eine enge Passform zwischen Enzym und dem flexiblen Substrat sichergestellt wird. Beendet wird die Reaktionskaskade entweder über das Abfangen der kationischen Spezies durch Nucleophile (wie Wassermoleküle) oder durch Deprotonierung und Ausbildung einer C-C-Doppelbindung (Terminierung).

1.3.1 Die Squalen-Hopen Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AacSHC)

Die Squalen-Hopen Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AacSHC) ist die am besten untersuchte bakterielle SHC und dient häufig als Modellsystem für Studien zu Triterpencyclasen. Grund hierfür ist zum einem die (Thermo)stabilität des, aus einem thermophilen Bakterium stammenden Enzyms. Vor allem aber ist AacSHC eine von nur zwei Klasse II-Terpencyclasen, für die bisher die entsprechende Kristallstruktur aufgeklärt werden konnten: Neben derjenigen der AacSHC (PDB: 1UMP^[36] oder 2SQC^[37]) ist bis heute nur noch die Struktur der humanen Oxidosqualen Cyclase HsaOSC (PDB: 1W6K^[38]) verfügbar. AacSHC besitzt acht QW-Motive, welche zur Stabilisierung der Proteinstruktur bzw. zum Schutz vor thermischer Denaturierung beitragen.^{[39]-[43]} Es wird angenommen, dass AacSHC als dimeres monotopisches Membranprotein auf der inneren Seite der bakteriellen Zellmembran platziert ist.^{[40],[44]} Ein hydrophober Kanal fungiert als Verbindung zwischen der aktiven Tasche des, an der Zellmembran verankerten Enzymes und dem Zellinneren und dient der Aufnahme der Substrate bzw. Freigabe der gebildeten Produkte. Einige dieser Charakteristika der AacSHC sind nachfolgend in Abbildung 1.2 gezeigt.

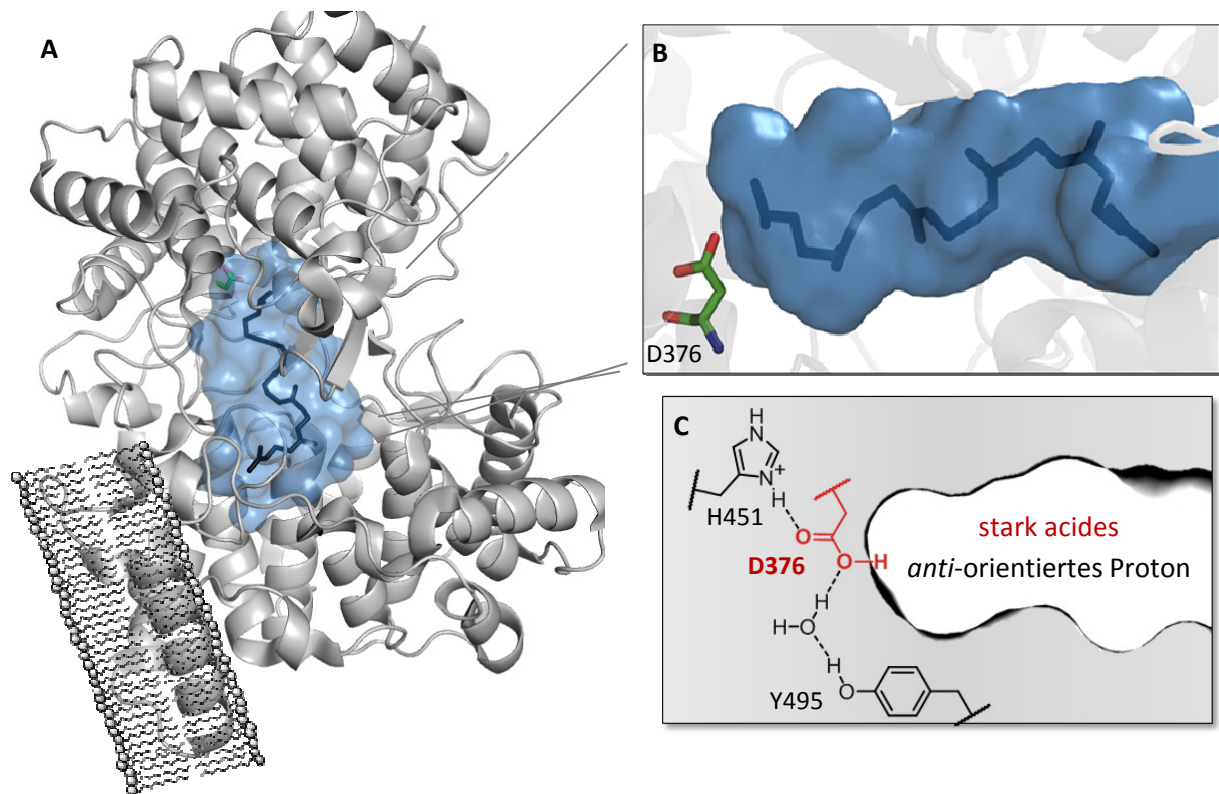


Abbildung 1.2: **A:** Modell der AacSHC-Kristallstruktur (PDB: 1UMP^[36]). AacSHC ist ein dimeres, monotopisches Membranprotein, welches auf der inneren Seite der Zellmembran lokalisiert ist. Jedes Monomer (links abgebildet) besteht aus zwei Domänen, wobei sich die große aktive Tasche (blau) in der Mitte dieser Domänen befindet. **B:** Die aktive Tasche der AacSHC (blau) formt eine passgenaue Umgebung für die stereoselektive Cyclisierung. Der co-kristallisierte Inhibitor Azasqualen (schwarzes Stabmodell) induziert durch seine dem reaktiv gebundenen Substrat sehr ähnliche Konformation den Faltungszustand des natürlichen Terpensubstrates. Grünes Stabmodell: Katalytische Asparaginsäure (D376 in AacSHC) des DxDD-Motivs. **C:** Das DxDD-Motiv ist innerhalb der SHCs konserviert und essentiell für die Aktivität der Cyclasen. In AacSHC wird die katalytische Asparaginsäure D376 durch ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk zu Aminosäuren H451 und Y495 sowie einem Wassermolekül derart positioniert, dass ein stark acids, *anti*-ausgerichtetes Proton für die Brønsted-Säure-Katalyse zur Verfügung steht.

AacSHC weist ein beeindruckendes katalytisches Potenzial auf, das den selektiven Aufbau des polycyclischen Produktgerüsts durch mehrere direkt hintereinander abfolgende Reaktionen erlaubt.^{[39],[45]-[47]} Der zugehörige Reaktionsmechanismus wurde bereits intensiv studiert und beschrieben.^{[48],[49]-[55]} So konnten v.a. durch gerichtete Mutagenese- und Inhibierungsexperimente tiefere Einblicke in die katalytischen Schritte der AacSHC erhalten werden. Umfangreiche Studien konnten zeigen, dass das natürliche Substratspektrum der AacSHC eine große Bandbreite verschieden langer Terpenverbindungen zwischen C₁₃ - C₃₅ wie Farnesol (C₁₅), Nerolidol (C₁₅) oder Geranylaceton (C₁₃) umfasst, die zu den entsprechenden, vollständig cyclisierten Verbindungen umgesetzt werden können. Monoterpene (C₁₀) wie Geraniol oder Linalool werden allerdings praktisch nicht cyclisiert.^{[45],[56]-[60]} Während die hydrophobe Kavität des AacSHC-Wildtyps das natürliche Substrat Squalen (sowie kürzerkettige Analoga) wie eine passgenaue Matrize umgibt und so in eine reaktive Konformation überführt, ist dies für Monoterpene also nicht mehr möglich. MD-Simulationen hierzu zeigten, dass die native Form der aktiven Tasche des AacSHC-Wildtyps für die

Umsetzung von Monoterpenen zu geräumig ist und die für die Cyclisierung notwendige reaktive Substratanordnung und –bindung solch kleiner Substrate daher aus sterischen Gründen nicht mehr geleistet werden kann.

Zur Substrataktivierung verfügt *Aac*SHC über die bemerkenswert acide katalytische Asparaginsäure D376. Diese ist Teil des für diese Enzymklasse charakteristischen konservierten DxDD-Motives, welches im Falle von *Aac*SHC die Asparaginsäuren D374, D376 und D377 umfasst. Grund für die hohe Acidität von D376 ist ein *anti*-ausgerichtetes Proton, welches durch ein spezielles Wasserstoffbrücken-Netzwerk zu benachbarten Aminosäuren (Y495, H451) sowie einem H₂O-Molekül in dieser besonderen Geometrie gehalten wird und als starke Brønsted-Säure dient (s. Abbildung 1.2). Obwohl der pKa-Wert der katalytischen Asparaginsäure D376 nicht exakt bekannt ist, wird davon ausgegangen, dass das hierdurch übertragene Proton in *anti*-Konformation im Vergleich zu *syn*-orientierten Proton bis zu 10⁴ mal acider ist.^{[21],[22]} Diese herausragende Eigenheit macht *Aac*SHC zu einer spezifischen enzymatischen Brønsted-Säure, die auch zur Protonierung von nichtaktivierten C-C-Doppelbindungen in Terpensubstraten in der Lage ist.^{[48],[61]} Mit dem Ziel, die jeweiligen Funktionen bestimmter Aminosäuren im katalytischen Zentrum der *Aac*SHC zu identifizieren und zuzuordnen, wurden Aminosäurepositionen in erster Sphäre der aktiven Tasche bereits intensiv durch Mutationsstudien untersucht. Eine Übersicht dazu ist in Abbildung 1.3 gezeigt.

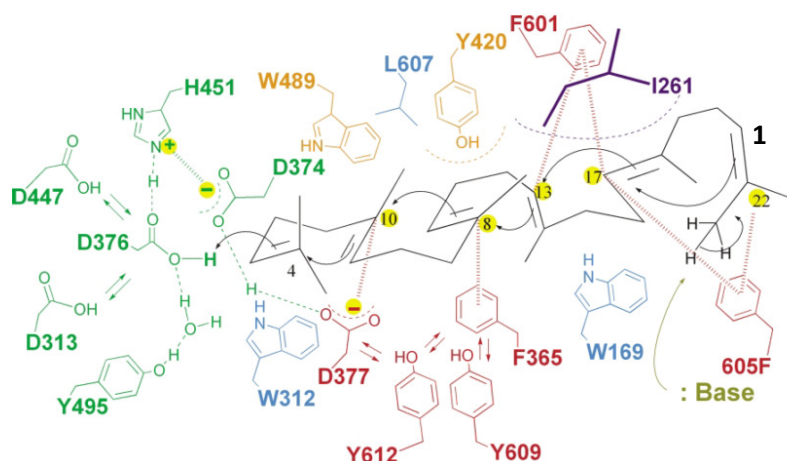


Abbildung 1.3: Positionen und Funktionen wesentlicher Aminosäuren innerhalb der aktiven Tasche der *Aac*SHC während der Faltung des natürlichen Substrates Squalen (**1**). Spezielle Bereiche wie die Protonierungsmaschinerie (grün), Kationen-stabilisierende Reste (rot, orange), die Stereokontrolle beeinflussende Positionen (lila) oder Substratbindungsbereiche (orange, blau) sind wie angegeben eingefärbt. Abbildung aus [46].

In unmittelbarer Umgebung zum Substrat befindet sich eine Vielzahl aromatischer Aminosäuren (Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan): Positionen W169, W312, F365, D376, W489, Y495, F601, Y609, Y612 (Nummerierung entsprechend *Aac*SHC) sind dabei in allen Triterpencyclasen konserviert,^[62] wobei v.a. D376 und Y495 der initialen Protonierung des Substrates dienen und Position W169 und W312 die Substratbindung unterstützen. Die Aminosäureseitenketten von F365, W489, F601, Y609 sowie Y612 wiederum stabilisieren intermediäre Kationen effektiv durch Wechselwirkung mit ihren π -Elektronensystemen. So stellt die aktive Tasche der *Aac*SHC neben dem räumlichen auch ein geeignetes elektronisches Umfeld für die anspruchsvolle Polyisoprencyclisierung zur Verfügung. Vier weitere Aminosäuren in der Umgebung des aktiven Zentrums (L36, A170, A419, G600), die in

Abb. 1.3 nicht gezeigt sind, stehen vermutlich ebenfalls in direktem Kontakt mit dem gebundenen Substrat und weisen eine hohe Konserviertheit innerhalb aller SHCs auf. Allerdings wurden diese Positionen bisher noch nicht charakterisiert, obwohl diese Bereiche ebenfalls funktionell relevant und daher interessante weitere Ansatzpunkte für Mutationsstudien sein könnten.^[62] Der Fokus bisheriger Mutagenese-Experimente lag in der Vergangenheit dabei weniger auf der Manipulation des Substratspektrums des Enzyms, sondern galt vielmehr der Untersuchung des katalytischen Apparates selbst.^{[51],[54],[63],[64]} Ausnahmen stellen die an diesem Institut durchgeführten Studien dar. So erstellte bspw. Hammer eine erste Mutantenbibliothek, in welcher die natürliche katalytische Maschinerie der *Aac*SHC erhalten und eine Veränderung der reaktiven Bandbreite durch Umformung der aktiven Tasche erreicht wurde.^[65] Erst kürzlich konnte durch Arbeiten von Syrén und Kollegen eine weitere spannende Eigenschaft der *Aac*SHC aufgedeckt werden, die bis dahin noch nie für eine SHC untersucht worden war: Im aktiven Zentrum der *Aac*SHC eingeschlossene Wassermoleküle nehmen zwar nicht (direkt) an der Reaktion teil, sind jedoch wichtige Voraussetzung für die effiziente Polycyclisierung der Terpenocyclasen. So ist die nötige Vorfaltung der langen linearen Polyisoprenkette des Substrates unter Bildung einer präcyclischen Konformation entropisch ungünstig und würde die Geschwindigkeit der Reaktion deutlich verringern. Für eine effektive Polycyclisierung müsste dieser nachteilige Effekt daher ausgeglichen werden. Eben dies wird in SHCs elegant durch das Freisetzen von Wassermolekülen über spezielle Kanäle bewerkstelligt, wodurch ein signifikanter Entropiegewinn erzielt wird, welcher den entropischen Nachteil der Substratfaltung überkompensiert und die Reaktionsgeschwindigkeit signifikant erhöht (s. Abbildung 1.4).^{[66],[67]}

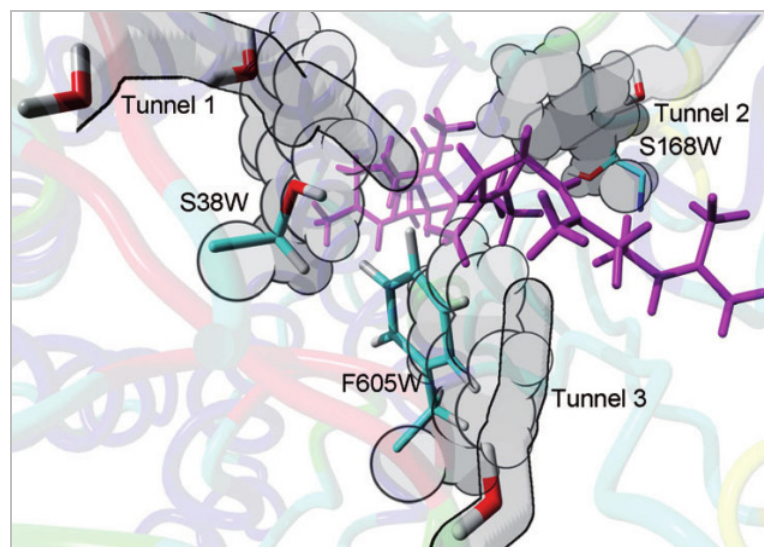


Abbildung 1.4: Spezielle Wasserkanäle in *Aac*SHC spielen eine zentrale Rolle für die Cyclisierung von Polyisoprensubstraten. Das natürliche C₃₀-Substrat Squalen ist als Stabmodell (magenta) gezeigt. Mutationsstudien identifizierten entscheidende Aminosäurereste an den, der aktiven Tasche zugewandten Kanaleingängen (cyanfarbene Stabmodelle). Durch Substitutionen dieser Reste gegen sterisch anspruchsvolle Tryptophane konnten die Wasserkanäle blockiert werden (dargestellt als graue Kalottenmodelle). Drei der Tunnel mit darin gefangenen Wassermolekülen sind schematisch gezeigt (grau). Abbildung aus [66].

Dieses umfangreiche katalytische Repertoire sterischer, saurer, elektronischer sowie entropischer Eigenschaften macht *Aac*SHC zu einem attraktiven Katalysator für die enzymatische Umsetzung einer Vielzahl nicht-natürlicher terpenoider Spezies, wodurch die Synthese anspruchsvoller cyclischer Zielmoleküle ermöglicht wird.^{[65],[68]-[70]}

1.3.2 Die Squalen-Hopen Cyclase aus *Zymomonas mobilis* (ZmoSHC1)

Neben der sehr gut untersuchten Squalen-Hopen Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* gibt es eine große Zahl weiterer, weniger intensiv studierter SHCs, wie bspw. die Squalen-Hopen Cyclasen ZmoSHC1 (UniProtKB: Q5NM88) und ZmoSHC2 (UniProtKB: P33990) aus *Zymomonas mobilis*. *Z. mobilis* ist ein gram-negatives Bakterium, welches Ethanol aus Glucose, Fructose und Sucrose herstellt und eine erstaunliche Toleranz gegenüber erhöhten Zuckergehalten sowie Ethanolkonzentrationen bis zu 13 % (w/v) aufweist.^[71] Diese ungewöhnliche Widerstandskraft wird durch den hohen Gehalt an Hopanoiden bewerkstelligt, welche die Zelle in die cytoplasmatische Zellmembran einbaut. Diese hopanoiden Membranbestandteile besitzen die wichtige Funktion von Regulatoren, welche die Zellmembran zusätzlich stabilisieren und das Zellwachstum so sogar unter solch unvorteilhaften Umweltbedingungen erlauben.^[72] *Z. mobilis* gehört zu den besten Hopanoidproduzenten der bakteriellen Welt und setzt Squalen-Hopen Cyclasen zur Synthese dieser komplexen Substanzen ein, wofür das Bakterium zwei verschiedene SHCs besitzt, ZmoSHC1 und ZmoSHC2, welche nur etwa 36 % Sequenzidentität untereinander aufweisen. Auch in manchen anderen Bakterien wie *Acetobacter pasteurianus*, *Rhodopseudomonas palustris* oder *Syntrophobacter fumaroxidans* existieren ebenfalls jeweils zwei verschiedene SHCs, wobei jeweils eine den entsprechenden genetischen Hintergrund für die Hopanoidbiosynthese besitzt, wohingegen dieser für die andere SHC fehlt.^[73] Der Grund für das Vorhandensein von zwei SHCs ist bis heute nicht genau bekannt. Zwar unterschieden sich SHC1 und SHC2 innerhalb desselben Organismus deutlich, allerdings bestehen zwischen der SHC1 eines Bakteriums und der entsprechenden SHC1 eines anderen Bakteriums wiederum relativ hohe Ähnlichkeiten, was vermutlich auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen ist.^[74] ZmoSHC1 ist mit ca. 44 % Aminosäureidentität der AacSHC relativ ähnlich. Aminosäuresequenz-Vergleiche der aktiven Zentren in AacSHC und ZmoSHC1 zeigten, dass von den 36 Aminosäuren, die in direktem Kontakt zum gebundenen Substrat stehen, 30 Positionen in beiden Enzymen von denselben Aminosäuren besetzt sind und sich die beiden katalytischen Zentren nur in der Besetzung der sechs übrigen Positionen unterscheiden. In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass ZmoSHC1 augenscheinlich das „natürliche“ Substrat Squalen allerdings nicht so effizient cyclisiert wie bspw. ZmoSHC2 oder AacSHC, sondern stattdessen offensichtlich eher kürzerkettige Terpene zu bevorzugen scheint und so bspw. Homofarnesol, Homofarnesolsäure oder Citronellal erstaunlich gut umsetzt. Ungewöhnlich an ZmoSHC1s Citronellal-Cyclaseaktivität ist v.a. die Tatsache, dass die Aktivierung des Substratmoleküls nicht an einer terminalen C-C-Doppelbindung stattfindet, sondern als Prins/En-Reaktion direkt über die Protonierung der Carbonylfunktion des Substrates erfolgt.^{[59],[60],[73],[75]} Das genetische Umfeld der ZmoSHC1 sowie deren deutlich geringere Fähigkeit hinsichtlich der Umsetzung von Squalen indiziert, dass ZmoSHC1 keine „typische“ SHC ist, sondern vielmehr eine sehr fähige, für die Umsetzung kürzerer Terpensubstrate angepasste Cyclase, welche bspw. die Herstellung der Naturstoffe Isopulegol (aus Citronellal) oder Ambroxan (aus Homofarnesol) erlaubt.^[60] Sequenzvergleiche konnten weiterhin zeigen, dass ZmoSH1 eine zusätzliche Loop-Insertion besitzt, die an der C-terminalen Region des Enzyms nahe dem Eingang zur aktiven Tasche positioniert ist. Ein vergleichbares Struktursegment existiert weder in AacSHC noch in ZmoSHC2. Nur wenige SHC1s sind bekannt, in denen derartige Loop-Regionen ebenfalls existieren. Untereinander weisen die Loops jedoch wiederum eine hohe sequenzielle Ähnlichkeit auf. Es wird angenommen, dass der Loop-Bereich größere Substrate vor dem Eintritt ins Innere des Enzyms hindert. Durch eine ZmoSHC1-Loop-Deletionsmutante konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Bereich tatsächlich erheblichen Einfluss sowohl auf die Aktivität als auch Substratspezifität der ZmoSHC1 gegenüber unterschiedlichen Terpensubstraten hat. So besaß eine Loop-Deletionsmutante gegenüber Homofarnesolsäure und Farnesylaceton eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Aktivität; gegenüber

anderen Substraten (Squalen, Homofarnesol, Nerolidol, Geranylaceton) war diese allerdings wiederum verringert.^[73] Weiterhin verfügt *ZmoSHC1* über einen N-terminal überhängenden Bereich mit einer Länge von 65 Aminosäuren und noch ungeklärter Funktion. Um diese strukturellen Besonderheiten der *ZmoSHC1* besser verstehen und wichtige Aminosäuren identifizieren zu können, waren bereits verschiedene Studien durchgeführt worden.^{[59],[60]} Allerdings konnten Details zur Proteinstruktur der *ZmoSHC1* bisher nicht weiter aufgedeckt werden. Aufgrund dieses Fehlens struktureller Daten mussten Computermodelle zur Abschätzung des Enzymaufbaus dienen und so wurde an diesem Institut von Silvia Fademrecht basierend auf der Kristallstruktur der *AacSHC* ein Homologiemodell für *ZmoSHC1* erstellt, welches in Abbildung 1.5 gezeigt ist.

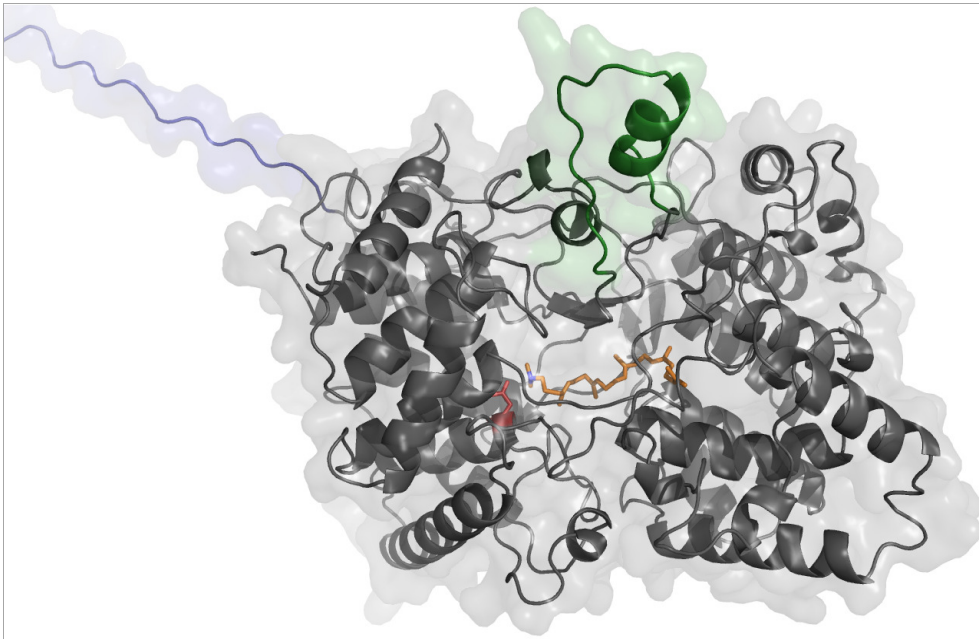


Abbildung 1.5: Homologiemodell der *ZmoSHC1*. Die Position des Squalen-Moleküls innerhalb der aktiven Taschen ist als oranges Stabmodell gezeigt. Die katalytische Asparaginsäure D376 ist rot eingefärbt. Die Loop-Region zwischen Aminosäuren 671-696 ist grün hervorgehoben und der N-terminal überhängende Bereich von Aminosäure 1 bis 65 ist blau dargestellt.

Da *ZmoSHC1* eine ausgesprochene Promiskuität gegenüber unterschiedlichen Molekülklassen einschließlich Aldehyden, Alkoholen sowie Terpenen unterschiedlicher Kettenlängen (Mono- bis Triterpene) aufweist, stellt diese SHC für derartige Substrate eine vielversprechende Alternative zu *AacSHC* dar.

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war das Design neuer enzymatischer Brønsted-Säure-Katalysatoren für die Erweiterung des Produkt- und Reaktionsspektrums von Squalen-Hopen Cyclasen (SHCs). Dies war nur durch Protein-Engineering zu erreichen. Da die enzymatische Reaktivität maßgeblich durch die Aminosäuren des aktiven Zentrums determiniert wird, sollten dort gezielt SHC-Mutanten geschaffen werden, welche reaktive chirale Umgebungen zur Verfügung stellen konnten, um die Substratbandbreite der SHCs um solche Reaktionen erweitern, welche auf chemischen Wege so bisher noch nicht zugänglich waren.

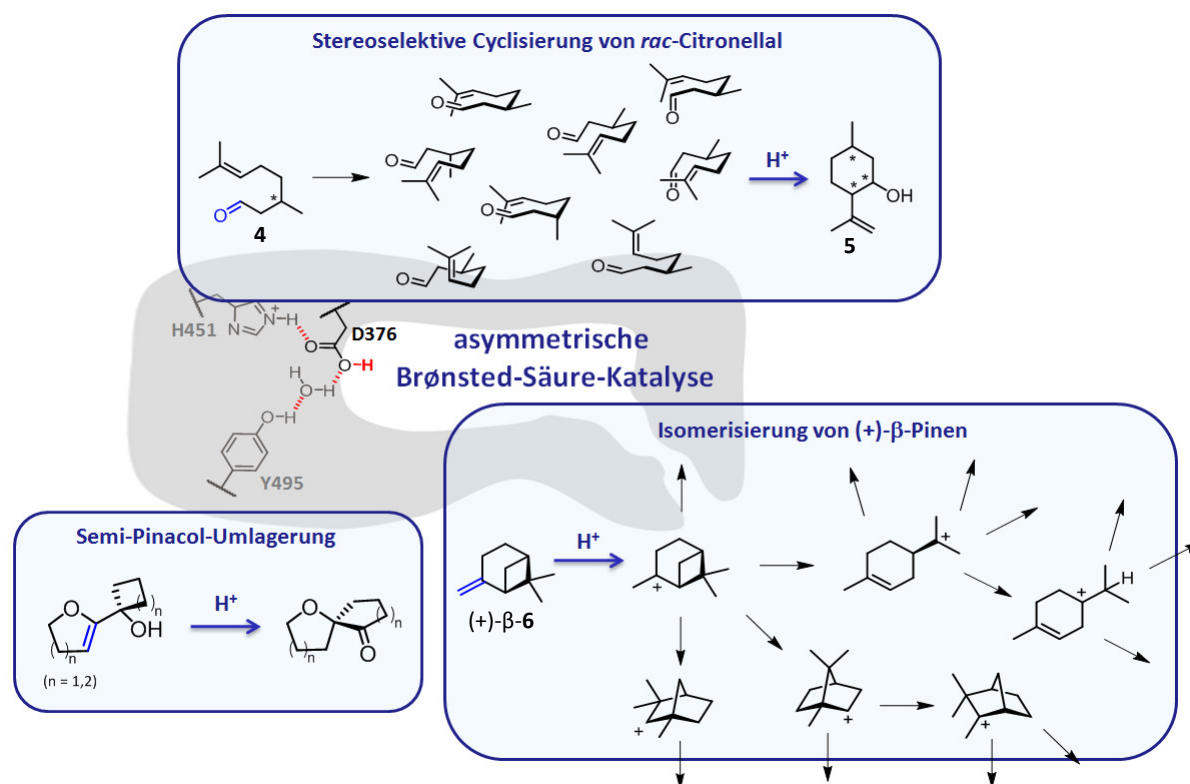
1.4.1 Kristallstrukturaufklärung der *ZmoSHC1*

Aufgrund der vielversprechenden katalytischen Aktivität der *ZmoSHC1* sind detailliertere Untersuchungen dieser Cyclase wichtig für das Verständnis und die Nutzung dieser ungewöhnlichen katalytischen Fähigkeiten. Mutationsstudien könnten hierbei spannende neue Erkenntnisse liefern. Da sich (semi-)rationales Design vor allem an Informationen über Struktur, Funktion oder spezifischen Positionen innerhalb des Enzyms orientiert, ist dafür das Vorhandensein struktureller Daten des Zielproteins unabdingbar. Bester Ausgangspunkt für Mutagenese-Experimente ist deshalb eine hochaufgelöste Kristallstruktur. Daher sollte im ersten Teil dieser Arbeit ein geeignetes Protokoll für Herstellung und Reinigung von *ZmoSHC1*-Varianten für die Kristallstrukturaufklärung entwickelt werden. Die Grundlage erfolgreicher Röntgenbeugungsmessungen ist dabei die Qualität der Proteinkristalle. Wichtigste Voraussetzungen dafür sind Reinheit und Stabilität der verwendeten Proteinlösung. Die Solubilisierung des Membranproteins muss dazu unter Verwendung eines geeigneten Tensides erfolgen, welches Stabilität und Aktivität des Proteins nicht zerstören. Anschließend müssen geeignete (chromatographische) Reinigungsschritte gefunden und kombiniert werden. Proteine mit abstehenden oder frei beweglichen Strukturbereichen können aufgrund erhöhter Proteinbeweglichkeit nur schwierig homogen zu kristallisieren sein.^{[76],[77]} Da *ZmoSHC1* einen solchen unstrukturierten N-terminalen Überhang mit bisher ungeklärter Funktion besitzt, könnte dieser Strukturbereich während des Kristallisierungsvorganges problematisch sein und die nötige symmetrische Packung des Proteinkristalles behindern. Um optimierte Bedingungen für die Reinigung und spätere Kristallisierung von *ZmoSHC1* zu schaffen, sollte das Enzym mit einem Polyhistidin-Tag für die Reinigung über IMAC versehen werden. Außerdem sollten *ZmoSHC1*-Varianten mit einem N-terminal verkürzten Bereich generiert werden: *ZmoSHC1_del1-27*, *ZmoSHC1_del1-58* sowie *ZmoSHC1_del1-65*. Zusätzlich sollte eine *ZmoSHC1*-Variante geschaffen werden, bei der das Loop-Segment zwischen Aminosäuren 671 bis 696 entfernt war (*ZmoSHC1_del671-696*). Während Proteinherstellung und -reinigung der *ZmoSHC1*-Varianten Teil der vorliegenden Arbeit waren, sollten Kristallisierungsexperimente sowie Röntgenbeugungsmessungen vom Kooperationspartner an der RUG Groningen (Niederlande) ausgeführt werden.

1.4.2 SHC-Varianten für neue Brønsted-Säure-katalysierte Reaktionen

Aufgrund ihres besonderen stark aciden, anti-orientierten Protons stellt *AacSHC* eine der wenigen Ausnahmen spezifischer enzymatischer Brønsted-Säuren dar. Damit ist diese Cyclase zur Aktivierung einer ganzen Bandbreite verschiedener funktioneller Gruppen in der Lage. Diese herausragende, synthetisch äußerst wertvolle Fähigkeit kann auf ein breites Spektrum unterschiedlicher, nicht-natürlicher Substrate sowie für vielfältige C-C und C-X-Bindungsbildungen angewendet werden.

Ebenfalls eignen sich SHCs aufgrund ihrer natürlichen elektronischen sowie sterischen Eigenschaften hervorragend zur Stabilisierung und Handhabung carbokationischer Intermediate, welche in chemischen Synthesen aufgrund ihrer hohen Reaktionsfreudigkeit oftmals nur schwer zu kontrollieren sind und daher häufig zu konkurrierenden Nebenreaktionen führen. Diese Schwierigkeit kann unter Verwendung von SHCs ebenfalls kontrolliert werden. In dieser Arbeit sollte am Beispiel der AacSHC gezeigt werden, dass eine Umprogrammierung des Substrat- und Reaktionsspektrums bei gleichzeitigem Erhalt der katalytischen Eigenschaften möglich ist. So sollten die bisher verborgenen, ungenutzten Möglichkeiten enzymatischer Brønsted-Säure-katalysierter Reaktionen weiter ausgeschöpft werden. Der Fokus vorliegender Arbeit lag dabei auf der Cyclisierung (Prins-Reaktion) von Citronellal (**4**), der Isomerisierung von (+)- β -Pinen (+)- β -**6** sowie der Spirocyclisierung (Semi-Pinacol-Umlagerung) allylischer Alkohole (s. Schema 1.4).



Schema 1.4: Übersicht über die in vorliegender Arbeit untersuchten Brønsted-Säure-katalysierten Reaktionen unter Verwendung von AacSHC-Varianten. Die Cyclisierung (Prins-Reaktion) von Citronellal (**4**) zu Isopulegol (**5**) kann in Abhängigkeit von unterschiedlichen Substratbindungsmodi diastereoselektiv erfolgen. Die Isomerisierung von (+)- β -Pinen (+)- β -**6** eröffnet ein umfangreiches Produktspektrum an v.a. mono- und bicyclischen Terpenen mit vielfältigen bioaktiven Eigenschaften. Durch die Semi-Pinacol-Umlagerung (Spirocyclisierung) allylischer Alkohole werden Spiroketale zugänglich.

Aufgrund der Konserviertheit der aktiven Zentren von SHCs ist es nicht möglich, auf ein natürliches Set bereits vorhandener Kavitäten zurückzugreifen – eine solche Auswahl verschiedenartiger reaktiver Umgebungen muss erst neu generiert werden. Mit diesem Ziel sollte daher anhand der Kristallstruktur der AacSHC durch semi-rationales Design eine fokussierte Mutantenbibliothek angelegt werden, welche eine diverse Auswahl an AacSHC-Varianten mit umgeformten aktiven Taschen bereit stellte (*reshaping*). Dadurch sollten neue, sterisch sowie elektronisch geeignete

Reaktionsumgebungen für die produktive Bindung und Umsetzung nicht-natürlicher terpenoider Substrate geschaffen werden.

Während des Cyclisierungsprozesses von Citronellal (**4**) zu Isopulegol (**5**) durchläuft das Substrat einen von mehreren sesselförmigen Übergangszuständen, welche sich durch die relativen Anordnungen der Substituenten unterscheiden und dadurch zu jeweils bestimmten Produktisomeren führen. Diese Substratfaltungsmodi sind abhängig von der gegenseitigen sterischen Abstoßung der Substituenten energetisch unterschiedlich günstig und führen daher zu einer Produktisomerenverteilung, die in einem achiralen Milieu durch die Boltzmann-Verteilung wiedergegeben wird.^[78] Für die selektive Herstellung ganz bestimmter Isopulegolisomere muss daher eine Reaktionsumgebung geschaffen werden, welche es erlaubt, die verschiedenen Substratkonformationen gezielt zu dirigieren. Vor allem die diastereoselektive Bildung des Produktes (-)-Isopulegol (-)-**5** ist besonders interessant, da es sich hierbei um die Vorläuferverbindung bei der industriellen Herstellung des Geruchs- und Geschmackstoffes (-)-Menthol handelt. Um die Stereoselektivität dieser Reaktion zu lenken, sollten *AacSHC*-Varianten entwickelt werden, deren umgeformte aktive Taschen geeignete Substratumgebungen für die sterische Kontrolle der Reaktion bereitstellen konnten.

In der Brønsted-Säure-katalysierten Isomerisierung von (+)- β -Pinen (+)- β -**6** hingegen sind vermehrt stabilisierende elektronische Einflüsse ausschlaggebend. Das zu Beginn der Reaktion durch die Substrataktivierung entstehende, reaktive Pinyli-Kation kann in Abwesenheit von stabilisierenden oder chiralen Einflüssen eine Vielzahl unterschiedlicher Folgereaktionen durchlaufen und führt so zwangsläufig zu einem komplexen Produktgemisch. Die chemische Isomerisierung von α -**6** in Gegenwart von Säurekatalysatoren ist in der Literatur bereits umfangreich untersucht, jedoch wird in der Regel eine Mischung verschiedener mono-, bi- und tricyclischer Terpene wie β -**6**, Tricyclen, Camphen, Limonen, Terpinen oder Terpinolen erhalten. Eine produktselektive Durchführung dieser Reaktion (insbesondere bzgl. Camphen oder Limonen) ist zwar Ziel zahlreicher Bemühungen, gelang bisher auf chemischem Wege allerdings nicht.^{[79],[80]} Aufgrund ihrer intrinsischen Eigenschaft, *in situ* generierte Carbokationen effektiv zu stabilisieren, ist *AacSHC* ein vielversprechender Ausgangspunkt zur Entwicklung von Biokatalysatoren zur Kontrolle kationischer Intermediate, um so die Produktselektivität der Isomerisierung von (+)- β -**6** steigern zu können.

Die Brønsted-Säure-katalysierte Spirocyclisierung allylischer Alkohole (Semi-Pinacol-Umlagerung) ermöglicht den schnellen Aufbau komplexer Molekülgerüste, verläuft dabei stereospezifisch (unter Inversion der Stereochemie am migrierenden Ende) und stellt eine wichtige Möglichkeit zur Bildung quaternärer Kohlenstoff(stereo)zentren dar, welche strukturelles Element zahlreicher bioaktiver Verbindungen sind. Für die Anwendung in der Naturstoffsynthese ist dieser Reaktionstyp daher von großem Nutzen. In der Literatur sind effiziente Spirocyclisierungen allylischer Alkohole über Semi-Pinacol-Umlagerungen bisher allerdings nur wenig beschrieben. In dieser Arbeit sollte daher mit Hilfe der *AacSHC*-Mutantenbibliothek untersucht werden, inwiefern die Fähigkeiten der SHCs zur Handhabung *in situ* gebildeter Carbokationen auch für diesen Reaktionstyp angewendet werden konnten. Hierfür wurden allylische Alkohole unterschiedlicher Ringgrößen untersucht, um gleichzeitig eventuelle Präferenzen der *AacSHC*-Varianten diesbezüglich feststellen zu können.

II MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien wurden in höchstmöglicher Reinheit von Carl-Roth (Karlsruhe, DE), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt, DE) und Sigma-Aldrich (St. Louis, US) bezogen. Kommerziell nicht erhältliche Verbindungen wurden chemisch synthetisiert und charakterisiert (2.8.15).

2.2 Plasmide und Oligonukleotide

2.2.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer) für die ortsgerichtete Mutagenese (2.7.2) sowie DNA-Sequenzierung (2.7.5) wurden von der Firma Metabion (Martinsried, DE) bezogen.

Tabelle 2.1: Verwendete Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz von 5'- nach -3'
Für die DNA-Sequenzierung	
pET-vT7 (T7 vorwärts primer)	GGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGG
ZmoSHC1_In (vorwärts primer)	CCGTGTCTTTACCCGTTATTGGC
AacSHC_In (vorwärts primer)	CGCTGAGCATTGTGATGAGCCGC
pET-RP (T7 rückwärts primer)	CTAGTTATTGCTCAGCGG

Tabelle 2.2: Verwendete Primer für die DNA-Amplifikation und ortsgerichtete Mutagenese von *ZmoSHC1*. Nukleotidsequenzen für vorwärts (fw) bzw. rückwärts (rev) laufende Primer sind entsprechend gekennzeichnet. Stammlösungen der Primer in ddH₂O (1 µg/µl) wurden bei -20 °C gelagert.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz von 5'- nach -3'
ZmoSHC1_fw	GCGTAGCCATATGGGTATTGACAGAATGAATAGCTTAAG
ZmoSHC1_rev	GCACTCGAGTCAATTATTCAAATCAATCAGTCTCTCTGCCC
ZmoSHC1_d1-27_fw	GCGTAGCCATATGGCTTCCGATAACCATAATCGG
ZmoSHC1_d1-58_fw	GCGTAGCCATATGGGGAATAGTCTGAATAATACC
ZmoSHC1_d1-65_fw	GCGTAGCCATATGACCCTTGTTTCAGCCTGTG
ZmoSHC1_d671-696_fw	GCACCGGATTCCCCGGTGCGTTTATGCTGCGTTATG
ZmoSHC1_d671-696_rev	CATAACGCAGCATAAACGCACCGGGGAATCCGGTGC

Tabelle 2.3: Verwendete Primer für die ortsgerichtete Mutagenese von *AacSHC*. Nukleotidsequenzen für vorwärts (fw) bzw. rückwärts (rev) laufende Primer sind durch einen Schrägstrich (/) getrennt aufgelistet.

<i>AacSHC</i>-Variante	Nukleotidsequenz von 5'- nach -3' (fw primer/ rev primer)
W169G	GAATTTGGCAGCGGGCGCGCGGACC / GGTCGCGCGCGCGCCGCTGCCAAATTC
S307G	GGCTGGATGTTTCAGGCGGGCATTAGCCCGG / CCGGGCTAATGCCCGCCTGAAACATCCAGCC
W312F	GCATTAGCCCGGTGTTTCGATACCGGCCTGG / CCAGGCCGGTATCGAACACCGGGCTAATGC
W312G	GCATTAGCCCGGTGGGCGATACCGGCCTGG / CCAGGCCGGTATCGCCACCGGGCTAATGC
Q366G	GGCTTTGCGTTTGGCTTTGATAACG / CGTTATCAAAGCCAAACGCAAAGCC
Q366W	GGCTTTGCGTTTTGGTTTGGATAACG / CGTTATCAAACCAAACGCAAAGCC
A419W	CGGCTGGGGCTGGTATGATGTGG / CCACATCATACCAGCCCCAGCCG
A419Y	CGGCTGGGGCTACTATGATGTGG / CCACATCATAGTAGCCCCAGCCG
Y420G	CGGCTGGGGCGCGGGCGATGTGGATAACACC / CGGCTGGGGCGCGGGCGATGTGGATAACACC
V448G	CGAGCGAAGATGGCACCGCGCATGTGC / GCACATGCGCGGTGCCATCTTCGCTCG
V448W	CGAGCGAAGATTGGACCGCGCATGTGC / GCACATGCGCGGTCCAATCTTCGCTCG
W489F	GGTTTGGCCGCTTCGGCGTGAAGTATCTGTATGG / CCATACAGATAGTTCACGCCGAAGCGGCCAAACC
W489G	GGTTTGGCCGCGGGCGTGAAGTATCTGTATGG / CCATACAGATAGTTCACGCCGCCGCGGCCAAACC
G490A	GGCCGCTGGGCCGTGAAGTATCTGTATGG / CCATACAGATAGTTCACGGCCCAGCGGCC
G490F	GGCCGCTGGTTCGTGAAGTATCTGTATGG / CCATACAGATAGTTCACGAACCAGCGGCC
Y495G	CGTGAAGTATCTGGGCGGCACCGGCG / CGCCGGTGCCGCCAGATAGTTCACG
Y495L	CGTGAAGTATCTGCTGGGCACCGGCG / CGCCGGTGCCGCCAGATAGTTCACG
Y495W	CGTGAAGTATCTGTGGGGCACCGGCG / CGCCGGTGCCCTCAGATAGTTCACG
G600L	CCGTATTATAACGGCACCTCTTCCCGGGCGATTTTTATCTGG / CCAGATAAAAATCGCCCGGAAGAGGGTGCCGGTATAAATACGG
G600W	CCGTATTATAACGGCACCTGGTTCGCGGGCGATTTTTATCTGG / CCAGATAAAAATCGCCCGGAACCAGGTGCCGGTATAAATACGG
F601G	CCGGCACCGGGGGCCCCGGGCGATTTTTATCTGG / CCAGATAAAAATCGCCCGGGCCCCGGTGCCGG
F605G	GGTTCGCGGGCGATGGCTATCTGGGCTATAACC / GGTATAGCCCAGATAGCCATCGCCCGGAACC

L607G	GCGATTTTTATGGCGGCTATACCATGTATCG / CGATACATGGTATAGCCGCCATAAAAATCGC
Y609F	GCGATTTTTATCTGGGCTTCACCATGTATCGCC / GGCGATACATGGTGAAGCCCAGATAAAAATCGC
Y609G	GCGATTTTTATCTGGGCGGCACCATGTATCGCC / GGCGATACATGGTGCCGCCAGATAAAAATCGC
Y609L	GCGATTTTTATCTGGGCTGACCATGTATCGCC / GGCGATACATGGTCAGGCCAGATAAAAATCGC
Y612F	GGCTATACCATGTTCCGCCATGTGTTTCC / GGAAACACATGGCGGAACATGGTATAGCC
Y612G	GGCTATACCATGGGCCGCCATGTGTTTCC / GGAAACACATGGCGGCCCATGGTATAGCC
Y612W	GGCTATACCATGTGGCGCCATGTGTTTCC / GGAAACACATGGCGCCACATGGTATAGCC
A419G/Y420A	GCAACGGCGGCTGGGGCGGCGCGGATGTGGATAACACCAGC / GCTGGTGTTATCCACATCCGCGCCGCCAGCCGCCGTTGC
A419G/Y420C	GCAACGGCGGCTGGGGCGGCTGCGATGTGGATAACACCAGC / GCTGGTGTTATCCACATCGCAGCCGCCAGCCGCCGTTGC
A419G/Y420G	GCAACGGCGGCTGGGGCGGCGGTGATGTGGATAACACCAGC / GCTGGTGTTATCCACATCACCGCCGCCAGCCGCCGTTGC

2.3 Plasmide

Gensequenzen, welche für die Wildtyp-SHCs aus *Zymomonas mobilis* (*ZmoSCH1*, UniProtKB: Q5NM88) und *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*AacSHC*, UniProtKB: P33247) kodieren, waren in einen pET-22b-Expressionsvektor (Novagen®, Merck, Darmstadt, DE) kloniert, der zur Selektion das Resistenzgen gegen Ampicillin enthält. Vektor pET-22b besitzt neben einer Multiplen Klonierungsstelle (MCS, multiple cloning site), in der verschiedene Restriktionsschnittstellen für Endonukleasen liegen, zusätzlich ein Gen für den Lactoserepressor *lacI^q*, durch den die Expression des T7-RNA-Polymerase-Gens unterdrückt wird. Die Zugabe des Galactose-Thioglycosids IPTG zur Expressionskultur führt zur Bindung von IPTG an den *lac*-Repressor, wodurch das *lac*-Operon aktiviert und die Repression des Gens für die T7-RNA-Polymerase aufgehoben wird. Gen-Modifikationen wurden so in die MCS eingefügt, dass sie unter der Kontrolle des T7-RNA-Polymerase-Promotors standen. Für *ZmoSCH1* wurden Gensequenzen so in die MCS eingebracht, dass durch eine His-Tag codierende Sequenz ein C-terminales His₆-Tag an das Genprodukt fusioniert wurde, welches zur Reinigung über Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (2.8.5.2.1) diente. Plasmidkarten des *ZmoSCH1*- sowie *AacSHC* Wildtyps sind in Abbildung 2.1 gezeigt. Sequenzen der Wildtyp-SHCs sind in Anhang A.1 zu finden. Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.4

gelistet und wurden sowohl in isolierter Form bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, als auch als *E. coli* BL21(DE3)-Dauerkulturen (2.8.2) bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

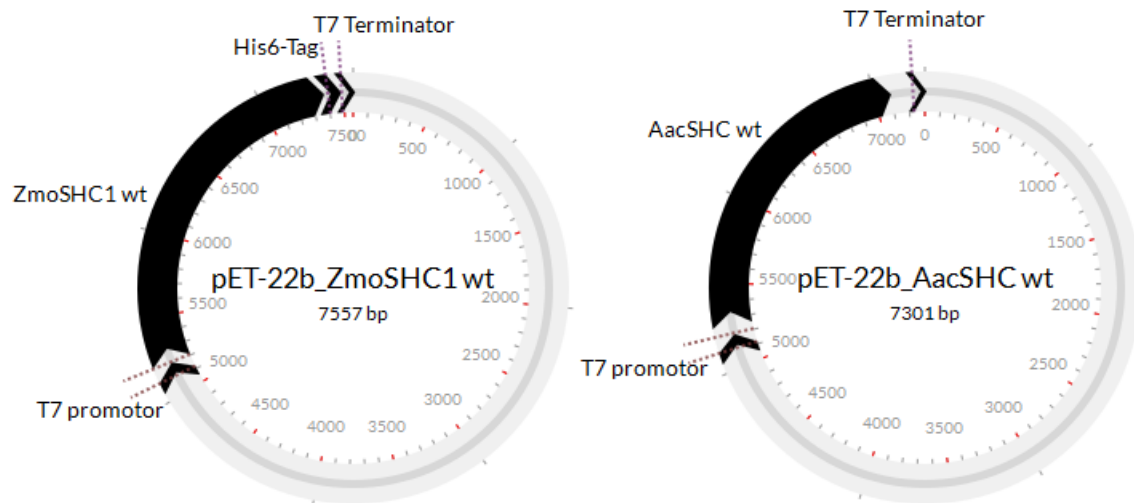


Abbildung 2.0.1: Plasmidkarten der pET-22b-Vektoren mit eingefügten Genen für den *ZmoSHC1*- (rechts) bzw. *AacSHC*-Wildtyp (links).

Tabelle 2.4: Verwendete pET-22b-Plasmide, welche die Gensequenzen kodierend für *AacSHC* (UniProtKB: P33247) bzw. *ZmoSHC1* (UniProtKB: Q5NM88) enthalten.

ITB-Nr.	SHC-Variante	Quelle
pITB1024	<i>AacSHC</i> Wildtyp	S. C. Hammer ^[65]
pITB1025	<i>AacSHC</i> /L36A	S. C. Hammer ^[65]
pITB1288	<i>AacSHC</i> /L36C	S. C. Hammer [PhD] ¹
pITB1289	<i>AacSHC</i> /L36S	S. C. Hammer [PhD] ¹
pITB1290	<i>AacSHC</i> /L36V	S. C. Hammer [PhD] ¹
pITB1026	<i>AacSHC</i> /L36W	S. C. Hammer ^[65]
pITB1027	<i>AacSHC</i> /W169A	S. C. Hammer ^[65]
pITB1291	<i>AacSHC</i> /W169G	Diese Arbeit
pITB1028	<i>AacSHC</i> /I261A	S. C. Hammer ^[65]
pITB1029	<i>AacSHC</i> /I261F	S. C. Hammer ^[65]
pITB1030	<i>AacSHC</i> /I261G	S. C. Hammer ^[65]
pITB1031	<i>AacSHC</i> /I261L	S. C. Hammer ^[65]
pITB1032	<i>AacSHC</i> /I261V	S. C. Hammer ^[65]
pITB1033	<i>AacSHC</i> /I261W	S. C. Hammer ^[65]

pITB1034	<i>AacSHC/S307A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1035	<i>AacSHC/S307F</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1292	<i>AacSHC/S307G</i>	Diese Arbeit
pITB1036	<i>AacSHC/W312A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1293	<i>AacSHC/W312F</i>	Diese Arbeit
pITB1294	<i>AacSHC/W312G</i>	Diese Arbeit
pITB1295	<i>AacSHC/W312V</i>	S. C. Hammer [PhD] ¹
pITB1037	<i>AacSHC/F365A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1038	<i>AacSHC/F365C</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1039	<i>AacSHC/F365G</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1296	<i>AacSHC/F365L</i>	S. C. Hammer [PhD] ¹
pITB1297	<i>AacSHC/F365N</i>	S. C. Hammer [PhD] ¹
pITB1040	<i>AacSHC/F365W</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1041	<i>AacSHC/Q366A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1042	<i>AacSHC/Q366F</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1298	<i>AacSHC/Q366G</i>	Diese Arbeit
pITB1299	<i>AacSHC/Q366W</i>	Diese Arbeit
pITB1043	<i>AacSHC/D376C</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1044	<i>AacSHC/A419F</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1045	<i>AacSHC/A419G</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1300	<i>AacSHC/A419W</i>	Diese Arbeit
pITB1301	<i>AacSHC/A419Y</i>	Diese Arbeit ¹
pITB1046	<i>AacSHC/Y420A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1047	<i>AacSHC/Y420C</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1302	<i>AacSHC/Y420G</i>	Diese Arbeit
pITB1048	<i>AacSHC/Y420W</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1049	<i>AacSHC/V448A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1050	<i>AacSHC/V448F</i>	S. C. Hammer ^[65]

pITB1303	<i>AacSHC/V448G</i>	Diese Arbeit
pITB1304	<i>AacSHC/V448W</i>	Diese Arbeit
pITB1051	<i>AacSHC/W489A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1305	<i>AacSHC/W489F</i>	Diese Arbeit
pITB1306	<i>AacSHC/W489G</i>	Diese Arbeit
pITB1307	<i>AacSHC/G490A</i>	Diese Arbeit
pITB1308	<i>AacSHC/G490F</i>	Diese Arbeit
pITB1309	<i>AacSHC/Y495G</i>	Diese Arbeit
pITB1310	<i>AacSHC/Y495L</i>	Diese Arbeit
pITB1311	<i>AacSHC/Y495W</i>	Diese Arbeit
pITB1052	<i>AacSHC/G600A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1053	<i>AacSHC/G600F</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1312	<i>AacSHC/G600L</i>	Diese Arbeit
pITB1313	<i>AacSHC/G600W</i>	Diese Arbeit
pITB1054	<i>AacSHC/F601A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1314	<i>AacSHC/F601G</i>	Diese Arbeit
pITB1055	<i>AacSHC/F601W</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1056	<i>AacSHC/F605A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1315	<i>AacSHC/F605G</i>	Diese Arbeit
pITB1057	<i>AacSHC/F605W</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1058	<i>AacSHC/L607A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1059	<i>AacSHC/L607F</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1316	<i>AacSHC/L607G</i>	Diese Arbeit
pITB1060	<i>AacSHC/L607W</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1061	<i>AacSHC/Y609A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1317	<i>AacSHC/Y609F</i>	Diese Arbeit
pITB1318	<i>AacSHC/Y609G</i>	Diese Arbeit
pITB1319	<i>AacSHC/Y609L</i>	Diese Arbeit

pITB1062	<i>AacSHC/Y609W</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1320	<i>AacSHC/Y612F</i>	Diese Arbeit
pITB1321	<i>AacSHC/Y612G</i>	Diese Arbeit
pITB1322	<i>AacSHC/Y612W</i>	Diese Arbeit
pITB1063	<i>AacSHC/F365A/Y420A/G600A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1064	<i>AacSHC/Y420A/G600A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1065	<i>AacSHC/F365A/Y420W/G600A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1066	<i>AacSHC/F365A/Y420A/G600F</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1067	<i>AacSHC/Y420A/G600F</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1068	<i>AacSHC/Y420W/G600A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1069	<i>AacSHC/F365A/Y420W/G600F</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1070	<i>AacSHC/Y420W/G600F</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1071	<i>AacSHC/F365C/Y420A/G600A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1072	<i>AacSHC/F365C/Y420A/G600F</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1073	<i>AacSHC/F365C/Y420W/G600A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1074	<i>AacSHC/F365C/Y420W/G600F</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1075	<i>AacSHC/F365A/Y420W</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1076	<i>AacSHC/F365C/Y420W</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1077	<i>AacSHC/F365A/G600F</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1078	<i>AacSHC/F365A/G600A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1079	<i>AacSHC/F365C/G600F</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1080	<i>AacSHC/F365C/G600A</i>	S. C. Hammer ^[65]
pITB1323	<i>AacSHC/A419G/Y420A</i>	Diese Arbeit
pITB1324	<i>AacSHC/A419G/Y420C</i>	Diese Arbeit
pITB1325	<i>AacSHC/A419G/Y420G</i>	Diese Arbeit
pITB1326	<i>AacSHC/A419G/G600A</i>	Diese Arbeit
pITB1327	<i>AacSHC/Y420A/G600A</i>	Diese Arbeit
pITB1328	<i>AacSHC/Y420C/G600A</i>	Diese Arbeit

pITB1329	<i>AacSHC/Y420G/G600A</i>	Diese Arbeit
pITB1330	<i>AacSHC/A419G/Y420A/G600A</i>	Diese Arbeit
pITB1331	<i>AacSHC/A419G/Y420C/G600A</i>	Diese Arbeit
pITB1332	<i>AacSHC/A419G/Y420G/G600A</i>	Diese Arbeit
pITB0280	<i>ZmoSHC1 Wildtyp</i>	M. Seitz ^[73]
pITB1333	<i>ZmoSHC1_d1-27</i>	Diese Arbeit
pITB1334	<i>ZmoSHC1_d1-58</i>	Diese Arbeit
pITB1335	<i>ZmoSHC1_d1-65</i>	Diese Arbeit
pITB1336	<i>ZmoSHC1_d671-696</i>	Diese Arbeit

¹Varianten entstammen einer Sättigungsmutagenese im Postdoktoranden-Projekt von Dr. S. C. Hammer.

2.4 Enzyme für molekularbiologische Arbeiten

Alle für die molekularbiologischen Arbeiten verwendeten Enzyme wurden von Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US (*Pfu*-Polymerase, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase) bzw. Sigma-Aldrich, St. Louis, US (DNaseI) zusammen mit den zugehörigen Reaktionspuffern bezogen und gemäß Herstellerangaben verwendet.

2.5 *E. coli*-Stämme

Zur Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten wurde standardmäßig *E. coli* XL1-Blue verwendet. Die Überexpression der Proteine (2.8.3) wurde in *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* C43(DE3) durchgeführt. Alle in Tabelle 2.5 aufgeführten Bakterienstämme wurden aus der Sammlung des Instituts für Technische Biochemie, Universität Stuttgart entnommen.

Tabelle 2.5: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])</i>	Studier & Moffatt, 1986
<i>E. coli</i> C43(DE3)	<i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm lon λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])</i>	Miroux & Walker, 1996
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nal^I) thi-1 recA1 relA1 hsdR17(r_K⁻m_K⁺) glnV44 lac [F'<i>proAB⁺ lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>]</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987

2.6 Herstellung von Lösungen und Sterilisierung

Für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurde standardmäßig ddH₂O (Milli-Q Reference, Merck Millipore, Darmstadt, DE) verwendet. Kulturmedien und Lösungen wurden zur Sterilisation bei 121 °C autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden steril filtriert (Filterporengröße 0,2 µm bzw. 0,45 µm).

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA

Durch Polymerasekettenreaktion (PCR) kann doppelsträngige DNA *in vitro* vervielfältigt werden. Dabei werden in einem Reaktionsprogramm drei sich periodisch wiederholende Schritte nacheinander geschaltet: Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Während der Denaturierung wird der Templat-DNA-Doppelstrang auf 95 °C erhitzt, wodurch die den Doppelstrang zusammenhaltenden Wasserstoffbrückenbindungen gebrochen und die beiden Stränge vollständig voneinander getrennt werden können. Im zweiten Schritt (Primerhybridisierung), lagern sich die eingesetzten vorwärts (fw) und rückwärts (rev) Primer an die DNA-Einzelstränge an, wobei durch einen Überschuss an Primern die Hybridisierung der einzelsträngigen DNA-Template verhindert wird. Das Absenken der Temperatur auf ca. 5 °C unter den Primerschmelzpunkt bewirkt deren Bindung (Annealing) an die komplementären DNA-Abschnitte der Template. Anschließend synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase mit Hilfe von Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTP) die komplementären DNA-Stränge (Elongation) vom 5'- zum 3'-DNA-Ende. Denaturierung, Annealing und Elongation bilden zusammen einen PCR-Zyklus; durch mehrere nacheinander geschaltete PCR-Zyklen erfolgt dabei die exponentielle Amplifikation, d.h. die rasche Vermehrung identischer DNA-Stränge. Zur DNA-Amplifikation wurde standardmäßig folgender Reaktionsansatz durchgeführt:

Tabelle 2.6: PCR-Reaktionsansatz.

Komponente	Volumen	Arbeitskonzentration
10x <i>Pfu</i> -Puffer	5 µl	1x
fw Primer (100 ng/µl)**	2 µl	4 ng/µl
rev Primer (100 ng/µl)**	2 µl	4 ng/µl
Templat-DNA	x µl	100 ng
dNTP-Mix (10 mM)**	1 µl	0,2 mM
ddH ₂ O	49-x µl	
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)***	1 µl	2,5 U

*verwendete Primer sind in 2.2.1 aufgeführt. **dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US. *** Zugabe unmittelbar vor Reaktionsbeginn.

Für die Ausführung der PCR-Reaktion wurden ausschließlich die Thermocycler Mastercycler gradient und ep gradient (Eppendorf, Hamburg, DE) und dabei standardmäßig folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Tabelle 2.7: Temperaturprogramm der PCR-Reaktionen.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	45 sec	} 25
Annealing	55 °C	45 sec	
Elongation	72 °C	1-2 min/kb*	
Elongation	72 °C	5-10 min*	1
Reaktionsende	8 °C	∞	

* Elongationszeit abhängig von der Größe des Templates.

Zur Reinigung von PCR-Produkten wurde das DNA Clean & Concentrator Kit Herstellers Zymo Research (Irvine, US) verwendet.

2.7.2 Ortsgerichtete Mutagenese (QuikChange-Reaktion)

Ortspezifische Aminosäuremutationen lassen sich gezielt durch QuikChange-Mutagenese in ganz bestimmte DNA-Abschnitte einführen. Diese Methode verläuft ähnlich einer PCR, wobei das DNA-Templat einer QuikChange-Reaktion gezielt mutiert wird. Dazu sind zwei spezielle, zueinander komplementäre Primer (vorwärts (fw) und rückwärts (rev) Primer) nötig, in deren Sequenzmitte sich die zu mutierende Sequenz befindet, die zu beiden Seiten von stabilen Überhängen aus ca. 10 - 15 Basen flankiert wird. Während des Reaktionszyklus synthetisiert die DNA-Polymerase pro Templat-DNA-Strang einen neuen zirkulären Strang, der den mutagenen Primer beinhaltet und an seinem 3'-Ende eine Lücke besitzt. Nach beendeter QuikChange-Reaktion wird durch Zugabe von *DpnI* die methylierte (nichtmutierte) parentale DNA spezifisch verdaut; die mutierte *in vitro* erzeugte DNA hingegen ist nicht-methyliert und wird daher während des Verdaus nicht abgebaut. Nach der Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen werden die Lücken der mutierten DNA-Stränge repariert. Standardmäßig wurde gemäß des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit-Handbuchs von Stratagene (La Jolla, US) folgender Reaktionsansatz für die ortsgerichtete Mutagenese verwendet:

Tabelle 2.8: QuikChange-Reaktionsansatz.

Komponente	Volumen	Arbeitskonzentration
10x <i>Pfu</i> -Puffer	5 µl	1x
fw Primer (100 ng/µl)*	1 µl	2 ng/µl
rev Primer (100 ng/µl)*	1 µl	2 ng/µl
Templat-DNA	x µl	50 ng
dNTP-Mix (10 mM)**	1 µl	0,2 mM
ddH ₂ O	50-x µl	
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)***	1 µl	2,5 U

*verwendete Primer sind in 2.2.1 aufgeführt. **dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US. *** Zugabe unmittelbar vor Reaktionsbeginn.

Für die Durchführung der QuikChange-Reaktion wurden ausschließlich die Thermocycler Mastercycler gradient und ep gradient (Eppendorf, Hamburg, DE) und dabei standardmäßig folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Tabelle 2.9: Temperaturprogramm für die QuikChange-Reaktion.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	45 sec	} 16-18
Annealing	55 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1-2 min/kb*	
Elongation	72 °C	5-10 min*	1
Reaktionsende	8 °C	∞	

* Elongationszeit abhängig von der Größe des Templates.

Der Reaktionsansatz wurde anschließend zum Verdau der methylierten DNA-Templatstränge mit 1 µl *DpnI* versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die mutierte DNA in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert (2.7.11) und diese zur Vereinzelnung auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Zellen, welche die mutierte DNA aufgenommen hatten, wurden mit Hilfe der dadurch vermittelten Resistenz gegen Ampicillin selektiert und über Nacht kultiviert werden (2.8.2), sodass abschließend die mutierte Plasmid-DNA Isoliert (2.7.3) und sequenziert (2.7.5) werden konnte.

2.7.3 DNA-Isolierung aus *E. coli* (Miniprep)

Für die Plasmidpräparation aus *E. coli*-Zellen wurde das Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, US) verwendet. Isolierte und gereinigte DNA wurde in ddH₂O eluiert und bei -20 °C

gelagert. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde standardmäßig ein NanoDrop ND-1000-Spektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) verwendet.

2.7.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Ermittlung von Reinheit und Konzentration von DNA-Lösungen erfolgte über die Messung der optischen Dichte mittels NanoDrop ND-1000-Spektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US). DNA-Konzentrationsbestimmungen erfolgten über die Messung der Extinktion von 1 µl Probe bei 260 nm (OD_{260} , Absorptionsmaximum von DNA & RNA) und bei 280 nm (OD_{280} , Absorptionsmaximum von Proteinen) gegen ddH₂O als Nullwert.

2.7.5 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA wurden 600 - 1000 ng der jeweiligen DNA-Probe an die GATC Biotech (Konstanz, DE) gesendet. Verwendete Primer sind in 2.2.1 aufgeführt.

2.7.6 Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von Proben unterschiedlich großer DNA-Moleküle. Durch die Vernetzung von Agarosepolymeren wird ein Gel geschaffen, das als Molekülsieb fungiert und abhängig von der Gelkonzentration unterschiedlich porös ist. Die durch ihre Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Fragmente werden beim Anlegen eines elektrischen Feldes durch die Agarosegelmatrix zur Anode gezogen, wobei die kleinsten DNA-Fragmente das Gel am schnellsten passieren können. Mit Markierungsstoffen kann die aufzutrennende Probe vor der Elektrophorese angefärbt und so für die spätere Analytik sichtbar gemacht werden. Ein Fluoreszenzfarbstoff dafür ist GelRed (Biotium, Hayward, US), welcher mit der zu analysierenden DNA interkaliert, wodurch elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit einem Fünftel des Probenvolumens an 6x DNA-Probenpuffer (6x DNA Gel Loading Dye, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) versetzt. Als Größenstandard für den Bereich von 75 bis 20000 bp wurde der GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) verwendet. Proben und Standard wurden in horizontale Agarosegele [0,7 % Agarose, 1 µg/ml GelRed in 1x TAE-Puffer (Tab. 2.10)] geladen und in einer Flachbrett-Elektrophoresekammer (Mini Sub Cell GT, Bio-Rad, Hercules, US) in 1x TAE-Puffer bei konstanter Spannung (100 V, PowerPac 3000, Bio-Rad, Hercules, US) elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Aufnahme der angefärbten DNA-Banden im UV-Licht wurde das Geldokumentationssystem Quantum ST4 (Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE) sichtbar gemacht.

Tabelle 2.10: Puffer für die Agarosegelelektrophorese.

50x TAE-Puffer (pH 8,0 – 8,5)	
Essigsäure	1 M
Tris	2 M
EDTA	0,05 M
pH einstellen (KOH)	

2.7.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Gel-Extraktion)

Zur DNA-Extraktion aus Agarosegelen wurde das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Irvine, US) verwendet.

2.7.8 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Palindromsequenzen innerhalb der DNA-Doppelhelix. Durch den Bruch von Phosphodiesterbindungen spalten (verdauen) diese Enzyme DNA entweder gerade, wobei glatte Enden („blunt ends“) entstehen, oder versetzt, was zu überhängenden, „klebrigen“ Enden („sticky ends“) führt. Letztere können besser mit anderen, komplementären DNA-Überhängen für Klonierungen ligiert werden. Die für präparative Restriktionsverdau verwendeten Enzyme sind in 2.4 aufgeführt und wurden gemäß den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Verdauete Reaktionsansätze wurden mittels Agarosegelelektrophorese (2.7.6) kontrolliert und für die nachfolgende Ligation (2.7.9) mittels DNA Clean & Concentrator™-5 Kit (Zymo Research, Irvine, US) gereinigt.

2.7.9 Ligation

Komplementäre, kohäsive DNA-Einzelfragmente (aus dem Restriktionsverdau) können über ihre endständigen Nukleotidüberhänge aneinander anlagern und enzymkatalysiert verknüpft (ligiert) werden. Diese Ligation wird durch die T4-DNA-Ligase durchgeführt, welche die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen DNA-Moleküls und der 3'-Hydroxygruppe des anderen katalysiert. Um eine Religation von verdauter DNA zu vermeiden, wurde diese vor Beginn der Ligation durch Inkubation mit 1 U FastAP alkalischer Phosphatase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) für 1 h bei 37 °C dephosphoryliert. Durch fünfminütiges Erhitzen auf 75 °C wurde die Phosphatase wieder inaktiviert. Für die nachfolgende Ligation wurde Insert-DNA standardmäßig in dreifachem Überschuss zur Vektor-DNA eingesetzt (Tab. 2.11) und der Ligationsansatz über Nacht bei 4 °C inkubiert. Erhitzen des Ansatzes für 10 min auf 65 °C inaktivierte die T4-DNA-Ligase und die ligierte Plasmid-DNA konnte im Anschluss in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert werden (2.7.11).

Tabelle 2.11: Standardansatz für Ligationen.

Komponente	Endkonzentration
Insert-DNA	3x
Vektor-DNA	1x (20-100 ng)
10x T4-DNA-Ligase-Puffer	1x
T4-DNA-Ligase (5 U/μl)	5 U
ddH ₂ O	ad 20 μl

2.7.10 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (Rubidiumchlorid-Methode)

Unter Kompetenz wird die Fähigkeit einer Zelle verstanden, freie DNA aufnehmen zu können (Transformation). Da ihre natürliche Kompetenz für eine effiziente Transformation in der Regel nicht ausreicht, müssen Bakterienzellen vor der Transformation zuerst kompetent gemacht werden, d.h. eine Vorbehandlung durchlaufen, in der die Permeabilität ihrer Zellmembran für DNA kurzfristig

erhöht und dadurch die Transformationseffizienz gesteigert wird. Ein geeignetes Protokoll zur Generierung chemisch kompetenter Zellen ist die Rubidiumchlorid-Methode. Dazu wurden zunächst Übernachtskulturen des jeweiligen *E. coli*-Stammes (2.5) kultiviert. In einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden 50 ml eines sterilen LB-Mediums mit 100 µl der Übernachtskultur inokuliert, bei 37 °C und 180 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 inkubiert und die Bakterienlösung bei 4 °C und 8000 UpM in einem sterilen 50 ml Falcon pelletiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml eisgekühltem TFBI-Puffer (Tab. 2.12) aufgenommen, für 90 min auf Eis inkubiert und anschließend wieder für 10 min bei 8000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Nach vorsichtiger Resuspension des Pellets in 4 ml eisgekühltem TFBII-Puffer (Tab. 2.12) und Inkubation für 45 min auf Eis wurden die kompetenten Zellen zügig aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -78 °C gelagert.

Tabelle 2.12: Puffer für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen.

TFBI-Puffer (pH 5,8)		TFBII-Puffer (pH 6,5)	
Kaliumacetat	30 mM	MOPS	10 mM
CaCl ₂	10 mM	RbCl	10 mM
MnCl ₂	50 mM	CaCl ₂	75 mM
RbCl	100 mM	Glycerin	15 % (v/v)
Glycerin	15 % (v/v)	pH einstellen (1 M KOH), steril filtrieren	
pH einstellen (1 M Essigsäure), steril filtrieren (0,2 µm Porengröße), kühl lagern		(0,2 µm Porengröße), kühl lagern	

2.7.11 Transformation von *E. coli*

Um *E. coli*-Zellen mit freier DNA zu transformieren, wurden 40 µl kompetenter Zellen (2.7.10) auf Eis aufgetaut, mit 10 µl eines Ligationsansatzes bzw. 1 µl Plasmidlösung versetzt, sanft gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C und anschließendem Kühlen auf Eis für 2 - 3 min wurde die Bakteriensuspension in 100 µl LB-Medium aufgenommen, 30 – 40 min bei 37 °C inkubiert, auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht im Inkubationsschrank kultiviert.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Medien für die Zellkultivierung

Als Nährmedium für *E. coli*-Flüssigkulturen wurde sowohl LB-Medium (*lysogeny broth*)^[81] als auch TB-Medium (*terrific broth*)^[82] verwendet. LB- und TB-Medium sowie der 1 M Kaliumphosphatpuffer für das TB-Medium (Tab. 2.13) wurden steril autoklaviert. Anschließend wurde TB-Medium mit Kaliumphosphatpuffer in einem Verhältnis von 9 : 1 gemischt.

Tabelle 2.13: Verwendete Flüssigmedien für die Kultivierung von *E. coli*-Zellen.

LB-Medium (Sambrook <i>et al.</i> ^[81])		Kaliumphosphatpuffer für TB-Medium (pH 7,0) (Green ^[83])	
Trypton	10 g/l	1 M K ₂ HPO ₄	61,5 % (v/v)
Hefeextrakt	5 g/l	1 M KH ₂ PO ₄	38,5 % (v/v)
NaCl	5 g/l		

TB-Medium (Tartof und Hobbs ^[82])	
Trypton	12 g/l
Hefeextrakt	24 g/l
Glycerin	4 g/l
Kaliumphosphatpuffer	10 % (v/v)

Als Festmedium wurden 1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium gelöst, autoklaviert und zu LB-Agar-Platten gegossen, die zur Zellvereinzellung dienen. Selektiert wurde jeweils durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (Ampicillin) ins Medium, wobei eine Endkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt wurde.

2.8.2 Zellwachstum und Dauerkulturen

Anzuchtkulturen wurden standardmäßig durch Inokulation von LB-Flüssigmedium mit Zellen einer *E. coli*-Dauerkultur (Glycerin-Stock) oder einer LB-Agar-Platte angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 180 UpM in inkubiert, wobei durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin selektiert wurden. Das Anwachsen der Bakterienzellen wurde durch Zelldichtemessungen verfolgt. Dazu wurde die Absorption der Zellkultur bei 600 nm (OD₆₀₀) mit Hilfe eines Ultrospec 3100pro Photometers (GE Healthcare / Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) gemessen. Zellausstriche auf Festmedium wurden über Nacht bei 37 °C im Inkubationsschrank kultiviert. Für die Herstellung von *E. coli*-Dauerkulturen wurden Glycerin-Stocks hergestellt, indem LB-Flüssigkultur im Verhältnis 1 : 1 in steriler Glycerinlösung (50 %) suspendiert und sofort bei -78 °C eingefroren und gelagert wurde.

2.8.3 Proteinexpression in *E. coli*

Die Proteinbiosynthese (Genexpression) kann in Bakterien durch Induktion reguliert werden. Ist die rekombinante DNA in das Lactose-Operon (*lac*-Operon) kloniert, kann durch Zugabe von IPTG die Expression der T7-RNA-Polymerase induziert werden, welche für die Transkription des Zielgens notwendig ist. Alternativ zur IPTG-gesteuerten Induktion kann die Expression eines Gens auch durch

Autoinduktion veranlasst werden, die beispielsweise durch Nährstoffmangel auftritt: Hat *E. coli* die Glucose im Nährmedium metabolisiert, setzt der Abbau von vorhandener Lactose ein, die zu Allolactose umgesetzt wird, an den *lac*-Repressor binden kann und dadurch ebenfalls die Expression des Zielproteins induziert. Für die Proteinüberexpression wurden in dieser Arbeit ausschließlich Bakterienstämme verwendet. Nachdem ein Plasmidkonstrukt in einen *E. coli*-Stamm transformiert worden war (2.7.11), konnte dieser in einer Übernachtskultur kultiviert (2.8.2) und für die Expression der SHC-Varianten eingesetzt werden. Standardmäßig wurde in einem 500 ml-Volumen TB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin exprimiert, wobei Erlenmeyerkolben mit Schikanen sowie dem fünffachen Volumen der Flüssigkultur wurden eingesetzt, um eine ausreichende Versorgung der Zellkultur mit Sauerstoff sicher zu stellen. In Abhängigkeit der zu exprimierenden SHC (*AacSHC* oder *ZmoSHC1*) wurden dabei unterschiedliche *E. coli*-Stämme (2.5) und unterschiedliche Expressionsprotokolle verwendet:

Zur Expression von *ZmoSHC1* wurde das Nährmedium mit einer Vorkultur auf $OD_{600} = 0,1$ angeimpft und bei 37 °C und 180 UpM bis zu einer $OD_{600} = 0,4 - 0,6$ kultiviert. Durch Zugabe von 0,2 mM IPTG wurde die Proteinbiosynthese induziert und die Bakterienkultur für 5 h bei 30 °C und 180 UpM inkubiert. Die Expression der *AacSHC* erfolgte analog, allerdings wurde die Proteinbiosynthese durch Autoinduktion veranlasst und die Zellsuspension nach der Inokulation bei 37 °C und 180 UpM für 18 h inkubiert. Abschließend wurden die Zellen geerntet (4 °C, 10 min, 10000 UpM) und entweder direkt lysiert (2.8.4) oder bei -20 °C gelagert. Expressionsstudien wurden analog als 50 ml-Ansätze in 250 ml-Schikanekolben durchgeführt.

2.8.4 Mechanischer Aufschluss von *E. coli*-Zellen

Das Zellpellet aus der Proteinexpression wurde für den Zellaufschluss im dreifachen Volumen Lysepuffer (3 ml/g Zellpellet) mit Proteaseinhibitor PMSF sowie einer Spatelspitze DNase I resuspendiert (Tab. 2.14). Bakteriensuspensionen wurden während des gesamten Zellaufschlusses auf Eis gekühlt.

Tabelle 2.14: Verwendete Lysepuffer für den Zellaufschluss.

Lysepuffer für <i>ZmoSHC1</i> (pH 7,0)		Lysepuffer für <i>AacSHC</i> (pH 6,0)	
Kaliumphosphatpuffer	200 mM	Natriumcitrat	200 mM
EDTA	1 mM	EDTA	1 mM
PMSF	0,2 mM	PMSF	1 mM
pH einstellen		pH einstellen	

In Abhängigkeit vom jeweiligen Volumen wurde die Zellsuspension entweder mittels Ultraschalllanze oder Hochdruck aufgeschlossen: Volumina über 30 ml wurden durch das Anlegen eines Gegendrucks von 500 – 1000 bar an einem EmulsiFlex-C5 Homogenisator (Avestin, Ottawa, CAN) lysiert, wobei jede Probe mindestens 4 - 5 Aufschlusszyklen durchlief. Für Volumina bis oder unter 30 ml wurde eine Ultraschalllanze Sonifier S250A (Branson Ultrasonics, Danbury, US) verwendet, die Bakterienzellen durch die Erzeugung von Kavitationsblasen aufschloss. Jede zu lysierende Zellsuspension wurde dabei insgesamt 5 min auf Eis sonifiziert und das Homogenisat anschließend 30 min bei 4 °C und 25000 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet, welches die membrangebundenen SHCs enthielt, wurde in einem Solubilisationsschritt weiter aufgearbeitet (2.8.5).

2.8.5 Solubilisierung und Reinigung der Membranproteine

2.8.5.1 Herstellung der SHC-Solubilisate

Da Squalen-Hopen Cyclasen monotopische Membranproteine sind, sind Detergenzien (Tenside) notwendig, welche die Herauslösung (Solubilisierung) der Proteine aus der Lipid-Doppelschicht unter nicht-denaturierenden Bedingungen ermöglichen, sodass mit einer weitestgehend zellmembranfreien Enzympräparation gearbeitet werden kann. In Abhängigkeit von der verwendeten SHC (*AacSHC* oder *ZmoSHC1*) bzw. ihrer späteren Verwendung wurden unterschiedliche Reinigungsprotokolle (s. Abb. 2.2) sowie unterschiedliche Detergenzien zur Solubilisierung verwendet: Sowohl CHAPS als auch Triton X-100 (TX-100) sind geeignete Tenside für die Extraktion von Membranproteinen und tragen zum Erhalt des nativen Zustands und damit der Aktivität des solubilierten Proteins bei. TX-100 wurde bereits früh zur Reinigung, Charakterisierung und Kristallisierung der *AacSHC* eingesetzt.^{[37],[56],[84]} Das zwitterionische Tensid CHAPS besitzt zusätzlich u.a. den Vorteil, dass es aufgrund seiner hohen kritischen Mizellkonzentration (CMC) leicht durch Dialyse wieder aus einer Lösung entfernt werden kann. Für die Solubilisierung wurde das Zellpellet nach dem Zellaufschluss im selben Volumen (1 g/ml) Solubilisierungspuffer (Tab. 2.15) resuspendiert und über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert.

Tabelle 2.15: Verwendete Solubilisierungspuffer.

Solubilisierungspuffer für <i>ZmoSHC1</i> (pH 7,0)		Solubilisierungspuffer für <i>AacSHC</i> (pH 6,0)	
Kaliumphosphatpuffer	50 mM	Natriumcitrat	60 mM
Detergenz	1 % (w/v)	Detergenz	1 % (w/v)
pH einstellen		pH einstellen	

Dieses Solubilisat wurde im Falle von *ZmoSHC1* direkt weiter verwendet, d.h. weiteren Reinigungsschritten zugeführt (s. Abb. 2.2). Da *AacSHC*, das aus dem thermophilen Bakterium *Alicyclobacillus acidocaldarius* stammt, eine deutlich hitzestabilere Enzymstruktur aufweist, konnte diese Eigenschaft für einen thermischen Vorreinigungsschritt verwendet werden, bei dem das Solubilisat für 30 min bei 50 °C im Wasserbad erhitzt wurde. Dadurch denaturierten weniger stabile *E. coli*-eigene Proteine und konnten anschließend durch Präzipitation (4 °C, 20 min, 10000 UpM) vom *AacSHC*-Enzympräparat separiert werden.

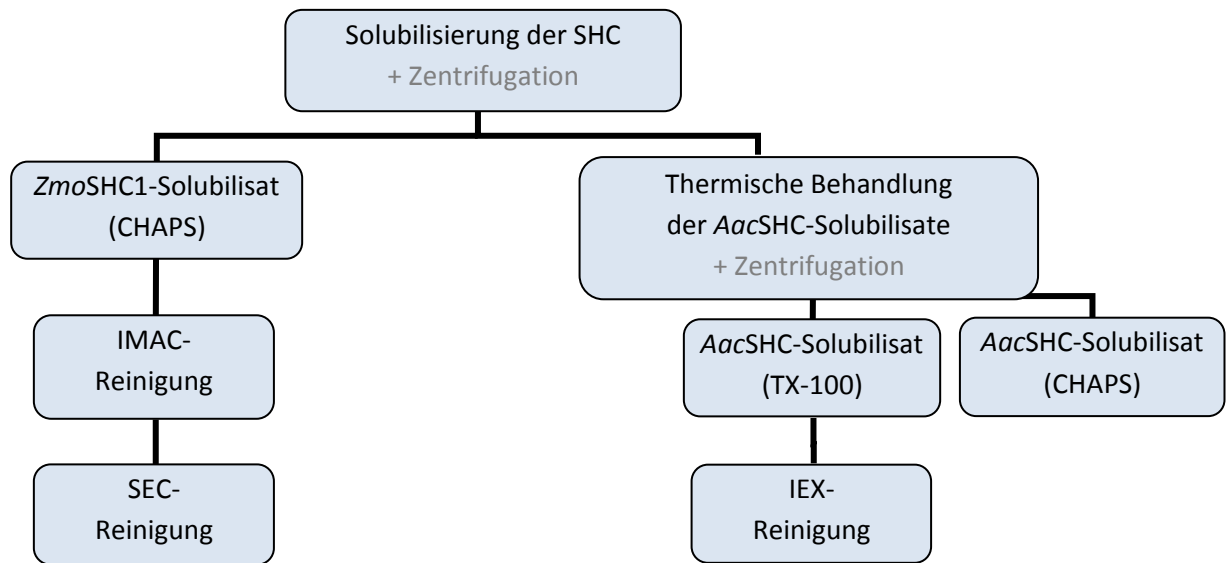


Abbildung 2.2: Fließschema zum Ablauf der Reinigungsschritte für *ZmoSHC1*- sowie *AacSHC*-Varianten nach der Solubilisierung in CHAPS bzw. Triton X-100 (TX-100). *ZmoSHC1* wurde über IMAC (2.8.5.2.1) sowie SEC (2.8.5.2.2) gereinigt. Die Reinigung von *AacSHC*-Varianten erfolgte über thermische Vorreinigung und nachfolgende IEX (2.8.5.3).

2.8.5.2 Reinigung der *ZmoSHC1*-Varianten

Um die benötigte Reinheit für Kristallisationsversuche zu erreichen, wurden die Enzympräparationen der *ZmoSHC1*-Varianten an einem ÄKTA™ Explorer-FPLC-System (GE Healthcare/Amersham, UK) aufgearbeitet. Im ersten Schritt wurde dazu Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) durchgeführt.

2.8.5.2.1 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

1975 beschrieben Porath *et al.* erstmals die Anwendung spezifischer koordinativer Wechselwirkungen zwischen Metallionen wie Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} oder Co^{2+} und Aminosäureseitenketten wie Cystein, Histidin, Tryptophan zur Proteinfractionierung.^[85] IMAC nutzt diese Metall-Chelat-Komplexbildung, indem ein mit einem Affinitätstag (bspw. Polyhistidin-Tag) fusioniertes Zielprotein an die auf einer Säulenchromatographiematrix immobilisierten Metallionen gebunden wird. Durch Zugabe eines kompetitiven Moleküls wie Imidazol, das eine höhere Affinität für die immobilisierten Metallionen besitzt, kann das getaggte Zielprotein wieder gezielt von der Säulenmatrix verdrängt werden. Alle Varianten der *ZmoSHC1*, die als Fusionskonstrukte mit His₆-Affinitäts-Tag (2.3) generiert worden waren, wurden daher an einer mit Ni^{2+} -Ionen beladenen HisTrap FF-Säule (GE Healthcare/Amersham, UK) gebunden, angereichert und durch Zugabe eines hochmolaren Imidazolpuffers eluiert. Durch die Detektion der Wellenlänge bei 280 nm wurden Chromatogramme der jeweiligen FPLC-Läufe aufgenommen. Alle Puffer für die IMAC (Tab. 2.16) wurden vor der Verwendung filtriert (0,2 µm Porengröße) und im Ultraschallbad entgast. Solubilisate wurden direkt vor der säulenchromatographischen Reinigung 30 min bei 4 °C und 25000 UpM zentrifugiert und filtriert (0,2 µm Porengröße).

Tabelle 2.16: Puffer für die IMAC.

Equilibrierungspuffer / Puffer A (pH 7,0)	
KCl	300 mM
Imidazol	2 mM
CHAPS	0,5 % (w/v)
Kaliumphosphatpuffer	50 mM
pH einstellen	

Elutionspuffer / Puffer B (pH 7,0)	
KCl	300 mM
Imidazol	500 mM
CHAPS	0,5 % (w/v)
Kaliumphosphatpuffer	50 mM
pH einstellen	

Stripping-Puffer (pH 7,4)	
Natriumphosphat	20 mM
NaCl	0,5 M
EDTA	50 mM
pH einstellen	

Nach Vorexperimenten mit linearem Imidazolgradienten wurde ein optimierter Stufengradient für die gezielte Elution des Zielproteins entwickelt. Beide Methoden sind in Tab. 2.17 und Tab. 2.18 aufgeführt. Nach Equilibrierung des Säulenmaterials wurde die injizierte Enzympräparation auf die Säulenmatrix gebunden und durch einen Waschschriff von schwach- oder nichtbindenden Probenbestandteilen getrennt. Die Elution gebundener Probenbestandteile erfolgte durch schrittweise Erhöhung der Imidazolkonzentration. Abschließend wurde das Säulenmaterial gereinigt und reequilibriert. Um die Sepharosematrix vollständig zu reinigen, wurde ein Stripping-Puffer (Tab. 2.16) verwendet, das Säulenmaterial gemäß Herstellerangaben mit 10 % NaOH, Ethanol und ddH₂O gewaschen und unter Verwendung einer 0,1 M Nickelsulfatlösung regeneriert.

Tabelle 2.2: Lineare Methode für die IMAC. Proben wurden mit 1 ml/min injiziert. Fließgeschwindigkeit während des Laufs: 2,5 ml/min. Angaben in Säulenvolumen (CV).

Schritt (Puffer)	Länge in CV
Equilibrierung (100 % A)	3
Waschen (100 % A)	7
Elution (0 - 100 % B)	15
Reinigung (100 % B)	3
Reequilibrierung (100 % A)	3

Tabelle 2.18: Gradientenmethode für die IMAC. Proben wurden mit 0,5 ml/min injiziert. Fließgeschwindigkeit während des Laufs: 1 ml/min. Angaben in Säulenvolumen (CV).

Schritt (Puffer)	Länge in CV
Equilibrierung (100 % A)	3
Waschen (100 % A)	3
Elution (0 % B)	3
Elution (10 % B)	8
Elution (35 % B)	8
Elution (100 % B)	3
Reequilibrierung (100 % A)	3

Vereinigte Probenfraktionen wurden (4 h oder über Nacht) bei 4 °C gegen Kaliumphosphatpuffer (50 mM, 0,5 % (w/v) CHAPS, pH 7,0) dialysiert, um Präzipitation des Enzyms durch in der Lösung enthaltenes Imidazol zu verringern. Proteinpräparationen wurden standardmäßig bei 4 °C gelagert. Probenreinheit, Enzymkonzentration und -aktivität wurden parallel untersucht mittels SDS-

PAGE (2.8.7), Western-Blot (2.8.9), kolloidaler Coomassie-Färbung (2.8.8), Bradford-Assay (2.8.6) sowie durch Aktivitätstests über analytische Biotransformationen (2.8.13).

2.8.5.2.2 Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

Die mittels IMAC (2.8.5.2.1) gereinigten Enzymproben wurden in einem zweiten Reinigungsschritt, der Größenausschluss-Chromatographie (SEC) über eine mit Sephacryl S-200 gepackte ($N = 7077$, $A_s = 1$) XK 26/100-Säule (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) noch weiter in ihre Bestandteile aufgetrennt. Proteinlösungen wurden dazu mittels Ultrafiltration (Vivapin 6 / 20 ml, Sartorius, Göttingen, DE) auf $< 1\%$ des Säulenvolumens aufkonzentriert. Puffer und Enzymproben für die SEC wurden vor der Verwendung filtriert (0,2 μm Porengröße).

Tabelle 2.19: Puffer für die SEC.

SEC-Puffer (pH 7,0)	
Kaliumphosphatpuffer	50 mM
CHAPS	0,5 % (w/v)
NaCl	150 mM

pH einstellen, entgasen

Nach der Equilibrierung des Säulenmaterials mit SEC-Puffer (Tab. 2.19) wurde die Enzymprobe mit einem Fluss von 0,5 ml/min injiziert und bei einer Flussrate von 1,0 ml/min über die Säulenmatrix aufgetrennt. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Detektion der Wellenlänge bei 280 nm verfolgt. Für die Zuordnung von Proteingrößen wurde eine Mischung aus Referenzproteinen im relevanten Größenbereich verwendet (s. Abb. 2.3). Regenerierung und Lagerung des Säulenmaterials erfolgte gemäß Herstellerangaben.

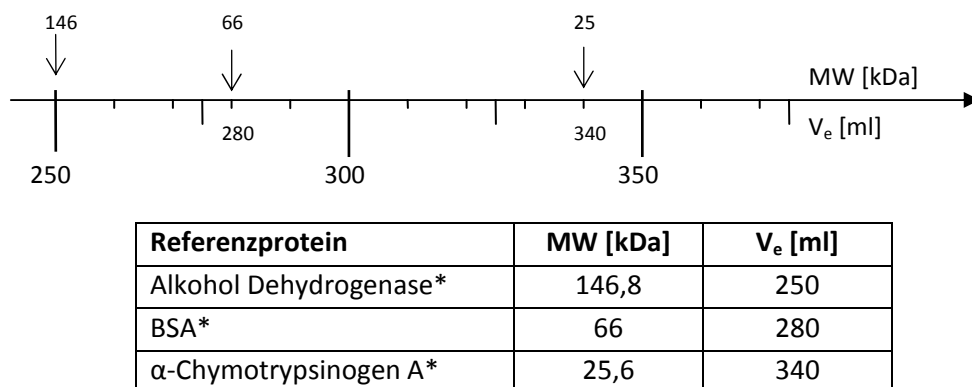


Abbildung 2.3: Referenzproteine, die als Größenmaßstab für die SEC über eine mit Sephacryl S-200 gepackte XK 26/100-Säule verwendet wurden. MW: Molekulargewicht [kDa]. V_e : Elutionsvolumen [ml]. *Hersteller: Sigma-Aldrich, St. Louis, US.

2.8.5.3 Reinigung der AacSHC-Varianten

Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie (IEX) beruht auf der Eigenschaft eines Proteins, bei einem bestimmten pH-Wert aufgrund des Ladungszustands seiner Aminosäuren eine positive oder negative Nettoladung aufzuweisen. Durch ionische Wechselwirkungen können geladene Proteine daher an ein entgegengesetzt geladenes Säulenmaterial adsorbiert werden, wobei die Stärke der Interaktion v.a. von der Anzahl und Lokalisierung der Ladungen abhängig ist. Durch Erhöhung der

Salzkonzentration im Puffer werden adsorbierte Moleküle wieder von der Säulenmatrix abgelöst, da die Salzionen mit ihnen um die Bindung an den Ionenaustauscher konkurrieren. Moleküle mit geringer Nettoladung bzw. schwacher ionischer Interaktion beginnen zuerst von der Säule zu eluieren. Für Moleküle mit stärkeren ionischen Wechselwirkungen werden höhere Salzkonzentrationen benötigt, sodass diese später eluieren. Solubilisate der AacSHC-Varianten (in TX-100) wurden über IEX an einer Diethylaminoethyl (DEAE) Sephacel-Gelmatrix (Sigma-Aldrich, St. Louis, US) gereinigt, um nichtenzymatische Hintergrundreaktionen zu minimieren. Zu Beginn der IEX wurde das Anionenaustauscherharz mit 5 CV Regenerierungspuffer (Tab. 2.20) und 5 CV Waschpuffer (Tab. 2.20) gespült. Die Enzympräparationen wurden nach der thermischen Vorreinigung (s. Abb. 2.2) 30 min bei 4 °C und 25000 UpM zentrifugiert, im Verhältnis 1 : 4 mit ddH₂O auf 0,2 mM Citrat verdünnt und filtriert (0,2 µm Porengröße), bevor sie auf das Säulenmaterial aufgetragen wurden. Nach der Bindung der Probenbestandteile an die DEAE-Sephacel-Matrix wurde mit 5 CV Waschpuffer gewaschen und mit 5 (- 10) CV Elutionspuffer (Tab. 2.20) gegebenenfalls unter Fraktionierung eluiert, sodass standardmäßig Enzymlösungen mit Konzentrationen im Bereich von 3–5 mg/ml erhalten wurden.

Tabelle 2.20: Puffer für die Ionenaustauschchromatographie (IEX).

Regenerierungspuffer (pH 6,0)		Waschpuffer (pH 6,0)	
Natriumcitrat	12 mM	Natriumcitrat	12 mM
Triton X-100	0,2 % (w/v)	Triton X-100	0,2 % (w/v)
NaCl	500 mM	pH einstellen (NaOH)	
pH einstellen (NaOH)		Elutionspuffer (pH 6,0)	
		Natriumcitrat	12 mM
		Triton X-100	0,2 % (w/v)
		NaCl	200 mM
		pH einstellen (NaOH)	

2.8.6 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur quantitativen Proteinbestimmung einer Lösung wurde das photometrische Verfahren nach Bradford verwendet.^[86] Der Bradford-Test basiert auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250, der in seiner ungebundenen, kationischen Form ein Absorptionsmaximum bei 470 nm besitzt. In saurem Milieu bindet der rote Farbstoff an basische und aromatische Aminosäureseitenketten von Proteinen, wodurch sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm in Richtung der gebundenen, blauen Form verschiebt. Daher ist die Absorptionszunahme bei 595 nm ein direktes Maß für die Proteinkonzentration einer Lösung. Die Proteinkonzentration unbekannter Proben wurde anhand von BSA-Standardgeraden im Konzentrationsbereich von 0,1 – 1,5 mg/ml und unter Verwendung von BradfordUltra-Lösung (Expedeon, Cambridge, UK) ermittelt, die den Einsatz in Lösungen mit bis zu 1 % Detergenz erlaubt: Standardmäßig wurden Proteinkonzentrationsbestimmungen in vierfacher Ausführung in einer 96 Well-Platte an einem SpectraMax® 340PC384-Mikrotiterplattenleser (Molecular Devices, Sunnyvale, US) durchgeführt. Proben unbekannter Konzentration wurden verschieden verdünnt angesetzt, um Absorptionen im linearen Bereich der

BSA-Standardgeraden zu erreichen. Je 10 µl einer Probenverdünnung wurden mit 150 µl BradfordUltra-Reagenz gemischt und die Absorption des Ansatzes bei 595 nm gegen einen Blank (Puffer) gemessen. Aus gemessenen Probenmittelwerten und der BSA-Standardgeraden wurden die unbekanntenen Probenkonzentrationen berechnet.

2.8.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteinlösungen elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, nachdem sie durch Zugabe eines SDS-Probenpuffers vorbehandelt wurden: Durch Anlagerung von anionischen SDS-Tensidmolekülen an Proteine werden diese durch coulombsche Abstoßung denaturiert. Im Probenpuffer enthaltenes Dithiothreitol bewirkt die Reduktion und damit Spaltung von Disulfidbrücken im Protein. Die Anlagerung der SDS-Moleküle bewirkt außerdem, dass die Eigenladung der Proteine vernachlässigt werden kann und alle SDS-Proteinkomplexe ein annähernd gleiches Masse-Ladungs-Verhältnis aufweisen, d.h. sich nur noch in ihrer Masse unterscheiden. In der denaturierenden Tris-Glycin-SDS-Gelelektrophorese hat sich das diskontinuierliche Verfahren etabliert: In einem kurzen, großporigen Sammelgel wird die Proteinprobe zunächst zu einer schmalen Lauffront aufkonzentriert um dann im längeren, feinporigeren Trenngel in scharfe Banden aufgetrennt. Ansätze für die Herstellung der 10 %igen Trenngele bzw. 5 %igen Sammelgele sind in Tabelle 2.21 aufgeführt.

Tabelle 2.21: Lösungen zur Herstellung von Polyacrylamidgelen. Ansatz ausreichend für 4 Gele.

Trenngel (10 %)	Volumen (ml)	Sammelgel (5 %)	Volumen (ml)
ddH ₂ O	8	ddH ₂ O	6,8
30 % Acrylamidlösung*	6,6	30 % Acrylamidlösung*	1,7
1,5 M Tris (pH 8,8)	5	1,5 M Tris (pH 8,8)	1,25
10 % SDS	0,2	10 % SDS	0,1
40 % APS	0,2	40 % APS	0,1
TEMED	0,008	TEMED	0,01

* Acrylamid/Bis-Acrylamid (37,5 : 1).

Proteinproben für die SDS-Page wurden im Verhältnis 1 : 5 mit 6x SDS-Probenpuffer (Tab. 2.22) versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE wurden in eine Elektrophoreseapparatur (SE 250 Mighty Small II, Hoefer, Holliston, US) gespannt, die Taschenkämme entfernt und die Elektrophoresekammer vollständig mit 1x SDS-Elektrophoresepuffer (Tab. 2.22) gefüllt. Die Geltaschen wurden mit je 10 – 15 µl Probe (ca. 5 µg gereinigtes Protein bzw. 15 µg einer Proteinmischung) beladen. In eine Tasche jedes Gels 5 µl wurde der Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) aufgetragen. Zur Aufkonzentrierung der Proteine im Sammelgel wurden für 15 mA pro Gel an die Elektrophoresekammer angelegt (PowerPac, Bio-Rad, Hercules, US); anschließend wurde die Stromstärke auf 20 – 25 mA pro Gel erhöht und die Elektrophorese bis zum Austreten der Proteinbandenfront fortgeführt.

Tabelle 2.22: Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE.

6x SDS-Probenpuffer		10x Elektrophoresepuffer (pH 8,3)	
4 M Tris-HCl pH 6,8	7 ml	Tris	0,25 M
Glycerin (87 %)	3 ml	Glycin	1,92 M
SDS	1,03 g	SDS	1,0 %
Bromphenolblau	1,2 mg	ddH ₂ O	ad 1 l
DTT	0,93 g		
gründlich homogenisieren, bei -20 °C lagern		Coomassie-Färbelösung	
Entfärbelösung		Methanol	30 %
Methanol	30 %	Essigsäure	10 %
Essigsäure	10 %	ddH ₂ O	60 %
ddH ₂ O	60 %	Coomassie Brilliant Blue R-250	0,1 %

Nach beendeter elektrophoretischer Trennung wurden die Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt. Die Coomassie-Färbung beruht auf der Bildung eines Farbstoff-Protein-Komplex im sauren Milieu durch Ionenbindungen und van-der-Waals-Kräfte zwischen den basischen oder aromatischen Aminosäureseitenketten der Proteine und den Farbstoffmolekülen. Polyacrylamidgele wurden dazu in Coomassie-Färbelösung 2–3 h inkubiert, um die auf dem Gel fixierten Proteinbanden anzufärben. Durch Inkubation in Entfärbelösung wurde anschließend ungebundener Farbstoff entfernt, bis die blaugefärbten Proteinbanden deutlich auf dem Gelhintergrund zu erkennen waren. Nach vollständiger Entfärbung wurden die Polyacrylamidgele an einem Quantum ST4 Geldokumentationssystem (Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE) aufgenommen.

2.8.8 Sensitive kolloidale Coomassie-Färbung

Zur schnellen und sensitiven Abschätzung der Reinheit einer Proteinprobe wurde alternativ zur standardmäßigen Proteinfärbung (2.8.7) nach der SDS-PAGE ein nach Kang *et al.* abgewandeltes Protokoll für die kolloidale Coomassie-Färbung (*Blue Silver Staining*) verwendet, mit der bis zu 1 ng/Bande detektiert werden kann.^{[87]-[89]}

Tabelle 2.23: Lösungen für die sensitive kolloidale Coomassie-Färbung.

Färbelösung		Entfärbelösung	
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,02 % (w/v)	Ethanol	10 % (v/v)
Al ₂ SO ₄ ·16H ₂ O	5 % (w/v)	H ₃ PO ₄	2 % (v/v)
Ethanol	10 % (v/v)		
H ₃ PO ₄	2 % (v/v)		

Für die Herstellung der Färbelösung wurde $\text{Al}_2\text{SO}_4 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$ in ddH_2O gelöst, mit Ethanol versetzt und gerührt, bis eine homogene Lösung entstand. Unter Rühren wurden Coomassie Brilliant Blue G-250 und Phosphorsäure zugegeben, sodass eine Suspension mit flockigem Bodensatz entstand. Anzufärbende Polyacrylamidgele wurden 2 - 3 h in Färbelösung (Tab. 2.23) inkubiert, mit Entfärbelösung (Tab. 2.24) und H_2O gewaschen und an einem Quantum ST4-System aufgenommen.

2.8.9 Western Blot und Immundetektion

Der Western Blot mit Antikörpernachweis ist ein spezifisches, immunologisches Nachweisverfahren für auf einer Membran fixierte Proteine. Dazu werden diese zunächst elektrophoretisch mittels SDS-PAGE (2.8.7) über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Western Blot findet dann die elektrophoretische Übertragung der Proteinbanden auf eine Nitrocellulose-Trägermembran statt. Nach dieser Immobilisierung werden die Proteine mit (für sie spezifischen) Antikörpern gekoppelt und detektiert. In dieser Arbeit verwendete Antikörper sind in Tabelle 2.24 aufgelistet und dienen dem Nachweis der *ZmoSHC1*-Varianten, die mit einem His₆-Tag versehen waren und daher über Antikörper gegen dieses Tag detektiert werden könnten.

Tabelle 2.24: Verwendete Antikörper (AK).

	Antikörperlösung	Konzentration
I	Primärer AK (monoklonaler anti-polyHistidin-AK aus Maus)*	0,01 % (v/v) in Blockierlösung
II	Sekundärer AK (anti-Maus IgG-HRP aus Hase)*	0,01 % (v/v) in Blockierlösung

*Hersteller: Sigma-Aldrich, St. Louis, US

Für jeden Western Blot wurden eine Nitrocellulosemembran und vier Whatmanfilterpapiere (in der Größe eines Polyacrylamidgels) zurecht geschnitten. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der zu untersuchenden Proteinproben mittels SDS-PAGE (2.8.7) wurden Polyacrylamidgel und Nitrocellulosemembran separat 10 min in 1x Transferpuffer (Tab. 2.25) inkubiert. Auf die Bodenplatte der Western-Blot-Transferkammer (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, US) wurde ein „Blot-Sandwich“ geschichtet, bestehend aus zwei in 1x Transferpuffer getränkten Whatmanfilterpapieren, einer Nitrocellulosemembran, dem Acrylamidgel und zwei abschließenden, in 1x Transferpuffer getränkten Filterpapieren. Senkrecht zur Laufrichtung des Gels wurden für 45 min 15 V Spannung angelegt, wodurch die Proteinbanden aus dem Gel auf die Membran transferiert wurden (Western Blot). Für den immunologischen Antigennachweis (Immundetektion) wurden die auf die Membran transferierten Proteinbanden mit einem spezifischen Antikörperkomplex konjugiert, der durch Chemolumineszenz detektiert werden konnte: Zur Absättigung freier Bindestellen (d.h. zur Verringerung unspezifischer Bindung) auf der Nitrocellulosemembran wurde diese zunächst 1 h bei RT in Blockierlösung (Tab. 2.25) inkubiert, 3x 10 min mit 1x TBS-T (Tab. 2.25) gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit Antikörperlösung I (Tab. 2.24) benetzt. Wieder wurde 3x 10 min mit 1x TBS-T gewaschen. Inkubation der Membran in Antikörperlösung II (Tab. 2.24) für 50 min bei RT bewirkte die Bindung des sekundären an den primären AK. Erneut wurde die Membran 3x 10 min mit 1x TBS-T gewaschen.

Tabelle 2.25: Puffer und Lösungen für Western Blot und Immundetektion.

10x Transferpuffer	
Tris	0,25 M
Glycin	1,92 M

1x Transferpuffer	
10x Transferpuffer	10 % (v/v)
Methanol	20 % (v/v)

10x TBS (pH 7,4)	
NaCl	1,5 M
KCl	0,03 M
Tris	0,5 M

pH einstellen (HCl)

1x TBS-T	
10x TBS	10 % (v/v)
Tween 20	0,1 % (v/v)

Blockierlösung	
Milchpulver	4 % (w/v)

in 1x TBS lösen

Stripping-Puffer (pH 2,8)	
Glycin	0,2 M
NaCl	0,5 M

pH einstellen (HCl)

Das Konjugat aus Primär- und Sekundärantikörper mit daran gekoppelter Meerrettich-Peroxidase (HRP) wurde mittels Chemolumineszenz visualisiert, wofür das Amersham™ ECL™ Western Blotting Analysis System (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) gemäß Herstellerangaben verwendet wurde.

Alternativ wurde wie folgt vorgegangen: Zur Induktion der Chemolumineszenz wurden 4 ml Lösung A (Tab. 2.26) mit 1,2 µl 35 % H₂O₂ und 400 µl Lösung B (Tab. 2.26) gemischt, auf die zu entwickelnde Nitrocellulosemembran gegeben und unter Schwenken für 2 min inkubiert. Dadurch wurde die Oxidationsreaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid initiiert, wobei die auf dem Sekundärantikörper konjugierte HRP als Katalysator fungierte. Unmittelbar im Anschluss erfolgte die Detektion der resultierenden Chemolumineszenz an einem Fusion-SL-Dokumentationssystem (Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE).

Tabelle 2.26: ECL-Detektionslösungen.

Lösung A	
0,1 M Tris-HCl pH 8,6	200 ml
Luminol	50 mg

gekühlt (10 °C) lagern

Lösung B	
4-Hydroxymzimtsäure	11 mg
DMSO	10 ml

dunkel lagern

Zur Entfernung von Antikörpern von einer Nitrocellulosemembran wurde diese 2 – 5 min in 40 ml Stripping-Puffer (Tab. 2.25) geschüttelt, mit 1 M NaOH neutralisiert, 2x 30 min mit TBS gewaschen, 1 h bei RT in Blockierlösung inkubiert und konnte anschließend erneut mit Antikörperlösung I behandelt werden.

2.9 Gaschromatographie

Für die Analytik über Gaschromatographie wurden zwei verschiedene Systeme verwendet. Biotransformationen mit *ZmoSHC1*-Varianten wurden an einer Shimadzu GC-2010 Plus (Kyōto, JP) mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und einer DB-5 Kapillarsäule (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Agilent, Santa Clara, US) analysiert, bei der Wasserstoff als Trägergas ($v = 30$ cm/s) diente.

Standardmäßig wurde für die Analytik der *AacSHC*-Varianten ein Agilent 7890A GC/MS (Santa Clara, US) mit kombiniertem massenselektivem Detektor (MSD 5975C, Santa Clara, US) genutzt, wobei der Gasfluss nach der Trennung über die Kapillarsäule geteilt wird und somit die parallele Analyse über FID und MSD durchgeführt wird. Als Trägergas diente hierbei Helium (konstanter Druck: 17,937 psi). Typischerweise wurde ein Injektionsvolumen von 1 μl, bei einer Injektortemperatur von 250 °C, einem Split-Verhältnis 5 : 1 sowie einer FID-Temperatur von 320 °C gemessen. Als externer Standard für Quantifizierungen wurde 1-Decanol verwendet. Für Arbeiten mit Citronellal wurde die DB-5ht-Kapillarsäule (30 m × 0,25 mm × 0,1 μm, Agilent, Santa Clara, US) verwendet; Arbeiten mit β-Pinen wurden an einer DB5-Kapillarsäule (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Agilent, Santa Clara, US) durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle gaschromatographischen Messungen mit einer Standard-Methode mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: 3 min auf 50 °C halten, mit 6 °C/min Erhitzen auf 120 °C, mit 10 °C/min Erhitzen auf 150 °C, mit 15 °C/min Erhitzen auf 170 °C, mit 20 °C/min Erhitzen auf 200 °C, mit 25 °C/min Erhitzen auf 250 °C, mit 30 °C/min Erhitzen auf 310 °C mit einer Haltezeit von 1 min. GC-Analysen der Biotransformationen Citronellal wurden unter Verwendung des folgenden Temperaturprogramms durchgeführt: 3 min auf 75 °C halten, mit 7,5 °C/min Erhitzen auf 120 °C, mit 10 °C/min Erhitzen auf 150 °C, mit 15 °C/min Erhitzen auf 170 °C, mit 50 °C/min Erhitzen auf 325 °C mit einer Haltezeit von 5 min. Für die GC-Messungen der enzymatischen Umsetzungen mit β-Pinen wurde eine weitere Methode mit folgendem Temperaturprofil verwendet: Beginnend bei 50 °C, mit 2,5 °C/min Erhitzen auf 60 °C, mit 6 °C/min Erhitzen auf 125 °C, mit 60 °C/min Erhitzen auf 300 °C mit einer Haltezeit von 1 min. Für die chemischen Synthese der Spiroverbindungen und deren Vorläufern sowie zur Analyse der entsprechenden enzymatischen Umsetzungen wurde eine Methode mit folgendem Temperaturprogramm entwickelt: 2 min auf 75 °C halten, mit 10 °C/min Erhitzen auf 150 °C, mit 15 °C/min Erhitzen auf 200 °C, mit 20 °C/min Erhitzen auf 250 °C, mit 30 °C/min Erhitzen auf 310 °C mit einer Haltezeit von 1 min.

2.10 Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie

Zur Überprüfung der Identität und Reinheit von (synthetisierten) Verbindungen wurden Kernresonanz-Spektren gemessen. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance 500 Spektrometer bei 500,15 MHz und 125,76 MHz gemessen. Die chemische Verschiebung (δ) wurde in *parts per million* (ppm) angegeben und auf den Standard Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm) bezogen.

2.11 Flüssigchromatographie (HPLC)

Für die Reinigung von Verbindung **14** wurde semipräparative Umkehrphasen-HPLC an einem Agilent-System (Santa Clara, USA) durchgeführt, das mit einer G1311A quaternären Pumpe, einem HIP ALS G1367B Autosampler (400 µL Loop), einem G1315D DAD Detektor und einem analytischen Fraktionensammler G1364C ausgestattet war. Zur Auftrennung wurde eine Trentec Reprosil® 100-5 C18-Säule (250 x 20 mm; 5 µm) bei Raumtemperatur verwendet. Das typische Injektionsvolumen betrug zwischen 100 – 250 µl und Chromatogramme wurden bei 257 nm verfolgt. Alle Lösungsmittelmischungen sind in (v/v)-Verhältnissen angegeben. Peaks wurden mit einem binären Lösungsmittelgradienten-System aus (A) H₂O / 0,1 % Ameisensäure und (B) MeCN eluiert. Dabei verlief der Lösungsmittelgradient wie folgt: 10 min 35 % Lösungsmittel B, dann 25 min 80 % Lösungsmittel B, dann wieder 20 min 35 % Lösungsmittel B. Eine zeitbasierte Peak-Fraktionierung wurde in 6 ml-Glasfläschchen durchgeführt. Produktfraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum abrotiert.

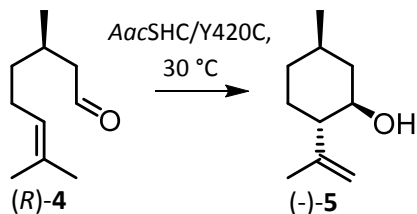
2.12 Analytische Biotransformation

Substrate für die analytischen Biotransformationen wurden standardmäßig als 200 mM-Lösung in DMSO präpariert. Squalen wurde vor der Verwendung als 10 mM Lösung in Reaktionspuffer (60 mM Natriumcitrat, pH 6,0) angesetzt und 10 min mittels Ultraschall emulgiert. Reaktionsansätze wurden typischerweise in 2 ml-Probengläsern (Rotilabo-Probengläser, Carl Roth, Karlsruhe, DE) im 500 µl-Maßstab mit 2 mM Substrat und 0,1 % bzw. 0,2 % Detergens in Citratpuffer durchgeführt. Das Detergens wurde abhängig von der verwendeten SHC bzw. dem eingesetzten Substrat gewählt, wobei typischerweise für Umsetzungen mit *ZmoSHC1*-Varianten CHAPS und für *AacSHC*-Varianten Triton X-100 benutzt wurde. Reaktionsansätze mit gereinigten *AacSHC*-Varianten (2.5.8.3) wurden unverdünnt in 0,2 % Triton X-100 und mit Enzymkonzentrationen von 5 – 10 mg/ml eingesetzt. Bei der direkten Verwendung von Solubilisaten wurden 50 µl dieser Enzympräparationen pro 500 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Standardmäßig wurden Reaktionen in Triplikaten und mit reinem Puffer als Negativkontrolle durchgeführt. Für Biotransformationen mit *AacSHC*-Varianten wurde außerdem die Knockout-Variante *AacSHC/D376C* für Kontrollexperimente genutzt. Reaktionsansätze wurden 20 h, 40 h oder 60 h bei 30 °C oder 50 °C und 600 UpM geschüttelt, wobei sich die Reaktionstemperatur nach der Substratstabilität im Reaktionspuffer richtete. Umsetzungen mit *ZmoSHC1*-Varianten wurden aufgrund dessen geringerer Stabilität ausschließlich bei 30 °C durchgeführt. Typischerweise wurden Biotransformationen abschließend zweimal für 40 sec mit je 350 µl Ethylacetat extrahiert, wobei 1 mM 1-Decanol (100 mM in DMSO) als externer Standard zugegeben wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und mittels Gaschromatographie (2.9) analysiert.

Zur Identifizierung entstandener Produkte wurden käufliche oder synthetisierte Referenzsubstanzen verwendet, die durch zusätzliches Einspritzen (Co-Injektion), über Retentionszeiten sowie das Massen-Fragmentierungsmuster an einem GC-FID/MS zugeordnet wurden. Für die Quantifizierung von Biotransformationen wurden Standardgeraden mit gereinigten Produktsubstanzen hergestellt. Zur Kontrolle wurden standardmäßig außerdem NMR-Messungen (2.10) mit isolierten Verbindungen durchgeführt.

2.13 Präparative Biotransformationen

2.13.1 Enzymatische Synthese von (-)-Isopulegol (-)-5

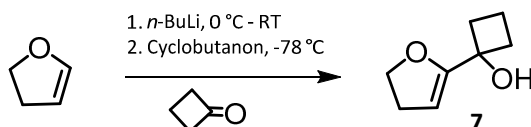


Analog zur typischen Expression im 500 ml-Maßstab (2.8.3) wurden 30 g eines *E. coli*-Zellpellets aus einer 10 l-Expression lysiert (2.8.4), solubilisiert (2.8.5) und mittels Ionenaustauschchromatographie über DEAE-Sephacel (2.8.5.3) gereinigt. Für die präparative Biotransformation zur Isolierung von (-)-5 wurde Enzymlösung mit 50 mg gereinigter Enzymvariante *AacSHC/Y420C* in Elutionspuffer und 200 mg (*R*)-Citronellal (*R*)-4 in einem Gesamtvolumen von 50 ml in einer Schott-Flasche bei 30 °C und 180 UpM für 4 d geschüttelt, wobei regelmäßig Proben zur Reaktionskontrolle entnommen wurden. Die Umsetzung wurde zweimal mit 1 mM 1-Decanol in Ethylacetat extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeeengt, säulenchromatographisch über Silicagel gereinigt (Cyclohexan : Ethylacetat 5:1) und gaschromatographisch (2.9) analysiert. (-)-5 wurde als farblose Flüssigkeit (53 mg, 27 % Ausbeute) mit einer Reinheit > 90 % erhalten.

2.14 Chemische Synthesen

Kommerziell nicht erhältliche Verbindungen wurden synthetisiert, um diese als Substrate für Biotransformationen, als Referenzsubstanzen oder zur Quantifizierung von Umsetzungen verwenden zu können. Nachfolgend sind alle für diese Arbeit relevanten Synthesevorschriften einschließlich Charakterisierung der erhaltenen Syntheseprodukte aufgelistet.

2.14.1 Darstellung von 1-(4,5-Dihydrofuran-2-yl)-cyclobutan-1-ol (7)



Unter Schutzgas-Atmosphäre wurde bei 0 °C innerhalb von 10 min tropfenweise *n*-BuLi (1.6 M in Hexan, 19.53 ml, 31.25 mmol, 1.25 eq) zu einer Lösung von 2,3-Dihydrofuran (2.63 g, 2.84 ml, 37.5 mmol, 1.5 eq) in 50 ml trockenem THF gegeben. Das Eisbad wurde entfernt, das Reaktionsgemisch für 6 h bei Raumtemperatur gerührt und dann auf -78 °C gekühlt. Innerhalb von 5 min wurde langsam Cyclobutanon (1.75 g, 1.87 ml, 25 mmol, 1.0 eq) zugegeben und die Reaktionslösung unter Rühren für 2 h auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 ml einer gesättigten NaHCO₃-Lösung abgefangen, die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit 50 ml Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen

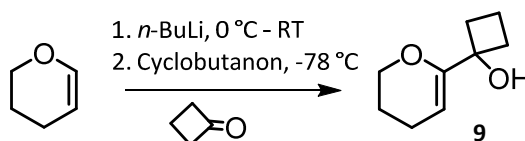
Phasen wurden mit 100 ml einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum aufkonzentriert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie auf neutralem Aluminiumoxid gereinigt (Cyclohexan : Ethylacetat 1:0 → 5:1) und lieferte **7** als leicht gelbes Öl (0.43 g, 12.3 %, Reinheit > 90 %).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.27 (s, 1H), 4.91-4.88 (m, 1H), 4.46-4.33 (m, 2H), 2.73-2.63 (m, 2H), 2.37-2.29 (m, 2H), 2.22-2.10 (m, 2H), 1.88-1.75 (m, 1H), 1.70-1.59 (m, 1H).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 160.6, 94.0, 72.0, 70.7, 34. (2C), 30.1, 12.9.

GC/MS (EI): m/z (%): 141 (60), 112 (100), 84 (64), 71 (98), 43 (81). Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.^[90]

2.14.2 Darstellung von 1-(3,4-Dihydro-2H-pyran-6-yl)cyclobutan-1-ol (**9**)



Innerhalb von 10 min wurde *n*-BuLi (1.6 M in Hexan, 19.53 ml, 31.25 mmol, 1.25 eq) bei 0 °C unter Inertgas-Atmosphäre zu einer Lösung aus 3,4-Dihydro-2H-pyran (3.15 g, 3.42 ml, 37.5 mmol, 1.5 eq) in 50 ml trockenem THF getropft. Das Eisbad wurde entfernt, das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur für 6 h weiter gerührt und dann auf -78 °C gekühlt. Innerhalb von 5 min wurde Cyclobutanon (1.75 g, 1.87 ml, 25 mmol, 1 eq) langsam dazugegeben, das Reaktionsgemisch wieder auf Raumtemperatur temperiert und anschließend für weitere 2 h gerührt. 50 ml einer gesättigten NaHCO₃-Lösung wurden hinzugegeben, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit 50 ml Et₂O extrahiert. Die vereinigte organische Fraktion wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde über neutrales Aluminiumoxid gereinigt (Cyclohexan : Ethylacetat 1:0 → 5:1) und lieferte **9** als gelbliches Öl (1.63 g, 42.3 %, Reinheit > 90 %).

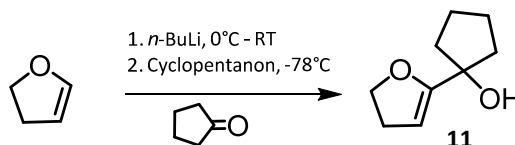
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.27 (s, 1H), 4.90 (t, *J*=3.84 Hz, 1H), 4.04 (t, *J*=5.16 Hz, 2H), 2.35-2.27 (m, 2H), 2.13-2.03 (m, 4H), 1.87-1.77 (m, 3H), 1.64-1.53 (m, 1H).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 155.6, 94.3, 75.1, 66.5, 33.9 (2C), 22.3, 19.9, 12.9.

GC/MS (EI): m/z (%): 154 (54), 126 (97), 98 (100), 83 (55), 55 (96), 43 (56).

Gemessene NMR-Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^{[91],[92]}

2.14.3 Darstellung von 1-(4,5-Dihydrofuran-2-yl)cyclopentan-1-ol (**11**)



Zu einer Lösung von 2,3-Dihydrofuran (2.63 g, 2.84 ml, 37.5 mmol, 1.5 eq) in 50 ml trockenem THF wurde bei 0 °C unter Schutzgas-Atmosphäre innerhalb von 10 min langsam *n*-BuLi (1.6 M in Hexan, 19.53 ml, 31.25 mmol, 1.25 eq) getropft. Das Eisbad wurde entfernt und die Lösung bei Raumtemperatur weitere 6 h gerührt.

Anschließend wurde auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und Cyclopentanon (2.1 g, 2.21 ml, 25 mmol, 1 eq) innerhalb von 5 min langsam zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur weitere 2 h gerührt. 50 ml einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung wurden hinzugegeben, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit 50 ml Et_2O extrahiert. Die vereinigte organische Fraktion wurde mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts über neutralem Aluminiumoxid (Cyclohexan : Ethylacetat 1:0 \rightarrow 5:1) lieferte **11** als hellgelbes Öl (0.89g , 23.1 %, Reinheit > 90 %).

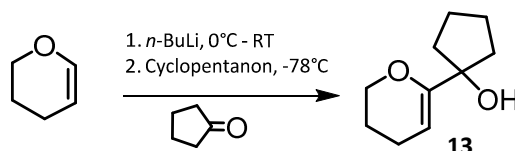
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.26 (s, 1H), 4.84-4.82 (m, 1H), 4.41-4.35 (m, 2H), 2.70-2.60 (m, 2H), 2.0-1.5 (m, 8H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 162.0, 93.1, 79.3, 70.5, 38.7 (2C), 30.0, 23.9 (2C).

GC/MS (EI): m/z (%): 154 (87), 135 (39), 125 (70), 97 (100), 67 (58), 55 (54).

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.^[90]

2.14.4 Darstellung von 1-(3,4-Dihydro-2H-pyran-6-yl)cyclopentan-1-ol (**13**)



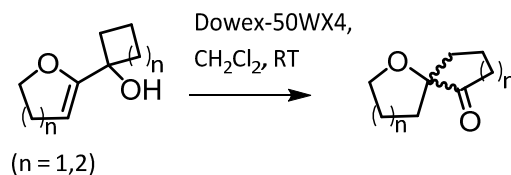
Unter Schutzgas-Atmosphäre wurde bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ innerhalb von 10 min *n*-BuLi (1.6 M in Hexan, 19.53 ml, 31.25 mmol, 1.25 eq) tropfenweise zu einer Lösung von 3,4-Dihydro-2H-pyran (3.15 g, 3.42 ml, 37.5 mmol, 1.5 eq) in 50 ml trockenem THF gegeben. Das Eisbad wurde entfernt, das Reaktionsgemisch für 6 h bei Raumtemperatur gerührt und dann auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiert. Innerhalb von 5 min wurde Cyclopentanone (2.1 g, 2.21 ml, 25 mmol, 1 eq) langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 2 h unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 ml einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung angefangen, die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit 50 ml Et_2O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 100 ml einer gesättigten NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Nach Reinigung des öligen, orangenen Rohprodukts mittels Säulenchromatographie über neutrales Aluminiumoxid (Cyclohexan : Ethylacetat 1:0 \rightarrow 3:1) wurde **13** als leicht gelbes Öl (1.57g, 37 %, Reinheit > 90 %) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.27 (s, 1H), 4.85 (t, $J=3.8$ Hz, 1H), 4.01 (t, $J=5.2$ Hz, 2H), 2.07-2.01 (m, 2H), 1.88-1.76 (m, 6H), 1.69-1.62 (m, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 157.1, 93.6, 82.1, 66.4, 38.2 (2C), 23.8, 22.4 (2C), 20.0.

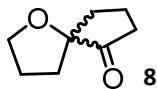
GC/MS (EI): m/z (%): 154 (38), 126 (74), 98 (100), 83 (41), 70 (36), 55 (73).

2.14.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Darstellung von Spiro-Verbindungen (AAV1)



Unter Schutzgas-Atmosphäre wurde das bicyclische Edukt in 25 ml trockenem Dichlormethan gelöst, eine Spatelspitze Dowex-50WX4 wurde zugegeben und die Reaktion wurde über Nacht (20 h) bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Aufkonzentrieren am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand säulenchromatographisch über neutrales Aluminiumoxid gereinigt (Cyclohexan : Ethylacetat 20:1 → 5:1). Verbindung **14** wurde mittels semipräparativer HPLC isoliert.

2.14.5.1 Darstellung von 1-Oxaspiro[4.4]nonan-6-on (**8**)



Gemäß **AAV1** wurde **7** (0.12 g, 0.86 mmol, 1 eq) zu **8** (0.11 g, 93 %, Reinheit > 99 %) umgesetzt.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.99-3.91 (m, 2H), 2.39-2.20 (m, 2H), 2.15-1.87 (m, 6H), 1.86-1.69 (m, 2H).

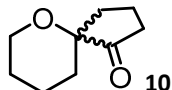
¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 218.7, 86.6, 69.1, 35.9, 35.3, 32.4, 26.0, 18.2.

GC/MS (EI) m/z (%): 140 (12), 112 (8), 84 (100), 56 (15), 42 (18).

IR (CDCl₃, cm⁻¹): 2961, 2872, 1743.

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.^[90]

2.14.5.2 Darstellung von 6-Oxaspiro[4.5]decan-1-on (**10**)



Gemäß **AAV1** wurde **9** (0.56 g, 3.63 mmol) zu **10** (0.46 g, 82.1 %, Reinheit > 99 %) umgesetzt.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.93-3.85 (m, 1H), 3.68-3.60 (m, 1H), 2.41-2.20 (m, 2H), 2.09-1.88 (m, 4H), 1.82-1.71 (m, 1H), 1.69-1.45 (m, 5H).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 217.1, 79.2, 63.9, 36.0, 34.8, 28.9, 25.5, 19.0, 17.5.

GC/MS (EI): m/z (%): 154 (12), 126 (15), 98 (100), 83 (16), 55 (12), 43(10).

IR (CDCl₃, cm⁻¹): 2937, 2866, 1734.

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.^[92]

2.14.5.3 Darstellung von 1-Oxaspiro[4.5]decan-6-on (**12**)



Gemäß **AAV1** wurde **11** (0.764 g, 4.95 mmol, 1 eq) zu **12** (257.9 mg, 33.8 %, Reinheit > 90 %) umgesetzt.

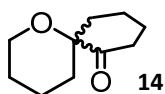
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.95-3.75 (m, 2H), 2.72-2.64 (m, 1H), 2.38-2.28 (m, 2H), 1.99-1.76 (m, 7H), 1.69-1.56 (m, 2H).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 210.9, 87.7, 68.3, 39.3 (2C), 32.3, 27.2, 25.5, 22.9.

GC/MS (EI) m/z (%) 154 (18), 97 (100), 84 (54), 55 (29), 56 (15).

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.^[90]

2.14.5.4 Darstellung von 1-Oxaspiro[5.5]undecan-7-on (**14**)



Gemäß **AAV1** wurde **13** (0.695 g, 4.13 mmol, 1 eq) umgesetzt, wodurch nach Reinigung über semipräparative HPLC **14** (7.8 mg, 1.1 %, Reinheit > 99 %) erhalten wurde.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.74-3.39 (m, 2H), 2.41-2.31 (m, 2H), 1.95-1.50 (m, 12H).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 208.1, 97.5, 60.5, 36.0, 29.5, 27.2, 25.5 (2C), 20.8.

GC/MS (EI): m/z (%): 168 (M⁺, 16), 140 (8), 111 (68), 98 (100), 55 (38).

III ERGEBNISSE

3.1 Herstellung und Reinigung von *ZmoSHC1*-Varianten für die Kristallstrukturaufklärung

3.1.1 Zur Notwendigkeit der Kristallstrukturaufklärung von *ZmoSHC1*

Zymomonas mobilis besitzt zwei Squalen-Hopen Cyclasen, *ZmoSHC1* (UniProtKB: Q5NM88) und *ZmoSHC2* (UniProtKB: P33990), die bis dato vergleichsweise wenig untersucht sind. In vorherigen Arbeiten konnte bisher gezeigt werden, dass es sich bei *ZmoSHC1* um eine Cyclase handelt, die im Gegensatz zu *AacSHC* eine vergleichsweise geringe Aktivität gegenüber größeren Terpenen (wie Squalen) besitzt, allerdings besonders gut für kleinere Terpensubstrate geeignet zu sein scheint.^{[60],[75]} Aufgrund dieser vielversprechenden Cyclisierungsaktivität von Monoterpenen bietet sich *ZmoSHC1* für die Untersuchung solcher Umsetzungen besonders an. Um das Substrat- und Produktspektrum dieser Cyclase genauer zu untersuchen und weiter auszubauen, ist Protein-Engineering sinnvoll. Basierend auf der Kristallstruktur der *AacSHC*, die bereits 1997 aufgeklärt wurde,^[40] sowie Sequenzvergleichen zwischen *AacSHC* und *ZmoSHC1* war an diesem Institut bereits ein Homologiemodell für *ZmoSHC1* erstellt worden (s. 1.3.2, Abb. 1.5). Dieses Homologiemodell weist N-terminal einen langen, unstrukturierten, überhängenden Bereich mit noch nicht geklärter Funktion auf. Aminosäuresequenzvergleiche zwischen *ZmoSHC1* und anderen SHCs zeigten außerdem, dass *ZmoSHC1* C-terminal eine spezielle Loop-Region besitzt, welche aus den Aminosäuren 671 bis 691 aufgebaut wird und nahe des Eingangs zur aktiven Tasche lokalisiert ist. Ein vergleichbares Strukturelement existiert weder in *AacSHC* noch in *ZmoSHC2*.

Ergänzend zu dem bereits vorhandenen *sequenzbasierten* Homologiemodell wurde in vorliegender Arbeit außerdem ein *strukturbasiertes* Modell der *ZmoSHC1* erstellt: Mit Hilfe der 3DM-Datenbank,^[93] welche vom Projektpartner Bio-Product zur Verfügung gestellt wurde, wurden multiple Sequenz- und Strukturvergleiche von über 400 Mitgliedern der SHC- sowie Terpen-Synthase-Superfamilie durchgeführt. In dieses Set war die Sequenz der *ZmoSHC1* inbegriffen. Darauf aufbauend konnte so eine Grundstruktur bestimmt werden, die für die untersuchten Mitglieder dieser Superfamilie gemeinsam war. Eine Abbildung dieses Modells ist in Abb. 3.1 gezeigt. Ein klarer Vorteil dieses Modells war das Zugrundeliegen von Strukturdaten - allerdings konnten dadurch strukturell abweichende und variable Bereiche im Modell nicht berücksichtigt werden.

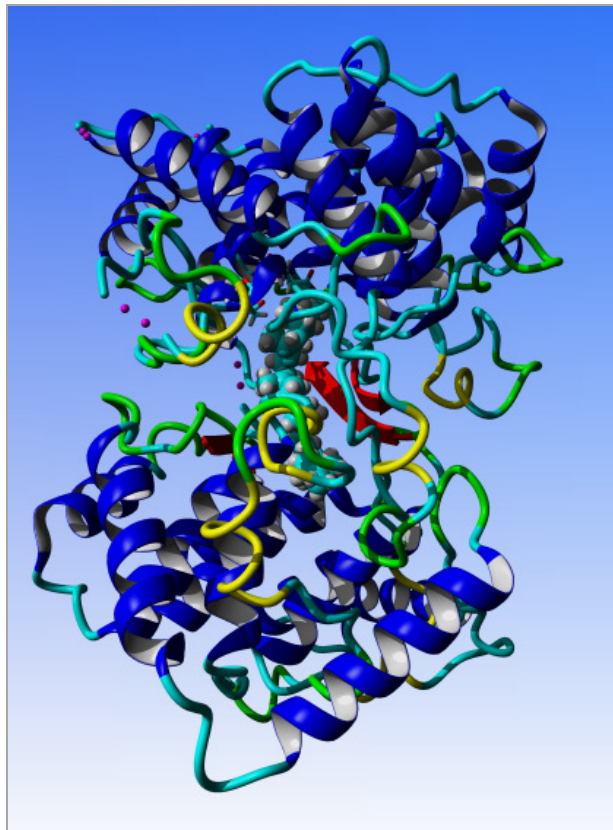


Abbildung 3.1: Das mit Hilfe der 3DM-Technologie erstellte Homologiemodell für *ZmoSHC1*, dargestellt mittels YASARA.^[94] Azasqualen (als Kalottenmodell gezeigt) in der aktiven Tasche der Struktur imitiert das natürliche Substrat Squalen.

Um Unklarheiten bzgl. Gestalt und strukturellem Aufbau der *ZmoSHC1* weiter zu untersuchen, sollte daher die Kristallstruktur dieses Membranproteins aufgeklärt werden. Diese könnte dann als idealer Startpunkt für spätere (semi-)rationale Mutagenesestudien dienen. Ebenfalls könnte *ZmoSHC1* damit zielführender hinsichtlich der Umsetzung kleiner terpenoide Substrate verbessert und so bspw. für die Cyclisierung von Citronellal zu Isopulegol optimiert werden. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte daher ein Protokoll zur Reinigung der *ZmoSHC1* für nachfolgende Kristallisierungsstudien erstellt werden.

3.1.2 Das Design der *ZmoSHC1*-Deletionsmutanten für die Kristallisierung

Da Proteine mit frei beweglichen Bereichen eine homogene Proteinpäckung während der Kristallbildung mit hoher Wahrscheinlichkeit behindern, ist es in der Regel schwierig, symmetrische Kristalle und damit hoch aufgelöste Kristallstrukturen solcher Proteine zu erhalten.^{[76],[77]} *ZmoSHC1* besitzt N-terminal einen solchen unstrukturierten Überhang, welcher zu Schwierigkeiten während des Kristallisierungsvorganges führen könnte. Um dem entgegen zu wirken, wurden einige N-terminal verkürzte Varianten dieser Cyclase erstellt: Für Variante *ZmoSHC1_d1-58* wurde die Position eines, in der annotierten Aminosäuresequenz vorkommenden Methionins zu Beginn des Überhangs als neuer N-Terminus genutzt (Abb. 3.2 A). Für *ZmoSHC1_d1-27* wurde der N-

terminale Überhäng um die Hälfte verkürzt. Sequenzalignments von *ZmoSHC1* und *AacSHC* zeigten weiterhin, dass der N-terminale Bereich der *ZmoSHC1* jenen der *AacSHC* auf der Sequenzebene um 65 Aminosäuren überragt (s. Abb. 3.2 B). Daher wurde dieser Bereich in *ZmoSHC1_d1-65* ebenfalls deletiert. Um außerdem den Einfluss der zuvor genannten Loop-Region auf die Funktion der *ZmoSHC1* zu untersuchen, wurde eine Mutante generiert, der diese Loop-Region fehlte (*ZmoSHC1_d671-696*). Eine schematische Übersicht über die generierten Deletionsmutanten ist in Abb. 3.2 C gegeben.

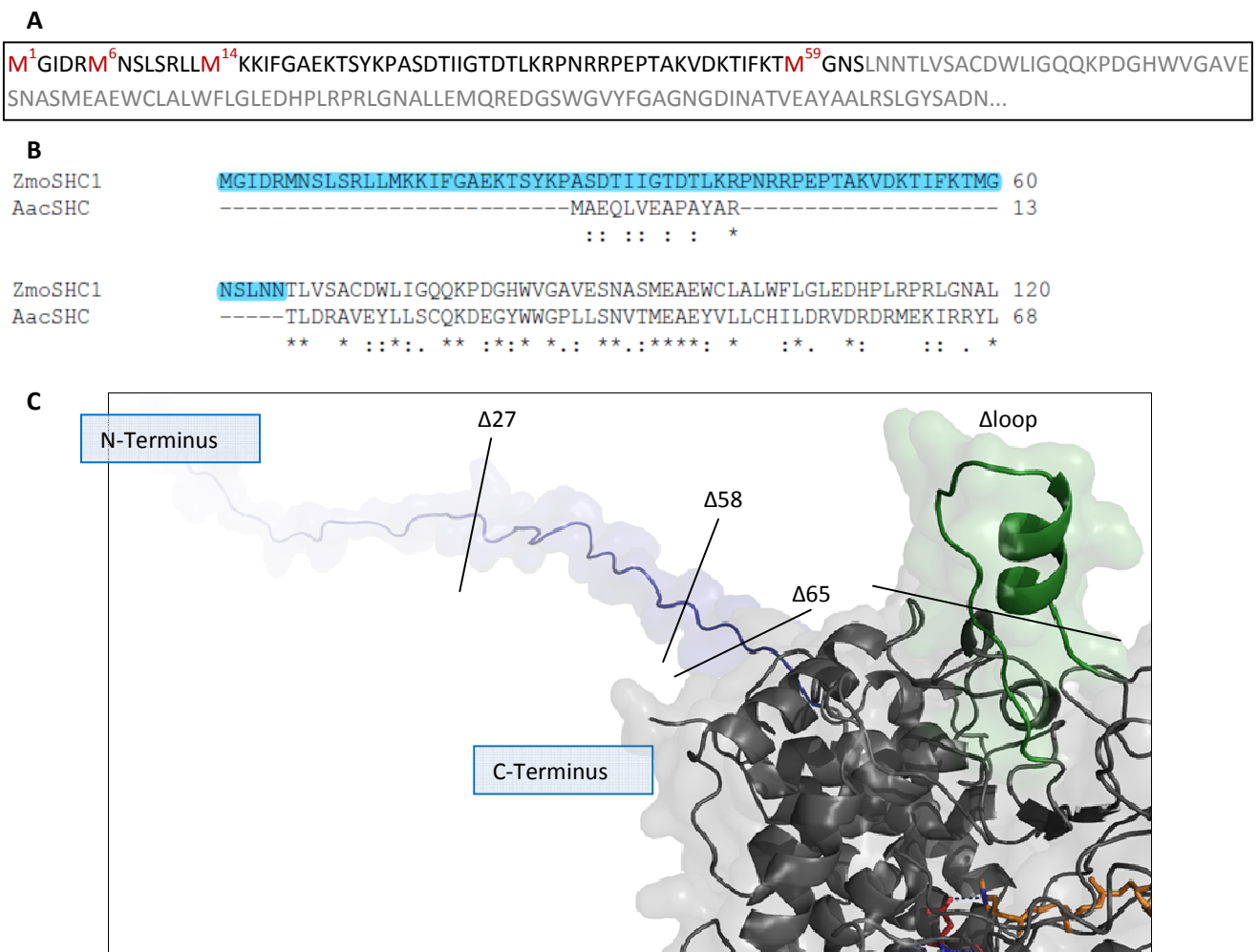


Abbildung 3.2: **A:** Positionen der Methionine (rot) in der Aminosäuresequenz des unstrukturierten Überhanges (schwarz) im N-terminalen Bereich des *ZmoSHC1*-Wildtyps. Hochgestellt: Nummerierung der Aminosäuren beginnend am N-Terminus. Grau: Beginn des strukturierten Bereiches im Homologiemodell. **B:** Sequenzalignments von *AacSHC* mit *ZmoSHC1* (über Clustal Omega^[95]) indizieren einen überhängenden Bereich in *ZmoSHC1* (hellblau gekennzeichnet) mit einer Länge von 65 Aminosäuren. **C:** Homologiemodell der *ZmoSHC1*. Der N-terminale Überhang ist blau hervorgehoben; Deletionen in diesem Bereich sind schematisch als Striche angedeutet. Die entsprechenden Mutanten sind wie folgt indiziert: $\Delta 27$: *ZmoSHC1_d1-27*. $\Delta 58$: *ZmoSHC1_d1-58*. $\Delta 65$: *ZmoSHC1_d1-65*. Δloop : *ZmoSHC1_d671-696*. Für die Proteinreinigung über IMAC wurde jede Variante C-terminal mit einem His₆-Tag versehen.

Anhand dieser Deletionen sollten nachfolgend nicht nur die Möglichkeit für eine erleichterte Kristallisierung geschaffen, sondern vielmehr auch Einflüsse dieser verschiedenen strukturellen Faktoren der *ZmoSHC1* untersucht werden. Da zur Effizienzsteigerung des Proteinanreicherungsschrittes der Reinigung Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) durchgeführt werden sollte, wurde jede der *ZmoSHC1*-Varianten außerdem mit einem C-terminalen His₆-Tag versehen. Versuche mit N-terminalen Polyhistidin-Tags, verlängerten (His₁₀)-Tags sowie verschiedenen, zwischen Zielprotein und Aminosäure-Tag eingefügten Proteaseschnittstellen wurden ebenfalls im Zuge dieser Arbeit durchgeführt, sind nachfolgend allerdings nicht aufgeführt, da dadurch keine Verbesserung des Reinigungsprozesses erzielt werden konnte.

3.1.3 Klonierung der *ZmoSHC1*-Varianten

Zur Amplifizierung des *ZmoSHC1*-Wildtyp-Gens wurde eine *E. coli*-BL21(DE3)-Dauerkultur über Nacht kultiviert, die mit einem pET-22b-Plasmidkonstrukt (2.3, pITB0280) transformiert war, welches das gewünschte Gen enthielt. Die Plasmid-DNA wurde isoliert (2.7.3), sequenziert (2.7.5), in kompetente *E. coli* XL1-Blue transformiert (2.7.11), vermehrt und gereinigt. Für die ortsgerichtete Mutagenese der Varianten *ZmoSHC1*_d1-27, *ZmoSHC1*_d1-58 und *ZmoSHC1*_d1-65 wurde die Polymerasekettenreaktion (2.7.1) unter Verwendung verschiedener Primer (2.2.1) durchgeführt, die so modifiziert waren, dass sie an ihren 5'-Enden überhängende Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Nde*I bzw. *Hind*III enthielten. PCR-Produkte wurden gereinigt, auf einem 0,7 % Agarosegel kontrolliert (s. Abb. A.1) und für die Klonierung in den Expressionsvektor pET-22b sequentiell mit *Nde*I und *Hind*III verdaut (2.7.8). DNA-Fragmente der *ZmoSHC1*-Varianten wurden nach dem Restriktionsverdau jeweils erneut gereinigt. Zur Reinigung des zweifach geschnittenen Vektors pET-22b/*Nde*I/*Hind*III wurde dieser über Agarosegelelektrophorese (2.7.6) aufgetrennt (s. Abb. 3.3) und aus dem Agarosegel extrahiert (2.7.7).

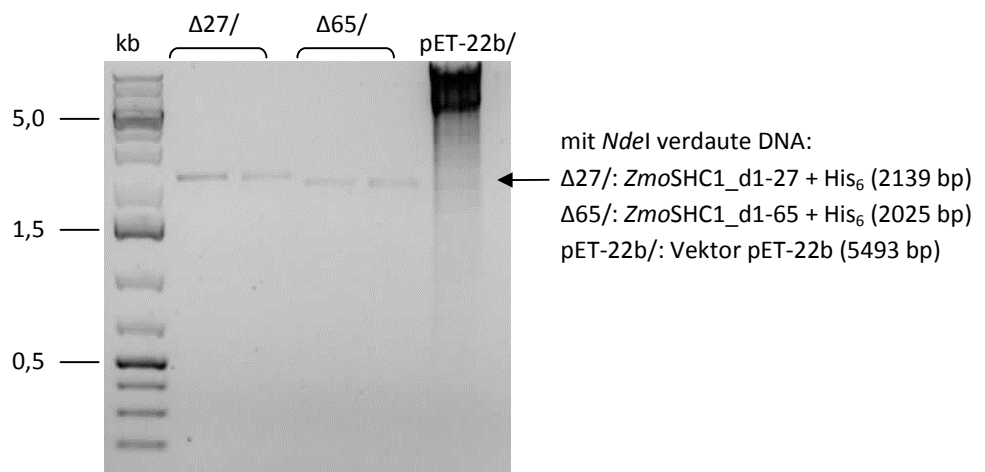


Abbildung 3.3: Agarosegel (0,7 %) zur Kontrolle von PCR-Produkten und Plasmidvektor pET-22b nach dem Restriktionsverdau mit *Nde*I. kb : GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Markierte DNA-Banden im Bereich über 2000 bp bzw. über 5000 bp entsprechen den Größen der verdauten *ZmoSHC1*-DNA bzw. des linearen Vektors pET-22b/*Nde*I.

Nach Isolation und Reinigung wurde der Vektor pET-22b/*Nde*I/*Hind*III in einem Ligationansatz (2.7.9) mit Genfragmenten der verdauten *Zmo*SHC1-Varianten zu den entsprechenden Plasmidkonstrukten (2.3, Tab. 2.4, pITB1333 - pITB1335) ligiert, in *E. coli* XL1-Blue transformiert und die korrekte Ligation durch Sequenzierung validiert. Variante *Zmo*SHC1_d671-696 wurde mittels Deletion durch eine QuikChange-Reaktion (2.7.2) generiert, in *E. coli* XL1-Blue transformiert und mutierte DNA wurde isoliert und sequenziert. Korrekte Plasmid-DNA wurde sowohl in isolierter Form bei -20 °C als auch in Form von *E. coli*-Dauerkulturen (2.8.2) gelagert.

3.1.4 Studien zur Expression der *Zmo*SHC1-Varianten in *E. coli*

Um die Biosynthese einer ausreichenden Menge an *Zmo*SHC1-Varianten in löslicher und aktiver Form gewährleisten zu können, wurden zunächst die Expressionsbedingungen in *E. coli* optimiert. Dazu wurden die Stämme *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* C43(DE3) für eine Expressionsstudie mit den entsprechenden *Zmo*SHC-Varianten transformiert und im 200 ml-Maßstab bei 30 °C kultiviert, wobei die Proteinüberexpression (2.8.3) durch Zugabe von 0,2 mM IPTG induziert und nach 4 h bzw. 6 h beendet wurde. Expressionsstudien mit dem Leervektor (pET-22b) dienten hierbei als Negativkontrolle. Im Verlauf der Expression wurden stündlich Proben aus der Zellkultur entnommen. Zur Beendigung der Expression wurden die Zellen zentrifugiert, lysiert (2.8.4) und die erhaltenen Zellpellets solubilisiert (2.8.5). Anschließend wurden Proben der Expression sowie des Zellaufschlusses und der Solubilisierung mittels SDS-PAGE (2.8.7) analysiert und verglichen. Ergänzende Polyacrylamidgele zur Proteinbiosynthese sind in Abb. A.2. und Abb. A.3 gezeigt; Untersuchungen der Proteinlöslichkeit sind in Abb. 3.4 und Abb. 3.5 abgebildet. Die Proteinbanden auf Höhe der *Zmo*SHC1-Varianten sind dabei durch einen Pfeil gekennzeichnet.

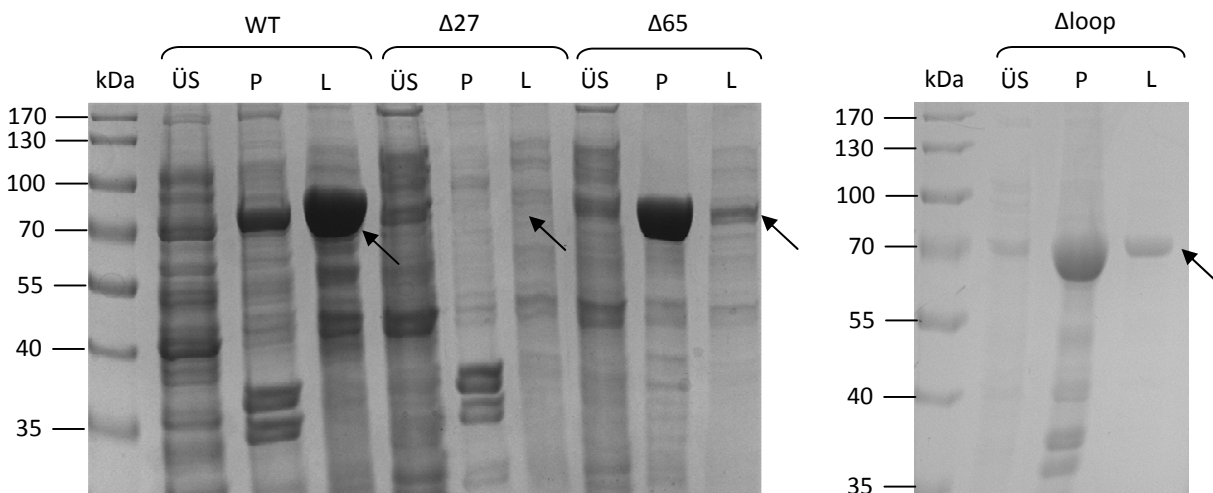


Abbildung 3.4: Coomassie-gefärbte Polyacrylamidgele (10 %) zur Analyse der Löslichkeit der Proteine aus der Überexpression in *E. coli* BL21(DE3) nach Zellaufschluss und Solubilisierung. Pfeile: Proteinbanden auf Höhe der *Zmo*SHC1-Varianten. kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. ÜS: Überstand aus dem Zellaufschluss. P, L: Pellet- / Lysat-Probe nach der Solubilisierung. WT: *Zmo*SHC1 Wildtyp+His₆ (MW: 83,2 kDa). Δ27: *Zmo*SHC1_d1-27+His₆ (MW: 80,2 kDa). Δ65: *Zmo*SHC1_d1-65+His₆ (MW: 76 kDa). Δloop: *Zmo*SHC1_d671-696+His₆ (MW: 80,4 kDa).

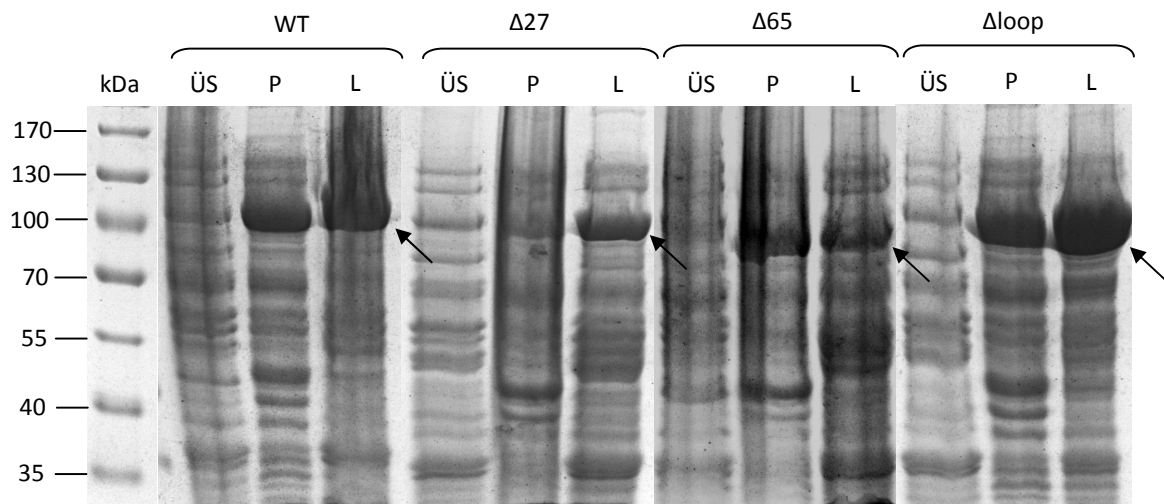


Abbildung 3.5: Coomassie-gefärbte Polyacrylamidgele (10 %) zur Analyse der Löslichkeit der Proteine aus der Überexpression in *E. coli* C43(DE3) nach Zellaufschluss und Solubilisierung. Pfeile: Proteinbanden auf Höhe der *ZmoSHC1*-Varianten. kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. ÜS: Überstand aus dem Zellaufschluss. P L: Pellet- / Lysat-Probe nach der Solubilisierung. WT: *ZmoSHC1* Wildtyp+His₆ (MW: 83,2 kDa). Δ27: *ZmoSHC1*_d1-27+His₆ (MW: 80,2 kDa). Δ65: *ZmoSHC1*_d1-65+His₆ (MW: 76 kDa). Δloop: *ZmoSHC1*_d671-696+His₆ (MW: 80,4 kDa).

Ein Vergleich der Polyacrylamidgele zur Expressionsstudie und des Solubilisierungsschrittes ergab, dass eine Überexpression in *E. coli* C43(DE3) im Falle aller *ZmoSHC1*-Varianten signifikant mehr lösliches Protein lieferte (s. Abb. 3.5). Durch die Überexpression in *E. coli* BL21(DE3) konnte hingegen nur das Wildtyp-Enzym in ausreichender Menge als lösliches Protein erhalten werden (s. Abb. 3.4); Variante *ZmoSHC1*_d1-27 wurde nur geringfügig exprimiert und Varianten *ZmoSHC1*_d1-65 sowie *ZmoSHC1*_d671-696 waren größtenteils als unlösliche Aggregate pelletiert. Zusätzlich zur Untersuchung der Menge an löslichem Protein wurde die Aktivität dieser *ZmoSHC1*-Varianten getestet. Hierfür wurden sowohl Geranylacetone als auch Squalen als Substrate für analytische Biotransformationen (2.12) verwendet und diese mittels Gaschromatographie (2.9) analysiert. Dieser Aktivitätstest ergab, dass von den *ZmoSHC1*-Varianten, welche in *E. coli* BL21(DE3) hergestellt wurden, nur das Wildtyp-Enzym aktiv war - *ZmoSHC1*_d1-27, *ZmoSHC1*_d1-65 sowie *ZmoSHC1*_d671-696 zeigten keinerlei Aktivität gegenüber den getesteten Substraten. Im Gegensatz dazu wiesen alle in *E. coli* C43(DE3) produzierten Enzyme gegenüber beiden Substraten Aktivität auf. Da sowohl Proteinbiosynthese und Löslichkeit der *ZmoSHC1*-Varianten als auch deren Aktivität gegenüber den getesteten Substraten im Falle der Überexpression in *E. coli* C43(DE3) zufriedenstellendere Ergebnisse lieferte, wurde dieses Expressionssystem für alle nachfolgenden Proteinbiosynthesen der *ZmoSHC1*-Varianten verwendet.

3.1.5 Reinigung und Charakterisierung der *ZmoSHC1*-Varianten

3.1.5.1 Anreicherung und Reinigung über Metallionen-Affinitätschromatographie

Die Solubilisate der *ZmoSHC1*-Varianten wurden an einem ÄKTA Explorer-FPLC-System über Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) an einer HisTrap FF-Säule gereinigt (2.8.5.2.1). Zur Komplexierung der getaggtten Zielproteine hatte sich im Vorversuch Ni^{2+} gegenüber Co^{2+} als effektiveres Metallion erwiesen, weshalb für alle folgenden IMAC-Läufe Nickel(II)ionen eingesetzt wurden. Nach Vorversuchen unter Verwendung eines linearen Imidazolgradienten wurde ein Stufengradient für die optimierte Elution der Zielproteine entwickelt. Ergänzend zum Einsatz eines Stufengradienten wurde die Bindekapazität der His₆-getaggtten Proteine an das Säulenmaterial zusätzlich durch eine reduzierte Fließgeschwindigkeit (0,5 ml/min) während der Injektion optimiert. Für eine gezieltere, sauberere Trennung während des Elutionsprozesses wurde die Flussrate bei 1 ml/min gehalten. Die verwendeten Methoden sind in 2.8.5.2.1 genauer aufgelistet. Der Proteingehalt während eines IMAC-Laufes wurde durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm verfolgt. Fraktionen detektierter Signale (Peaks) wurden vereinigt und über Nacht bei 4 °C gegen Kaliumphosphatpuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 mit 0,5 % (w/v) CHAPS) dialysiert, durch SDS-Polyacrylamidgel-elektrophorese (2.8.7), kolloidale Coomassie-Färbung (2.8.8) analysiert und die detektierten Peaks mittels Western Blot mit spezifischem Antikörpernachweis (2.8.9) identifiziert. Nachfolgend sind einige Chromatogramme aus IMAC-Läufen der unterschiedlichen *ZmoSHC1*-Varianten zusammen mit den entsprechenden Polyacrylamidgelen aufgeführt. Chromatogramm und Polyacrylamidgel zur Reinigung des *ZmoSHC1*-Wildtyps mittels IMAC sind in Abb. 3.6 und Abb. 3.7 wiedergegeben:

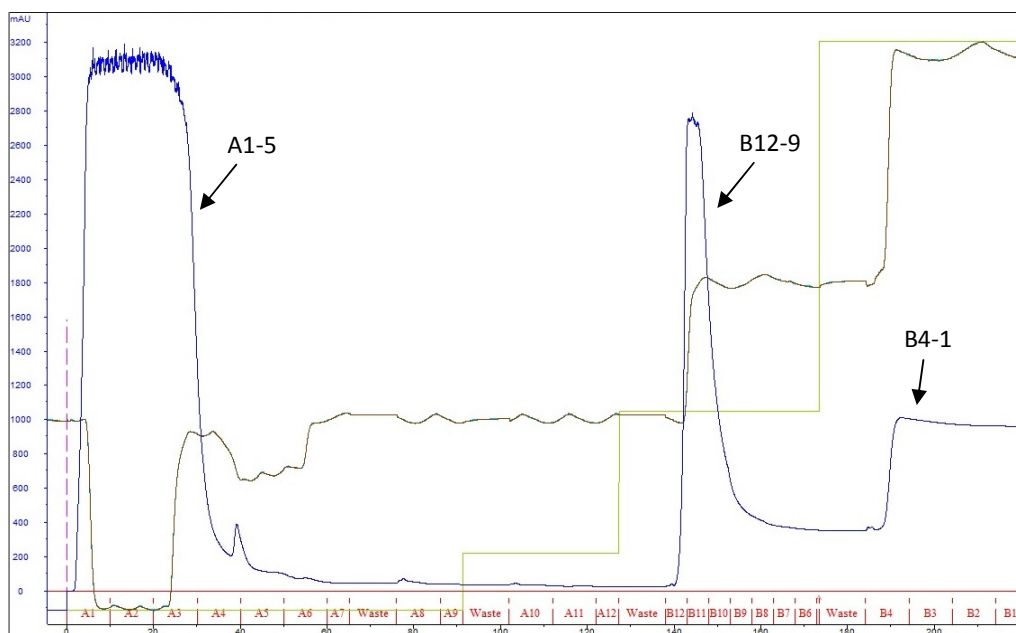


Abbildung 3.6: Chromatogramm zur Reinigung von *ZmoSHC1*-Wildtyp mittels IMAC an einer HisTrap FF-Säule. Blau: UV-Absorption bei 280 nm [mAU]. Grün: Stufengradient mit 0 % Puffer B (0 mM Imidazol), 10 % Puffer B (50 mM Imidazol), 35 % Puffer B (175 mM Imidazol), 100 % Puffer B (500 mM Imidazol). Rot: Fraktionen. Pfeil: Signale eluierter Proteinfractionen (s. Abb. 3.7).

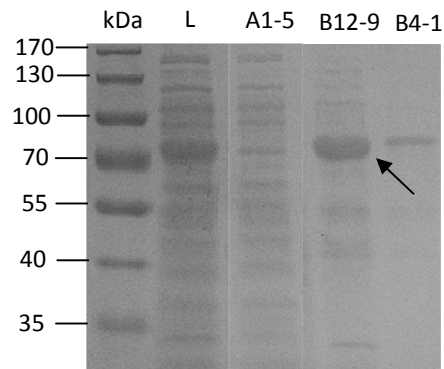


Abbildung 3.7: Polyacrylamidgel (10 %) zur Reinigung von *ZmoSHC1*-Wildtyp mittels IMAC. Anfärbung des Gels mittels sensitiver kolloidaler Commassie-Färbung. kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. L: Lysat-Probe nach der Solubilisierung. A4-1 bis B4-1: vereinigte Fraktionen detektierter Signale (s. Abb. 3.6). Pfeil: Proteinbande auf Höhe des Zielproteins *ZmoSHC1* Wildtyp+His₆ (MW: 83,2 kDa).

Chromatogramme und Polyacrylamidgele zur Reinigung von *ZmoSHC1*_d1-27, *ZmoSHC1*_d1-58 und *ZmoSHC1*_d1-65 mittels IMAC sind im Anhang abgebildet (s. Abb. A.4 bis Abb. A.9).

3.1.5.2 Untersuchungen zur Proteinstabilität gereinigter *ZmoSHC1*-Varianten

Die Stabilität gereinigter Enzympräparationen wurde durch visuelle Analyse von gebildetem Präzipitat während und nach verschiedenen Lagerungsbedingungen verfolgt. Dabei wurde festgestellt, dass die *ZmoSHC1*-Varianten während der Lagerung bei 4 °C relativ stabil blieben, v.a. wenn die Lagerung als verdünnte Lösung erfolgte. Konzentriertere Proteinlösungen neigten sehr schnell zur Präzipitation. Vor allem die N-terminal verkürzten Varianten *ZmoSHC1_d1-27*, *ZmoSHC1_d1-58* und *ZmoSHC1_d1-65* waren im Vergleich zum Wildtyp-Enzym deutlich stabiler, während für letzteres ein signifikant früheres und stärkeres Denaturieren beobachtet werden konnte. Dadurch kam es zwischen den einzelnen Schritten im Verlauf des Reinigungsprozesses zum Verlust von nicht unerheblichen Mengen an *ZmoSHC1*-Wildtyp (s. Abb. 3.8). Für die Deletionsvarianten *ZmoSHC1_d1-27*, *ZmoSHC1_d1-58* und *ZmoSHC1_d1-65* war dies nicht derart der Fall, wobei hier die Konzentrationen an gelöstem Protein im Vergleich zu den Wildtyp-Präparationen auch niedriger waren.

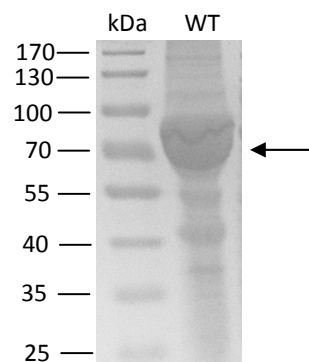


Abbildung 3.8: Polyacrylamidgel (10 %) zur Stabilität gereinigter *ZmoSHC1*-Wildtyp-Lösung (WT). kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. WT: Präzipitat aus IMAC-Fraktionen B12-9 (s. Abb. 3.6) nach Lagerung bei 4 °C über Nacht.

3.1.5.3 Verfeinerung der Proteinreinigung über Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

Zur feineren Auftrennung der *ZmoSHC1*-Fraktionen aus der IMAC (3.1.5.1) in oligomere Bestandteile wurde Größenausschluss-Chromatographie (SEC) über eine mit Sephacryl S-200 gepackte XK 26/100-Säule an einem ÄKTA Purifier-FPLC-System durchgeführt. Geringe Probenvolumina wurden verwendet, um scharfe Signale, d.h. eine möglichst saubere Auftrennung zu erhalten. Gegebenenfalls wurden Proteinlösungen dazu mittels Ultrafiltration auf < 1 % des Säulenvolumens aufkonzentriert. Durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm wurde die Proteinelution während eines SEC-Laufs verfolgt. Zur Abschätzung der Reinheit der Eluate wurden Polyacrylamidgele nach der SDS-PAGE (2.8.7) mittels sensitiver kolloidaler Coomassie-Färbung (2.8.8) angefärbt. Parallel durchgeführte Western Blots mit Anti-Polyhistidin-Antikörpernachweis (2.8.9) dienten zur Proteinidentifizierung. Nachfolgend ist exemplarisch ein Western Blot mit Immundetektion zur Identifizierung von *ZmoSHC1_d1-58* gezeigt (Abb. 3.11, rechts). Die Abschätzung tatsächlicher (nativer) Größen eluierter Proteine erfolgte anhand einer zuvor analysierten Mischung unterschiedlicher Referenzproteine (s. Abb. 3.9).

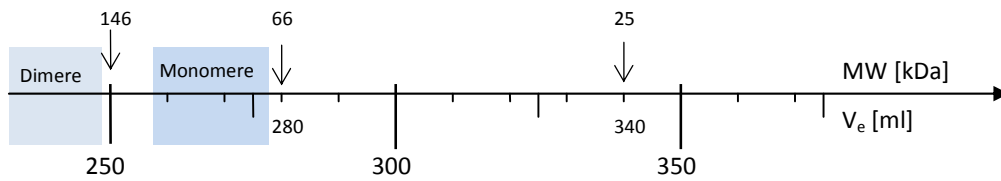


Abbildung 3.9: Größenabschätzung detektierter Proteinsignale der SEC. MW: Molekulargewicht. V_e : Elutionsvolumen.

Die Molekulargewichte der SHCs variierten im Bereich um 76 – 83 kDa (für die Monomere) bzw. 152 – 166 kDa (Dimere), was mit einem Elutionsvolumen (V_e) < 250 ml (Dimer) bzw. > 250 ml (Monomer) korrelierte. Nachfolgend ist exemplarisch das Chromatogramm des SEC-Laufs von *ZmoSHC1_d1-58* (Abb. 3.10) zusammen mit der Aufnahme des entsprechenden Polyacrylamidgels (Abb. 3.11) gezeigt. Für die SEC von *ZmoSHC1_d1-58* wurden die Fraktionen B10-8 des vorangegangenen IMAC-Laufes injiziert (Abb. A.6 und Abb. A.7). Einzelne Signale sind den entsprechenden Molekulargewichtsbereichen zugeordnet. SEC-Chromatogramme und entsprechende Polyacrylamidgelle von *ZmoSHC1*-Wildtyp, *ZmoSHC1_d1-27* und *ZmoSHC1_d1-65* sind im Anhang unter A.3.2 abgebildet (s. Abb. A.10 bis Abb. A.15).

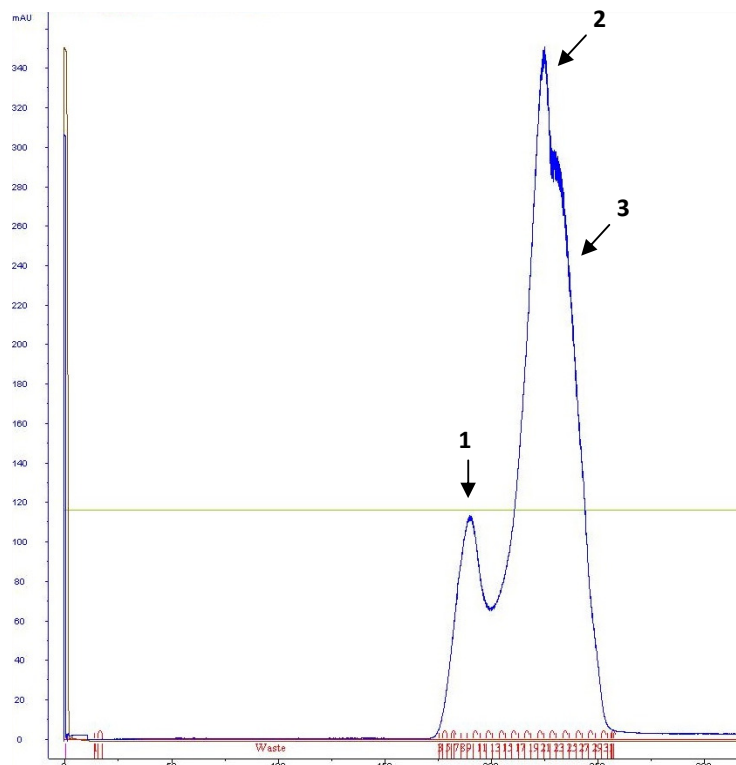


Abbildung 3.10: Chromatogramm zur Reinigung von *ZmoSHC1_d1-58* mittels SEC an einer XK 26/100-Säule. Blau: UV-Absorption bei 280 nm [mAU]. Rot: Fraktionen. Pfeil: Signale der Proteinfractionen (s. a. Abb. 3.11) bei einem Elutionsvolumen V_e zwischen (1) 170 – 200 ml, (2) 200 – 227 ml und (3) 227 – 255 ml liegen im Größenbereich des Dimers (153,2 kDa) der Variante.

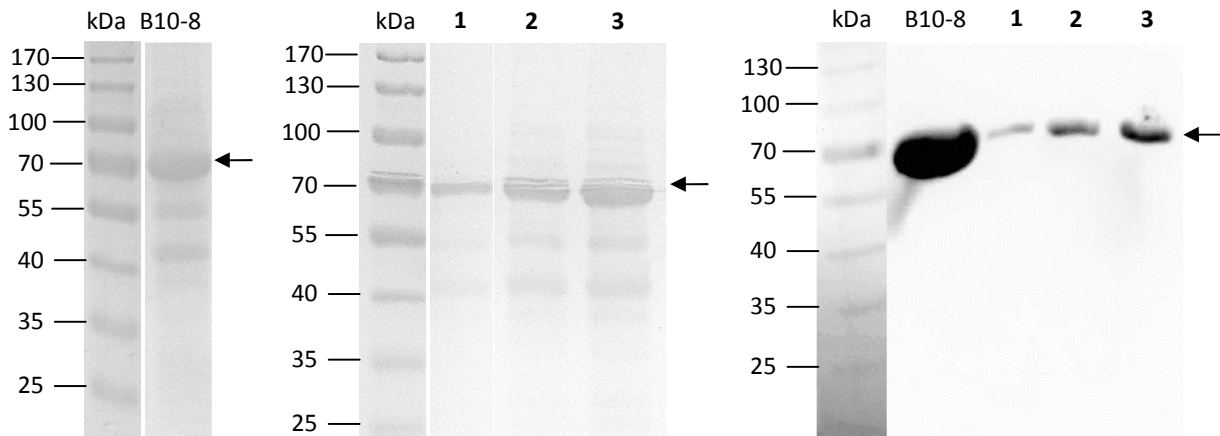


Abbildung 3.11: Links: Polyacrylamidgel (10 %) zur Reinigung von *ZmoSHC1*_d1-58 mittels SEC. Anfärbung der Gele mittels sensitiver kolloidaler Coomassie-Färbung. kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. Links: B10-8: Eluat des vorangegangenen IMAC-Laufes, welches mittels SEC aufgetrennt wurde. Mitte: **1-3:** Fraktionen detektierter Signale des SEC-Laufes (s. Abb. 3.10). Rechts: Chemolumineszenz-Aufnahme des entspr. Anti-Polyhistidin-Antikörpernachweises (Farben der ECL-Aufnahme sind invertiert). Pfeil: Proteinbande auf Höhe des Zielproteins.

Die durch die SEC weiter in ihre Bestandteile aufgetrennten IMAC-Fractionen enthielten für alle Enzymvarianten Mischungen unterschiedlicher Anteile verschiedener oligomerer Formen mit Reinheiten > 95 %. Gemäß Gelfiltrationsstandard stellten dabei im Falle der *ZmoSHC1*-Deletionsmutanten v.a. die entsprechenden Dimere den klar überwiegenden Hauptbestandteil dar; für die entsprechenden Monomere konnten höchstens schwache Signale im entsprechenden Größenbereich detektiert werden. Einzig für den *ZmoSHC1*-Wildtyp wurden drei vergleichbar hohe Signale für unterschiedliche Proteingrößen detektiert. Proteinkonzentrationen wurden über das Verfahren nach Bradford (2.8.6) bestimmt und so die entsprechenden Ausbeuten berechnet. Eine zusammenfassende Übersicht zur Reinigung über IMAC und SEC ist in Tabelle 3.1 gegeben.

Tabelle 3.1: Ausbeute gereinigter *ZmoSHC1*-Varianten aus 42,7 g Zellmasse nach IMAC und SEC.

<i>ZmoSHC1</i> -Variante	Ausbeute nach IMAC [mg]	Oligomer	Ausbeute nach SEC [mg]
Wildtyp	4,29	Monomer	0,44
		Dimer	0,79
<i>ZmoSHC1</i> _d1-27	0,95	Monomer	0,12
		Dimer	0,26
<i>ZmoSHC1</i> _d1-58	6,82	Dimer	1,60
<i>ZmoSHC1</i> _d1-65	3,70	Monomer	0,17
		Dimer	0,28

Dialysierte Enzymlösungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb des Proteinreinigungsprozesses in Biotransformationen mit Geranylaceton und Squalen hinsichtlich ihrer Funktionalität untersucht. Nach der Reinigung über IMAC und SEC wurde für alle der Enzympräparationen ein dramatischer bis vollständiger Verlust der Enzymaktivität gegenüber diesen Substraten festgestellt. Für die geplanten Kristallisationsstudien wurde das entwickelte Reinigungsprotokoll zusammen mit der modifizierten DNA der *ZmoSHC1*-Varianten an die Kooperationspartner (Dr. A.M.W.H. Thunnissen, Laboratory of Biophysical Chemistry, RUG, Groningen, Niederlande) übergeben. Bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit konnten erste Proteinkristalle erhalten und Röntgenbeugungsmessungen durchgeführt werden (Daten nicht gezeigt) - allerdings bedarf es noch weiterer Optimierungen, um eine bessere Auflösung der Kristallstruktur zu erzielen.

3.2 *Aac*SHC-Varianten für die enzymatische Brønsted-Säure-Katalyse neuer, nicht-natürlicher Reaktionen

Für die Erweiterung des Substrat- und Reaktionsspektrums der SHCs wurde aufbauend auf Vorarbeiten an diesem Institut^[65] mittels semi-rationaler Mutagenese eine umfassendere Enzymvarianten-Bibliothek der Squalen-Hopen Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*Aac*SHC) erstellt, welche hinsichtlich geeigneter *Aac*SHC-Mutanten für die Umsetzung nicht-natürlicher Substrate bzw. die Durchführung bestimmter, nicht-natürlicher Reaktionstypen untersucht wurde. Vor allem die Cyclisierung von Citronellal (**4**) war dabei ein interessanter Ansatzpunkt, da eines der daraus entstehenden Produktisomere, (-)-Isopulegol (-)-**5**, als wichtige Vorläuferverbindung für die industrielle Herstellung des Naturstoffes (-)-Menthol von großer Bedeutung ist. Alle verwendeten *Aac*SHC-Varianten wurden dabei regelmäßig mit dem natürlichen Substrat Squalen getestet, um deren Aktivität bzw. Funktionalität zu kontrollieren. Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt, wobei Variante *Aac*SHC/D376C (Knockout) sowie Puffer bei allen Versuchen als Negativkontrollen dienten.

3.2.1 Design und Charakterisierung neuer *Aac*SHC-Mutanten für die Umsetzung nicht-natürlicher Substrate

Bereits zuvor war in MD-Simulationen das Verhalten kleiner, nicht-natürlicher Substrate in der aktiven Tasche der *Aac*SHC untersucht worden (Daten nicht gezeigt). Diese Untersuchungen deuteten darauf hin, dass derartige Verbindungen in der deutlich größeren nativen Reaktionskavität der *Aac*SHC vielmehr dazu tendieren, sich in verschiedene, nichtreaktive Anordnungen zu (ent) falten. Diese geräumige Reaktionsumgebung ist daher für Biotransformationen solcher Substrate eher ungeeignet - kleine Terpenverbindungen können nur schlecht produktiv gefaltet werden, da die dafür nötigen, räumlichen Begrenzungen nicht ausreichend vorhanden sind und damit kein ausreichender sterischer Druck aufgebaut werden kann. In früheren Arbeiten von Siedenburg und Kollegen konnte bereits gezeigt werden, dass die Squalen-Hopen Cyclase 1 aus *Zymomonas mobilis* (*Zmo*SHC1) in der Lage ist, das Monoterpen **4** zum Produkt **5** zu cyclisieren. Zum ersten Mal wurde hier gezeigt, dass eine SHC auch für die Aktivierung einer Carbonylfunktion eingesetzt werden kann. Allerdings wurde in dieser Arbeit stets nur eine Mischung unterschiedlicher Produktisomere beschrieben, d.h. die Selektivitäten während dieser Biotransformation waren gering.^[75] Für den *Aac*SHC-Wildtyp konnte ebenfalls eine schwache Aktivität gegenüber **4** detektiert werden. Ebenfalls wurde hierbei ein Produktgemisch unterschiedlicher Isopulegole erhalten. Um diese SHC-katalysierte Reaktion synthetisch weiter ausnutzen zu können, wurde die Cyclisierung von **4** an diesem Institut unter Verwendung von *Aac*SHC-Varianten detaillierter untersucht, wobei erste vielversprechende Selektivitäten dieser Cyclase gegenüber dem nicht-natürlichen Substrat festgestellt wurden. Vor allem durch Aminosäure-Modifikation I261A konnten dabei ganz erstaunliche Substrat- sowie Produktselektivitäten gegenüber (*S*)-**4** erreicht werden.^[65] Hinsichtlich der anvisierten selektiven Cyclisierung von (*R*)-**4** zu (-)-**5** konnte bis dato jedoch keine produktselektive Variante geschaffen werden. Auch für die Umsetzung von (*S*)-**4** waren längst nicht alle möglichen Produktisomere selektiv zugänglich. Daher galten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit unter anderem der detaillierteren Erforschung und Verbesserung der selektiven Eigenschaften der *Aac*SHC bzgl. dieser speziellen Monocyclisierung. Um die Substratentfaltung in der Enzymtasche zu vermeiden und damit der verminderten Umsetzbarkeit monoterpenoider Substrate mit *Aac*SHC entgegenzuwirken, wurde die bereits bestehende Mutantenbibliothek aus *Aac*SHC-Varianten deutlich vergrößert. Die Strategie der Enzymmutantenbibliothek beruhte auf dem Austausch aller katalytisch nicht

aktiver Aminosäuren in der ersten Sphäre der aktiven Tasche im Abstand von 15 Å von der katalytischen Asparaginsäure D376 (Abb. 3.12) gegen kleine oder große hydrophobe Aminosäuren, um einen möglichst großen räumlichen Effekt zu erzielen (*reshaping*) und gleichzeitig die natürliche, für die Katalyse essentielle Hydrophobizität der Kavität zu erhalten.

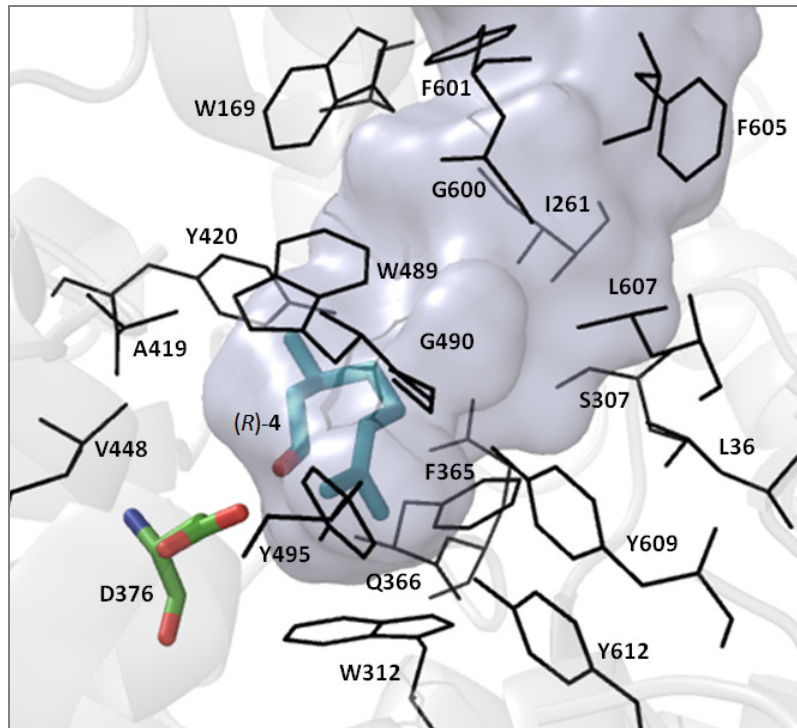


Abbildung 3.12: In die aktive Tasche der *AacSHC* (hellblau) modelliertes, reaktiv gefaltetes (*R*)-Citronellal (*R*)-**4** (blaues Stabmodell), repräsentativ für nicht-natürliche Monoterpen-Substrate. Die katalytische Asparaginsäure D376 ist als grünes Stabmodell dargestellt. Aminosäurepositionen, die für die Mutagenese zur Remodellierung der Enzymkavität ausgewählt wurden, sind in schwarzen Linien gezeigt.

Dieses Repertoire an *AacSHC*-Varianten war dadurch mit vielfältigen, modellierten aktiven Taschen ausgestattet, welche als neue, chirale, hydrophobe Umgebungen für die Faltung kleiner Substrate dienen sollten. Aminosäuresubstitutionen gegen Glycinreste dienten zusätzlich zur Einbringung von struktureller Flexibilität. Für die Arbeitsmodelle, die zur Erstellung der Mutanten verwendet wurden, diente die Kristallstruktur der *AacSHC* (UniProtKB: P33247) mit co-kristallisiertem Substratanalogon. Schematisch ist diese Umformungsstrategie in Abb. 3.13 und Abb. 3.14 am Beispiel der Cyclisierung von (*R*)-**4** zu Isomeren von **5** gezeigt. Verwendete Primer sowie die Methodik zur Erstellung der Mutantenbibliothek sind in 2.2 und 2.7.2 aufgeführt.

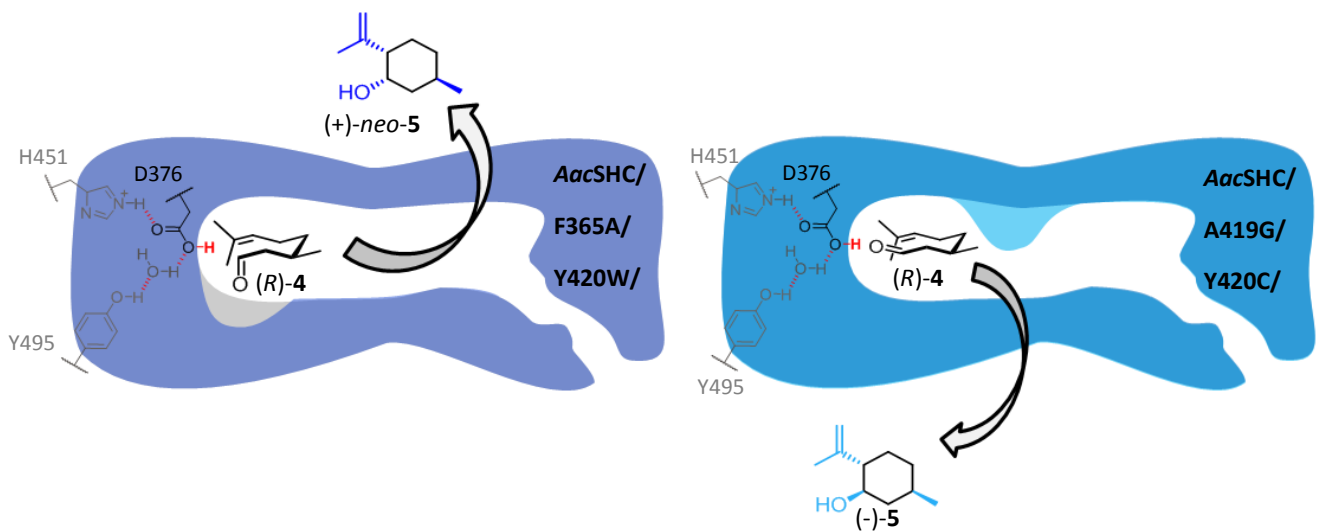


Abbildung 3.13: Mutagenese-Strategie zur Umformung aktiver Taschen, hier für die Prins-Reaktion von (*R*)-Citronellal (*R*)-**4** zu Isopulegolen (**5**) gezeigt. *Aac*SHCs katalytische Asparaginsäure D376 ist am Ende der aktiven Tasche lokalisiert, durch deren Umformung *Aac*SHC-Varianten (in Blautönen hervorgehoben) geschaffen werden, die alternative Geometrien für die produktive Faltung des nicht-natürlichen Substrates **4** in reaktive Konformationen begünstigen können.

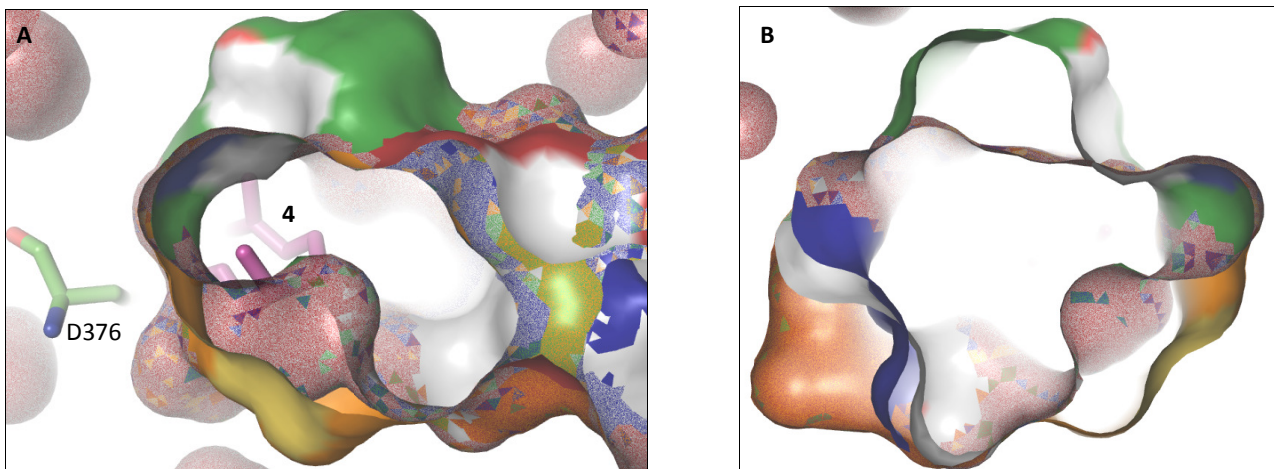


Abbildung 3.14: Modelle der Mutagenese-Strategie zur Umformung aktiver Taschen für die Umsetzung nicht-natürlicher Substrate mit *Aac*SHC. Die katalytische Asparaginsäure D376 ist als grünes Stabmodell dargestellt. Citronellal (**4**) ist als pinkes Stabmodell in die native Kavität des Wildtyp-Enzyms (grau) modelliert. Aktive Taschen der *Aac*SHC-Mutanten sind in rot, blau, grün, gelb, orange und magenta eingefärbt. Die Überlagerung der Kavitäten verdeutlicht die unterschiedlichen räumlichen Ansprüche der einzelnen Varianten. Mit Dreiecken gemusterte Oberflächenbereiche stellen dabei Formen dar, welche mehreren *Aac*SHC-Varianten gemein sind, während einfarbige Oberflächen solche Kavitätsausformungen anzeigen, die nur charakteristisch für bestimmte, einzelne Varianten sind.

Ergänzend dazu wurden Doppel- und Dreifach-Mutanten mit kombinierten Aminosäureaustauschen generiert, welche in vorangegangenen Untersuchungen mit Einzelmutanten vielversprechende Verbesserungen bzgl. der Umsetzung von **4** gezeigt hatten. Durch Kombination dieser Aminosäuresubstitutionen an Positionen A419, Y420 und G600, die v.a. zu einer Vergrößerung der aktiven Taschen führten, sollten additive Effekte dieser Modifikationen untersucht werden. Insgesamt wurde die bestehende Mutantenbibliothek (aus bis dahin 50 *Aac*SHC-Varianten) so um 40 zusätzliche Varianten erweitert. Nachfolgend sind zunächst die Ergebnisse zur Erweiterung der Enzymbibliothek gezeigt. Anschließend wurde dieses umfassende Set an *Aac*SHC-Varianten hinsichtlich verschiedener Brønsted-Säure-katalysierter Umsetzungen (Cyclisierung von Citronellal, Isomerisierung von (+)- β -Pinen, Semi-Pinacol-Umlagerung allylischer Alkohole) getestet und charakterisiert. Dazu wurden *Aac*SHC-Wildtyp, -Knockout (D376C) und die ca. 90 *Aac*SHC-Varianten gemäß 2.8.3 - 2.8.5 biosynthetisiert, solubilisiert und anschließend über Ionenaustauschchromatographie (IEX) gereinigt. Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit der verwendeten Methoden wurden Proteinbiosynthese und -reinigung regelmäßig mittels SDS-PAGE überprüft. Exemplarisch sind dazu im Anhang unter A.3.3 (Abb. A.16 und Abb. A.17) einige der Polyacrylamidgele abgebildet. Aus diesen geht klar hervor, dass die Elution der Zielproteine im Laufe der IEX durch die Einstellung der Salzkonzentration des Puffers terminiert erfolgen konnte, sodass in den Elutionsfraktionen das gewünschte Protein in hoher Konzentration und Reinheit vorlag. Weiterhin ist am Beispiel der *Aac*SHC-Variante Y420C in Abb. A.18 gezeigt, dass der Hauptteil des gebundenen Zielproteins in nur wenigen Elutionsfraktionen fast vollständig vom Säulenmaterial eluiert werden konnte. Standardmäßig wurden Enzympräparationen mit Konzentrationen von 3–5 mg/ml erhalten; noch höher konzentrierte Enzymlösungen ließen sich jedoch leicht durch selektives Abfangen solcher Fraktionen gewinnen. In Abb. 3.15 sowie Abb. A.21 (Anhang) sind vergleichend Proben verschiedener *Aac*SHC-Varianten abgebildet, welche simultan exprimiert und gereinigt wurden. Diese verdeutlichen, dass während Proteinherstellung bis Reinigung für alle *Aac*SHC-Varianten eine gute Vergleichbarkeit gewährleistet war; keine der Enzympräparationen wich zu stark von Konzentration oder Reinheit anderer Varianten ab.

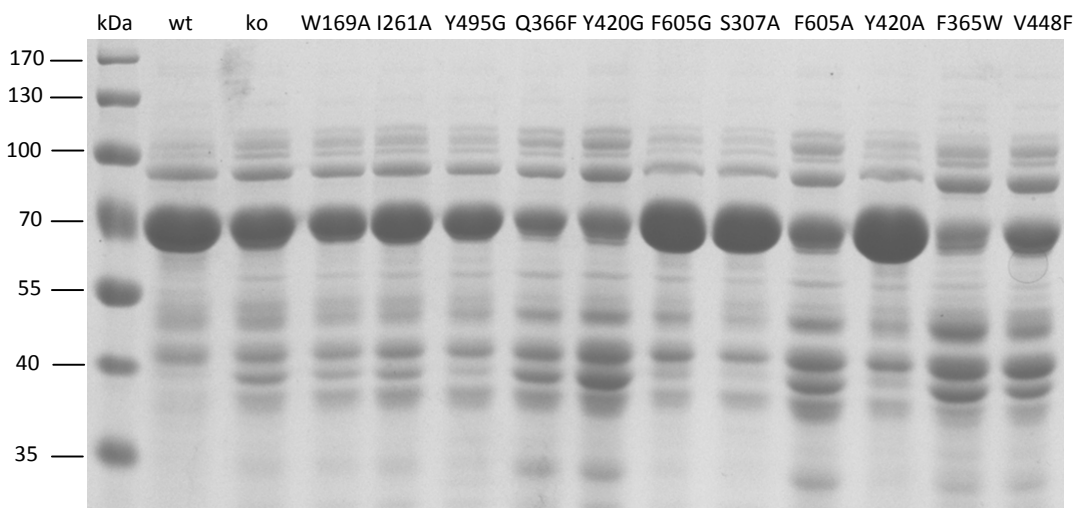


Abbildung 3.15: Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel (10 %) zur Analyse der Vergleichbarkeit von Expression und Reinigung der *Aac*SHC-Varianten (MW: 72 kDa). kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder.

Auch nach additiver Mutation mehrerer Aminosäurepositionen im Enzym konnten alle *AacSHC*-Varianten stabil und in vergleichbarer Konzentration hergestellt und gereinigt werden, was in Abb. A.19 (Anhang) anhand verschiedener Doppel- und Dreifachmutanten gezeigt ist. Nach der Validierung eines stabilen Protokolls für Herstellung, Reinigung, Biotransformation und Analytik der *AacSHC*-Mutantenbibliothek wurde diese zur Untersuchung enzymatischer Brønsted-Säure-Katalyse nicht-natürlicher Substrate eingesetzt. Dabei lag der Fokus auf Reaktionen funktionalisierter Monoterpene. Abhängig vom Substrat bzw. Reaktionstyp wurden dabei ganz unterschiedliche Aspekte der chiralen Säurekatalyse, wie Konformationszustände, Substrat- oder Produktselektivitäten, adressiert. Nachfolgend sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen gezeigt.

3.2.2 Die enzymatische Cyclisierung von Citronellal (**4**) zu Isopulegol (**5**)

Anhand der Prins-Reaktion von Citronellal (**4**) wurde untersucht, inwiefern der räumliche Ausbau der Substratumgebung, d.h. der Aufbau von sterischen Einflüssen innerhalb der aktiven Tasche der *AacSHC* unterschiedliche intermediäre Substratorientierungen dirigieren und damit den Zugang zu alternativen Stereoselektivitäten ermöglichen bzw. beeinflussen konnte. Daher wurde zunächst eine analytische Methode entwickelt, mit der ein Gemisch möglicher Produktisomere mittels Gaschromatographie aufgetrennt und zugeordnet werden konnte (s. 2.8.10). Beispielhaft ist ein solches Chromatogramm nachfolgend für (*R*)-**4** sowie die entsprechenden Isopulegolprodukte gezeigt (Abb. 3.16).

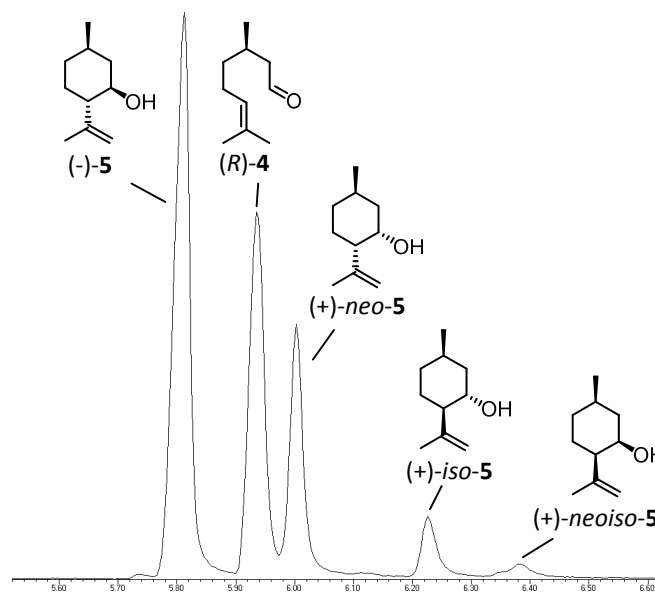
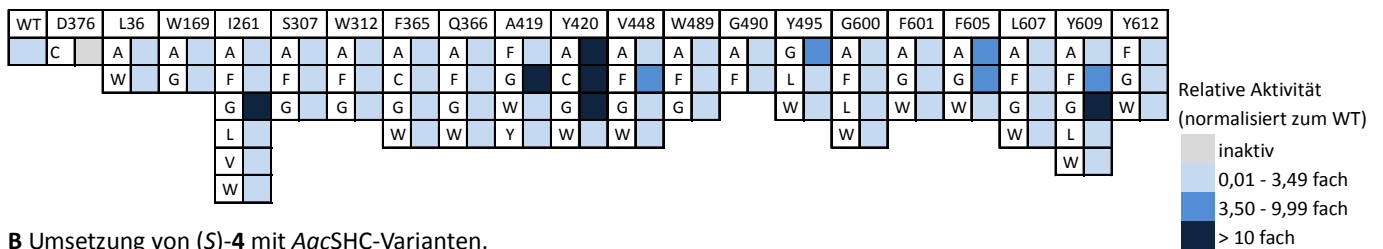


Abbildung 3.16: Gaschromatogramm der analytischen Trennung des Substrates (*R*)-Citronellal (*R*)-**4** zusammen mit den vier korrespondierenden Isopulegolen (**5**) (-)-**5**, (+)-*neo*-**5**, (+)-*iso*-**5** und (+)-*neoiso*-**5**.

Die für die Umsetzung kleiner, terpenoider Substrate ausgebaute *AacSHC*-Mutantenbibliothek wurde zunächst gegenüber *rac*-**4** getestet, um Mutanten mit selektiven Eigenschaften hinsichtlich dieser Reaktion zu identifizieren. Details dieses Screenings werden in 4.2.2 ausführlicher diskutiert (s. Abb. 4.1). Umsätze der

aktivsten *Aac*SHC-Varianten sind nachfolgend beschrieben (Tab. 3.2 bis Tab. 3.4). Mit der Mutantenbibliothek konnte auf Anhieb eine erstaunliche Vielfalt unterschiedlicher Isopulegolisomere (**5**, *neo-5* und *iso-5*) adressiert werden, wobei bestimmte Isomere im Vergleich zu anderen häufiger gebildet wurden. Weiterhin war zu beobachten, dass unterschiedliche Varianten ganz bestimmte Produktisomere klar zu bevorzugen scheinen, d.h. dass die eingefügten Mutationen im Enzym zu einer veränderten Produktselektivität führten. Ein Blick auf die Enantioselektivität bzgl. der Substrate zeigte, dass auch hier bereits eine Spezialisierung innerhalb der Mutanten stattfand. Während das Wildtyp-Enzym noch sowohl (*S*)- als auch (*R*)-**4** als Substrat akzeptierte, wies bereits eine Mehrheit der *Aac*SHC-Einzelmutanten z. T. erstaunlich hohe bis exzellente Substratselektivitäten auf: Bis auf wenige Ausnahmen (im Bereich von 70 – 85 % ee) erreichte praktisch jede der aktiven Mutanten > 99 % ee, erlaubte also die Cyclisierung von **4** mit kinetischer Resolution. Dabei ist es herausragend, dass bereits durch das Einbringen einer einzelnen Mutation innerhalb der aktiven Tasche eine solch hohe Substratselektivität erreicht werden konnte. Allerdings konnte für keines der beiden Konformere, welche die höchste relative Energie im Übergangszustand besitzen, (*R*)- und (*S*)-*neoiso-5*,^[78] mit Einzelmutanten eine detektierbare Produktbildung erreicht werden. Aktivitäten der Biotransformationen wurden dabei stets auf diejenige des Wildtyps gegenüber (*R*)- oder (*S*)-**4** bezogen, wobei anfängliche Umsätze im Bereich bis zu 10 % lagen. Eine vergleichende Übersicht dieser relativen Aktivitäten ist in Abb. 3.17 gegeben.

A Umsetzung von (*R*)-**4** mit *Aac*SHC-Varianten.



B Umsetzung von (*S*)-**4** mit *Aac*SHC-Varianten.

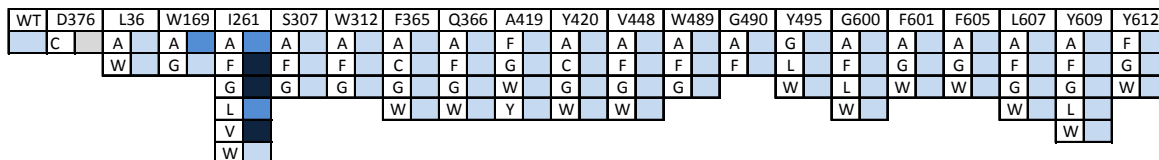


Abbildung 3.17: Untersuchung der *Aac*SHC-Einzelmutanten gegenüber der Prins-Cyclisierung von enantiomerenreinem Citronellal (**4**). Mutierte Aminosäurepositionen und deren entsprechende Substitutionen sind in den Tabellenfeldern angeführt. Der Farbcode indiziert die relativen Aktivitäten jeder Variante normalisiert zu der des Wildtyp-Enzyms (WT) gegenüber **A** (*R*)-**4** und **B** (*S*)-**4** gemäß der rechts gezeigten Legende.

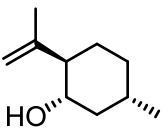
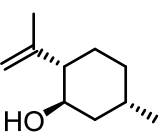
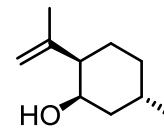
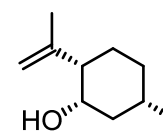
Wie in Abb. 3.17 zu erkennen ist, wurden besonders bei Modifikationen an Aminosäurepositionen A419, Y420 und Y609 substratselektive Varianten gefunden, die ausschließlich ein Substratenantiomer umsetzten, während das andere Enantiomer nicht cyclisiert wurde. Dabei umfassten vorteilhafte Mutationen sowohl Aminosäureaustausche gegen größere (*Aac*SHC-Variante Y609F) als auch kleinere hydrophobe Aminosäurereste (*Aac*SHC-Varianten A419G, Y420G, Y420A, Y420C, Y609G), wobei Substitutionen gegen kleinere Seitenketten den gewünschten Effekte deutlich häufiger hervorbrachten. Neben der Substratselektivität wurden außerdem die

jeweiligen Diastereomerenverhältnisse der Produktbildung analysiert. Dabei war auffallend, dass für die Umsetzungen von (*S*)-**4** für die meisten Varianten auf Anrieb Diastereomerenreinheit erreicht wurde, während das Diastereomerenverhältnis der Produkte für Umsetzungen mit (*R*)-**4** deutlich stärker variierte. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird nachfolgend sequentiell auf diese Ergebnisse eingegangen.

3.2.2.1 Untersuchungen zur Cyclisierung von (*S*)-Citronellal (*S*)-**4**

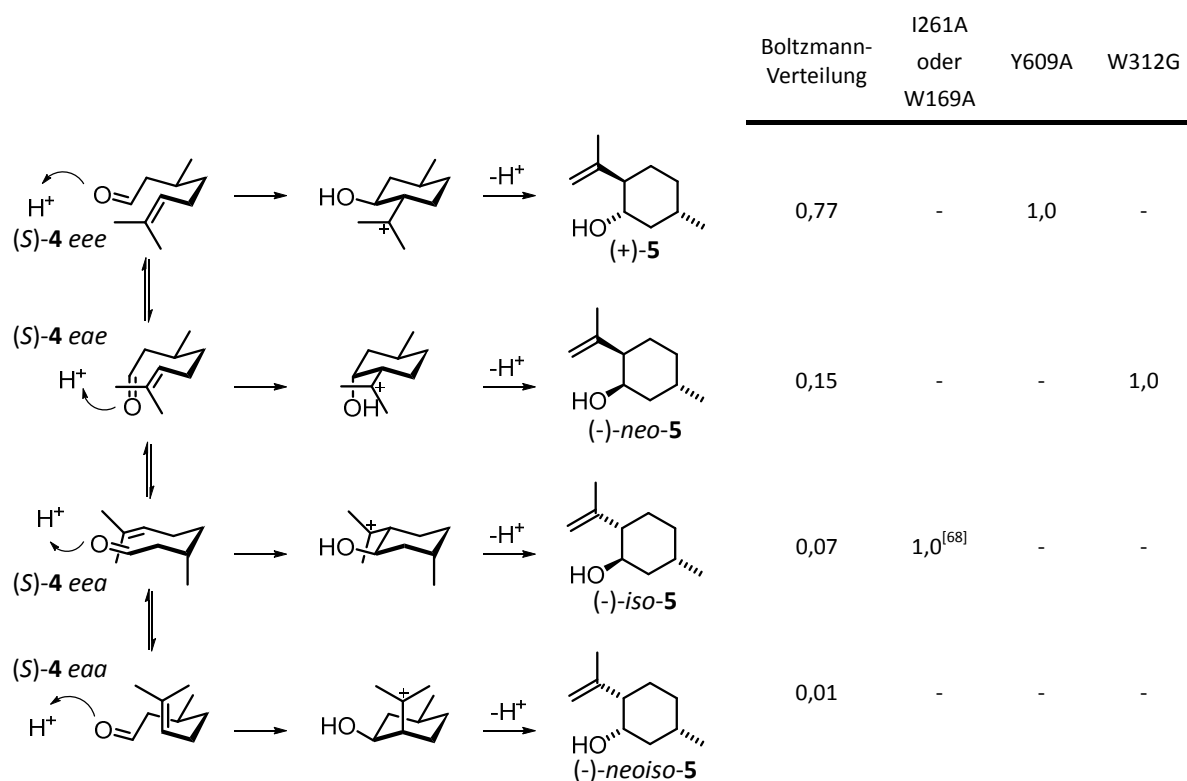
In nachfolgender Übersicht (Tabelle 3.2) sind Ausbeuten gelistet, die mit einigen der *Aac*SHC-Einzelmutanten erreicht werden konnten, welche eine außergewöhnliche Spezialisierung bezüglich der Umsetzung von (*S*)-**4** aufwiesen. Die entsprechenden Umsätze sind in Klammern angegeben. Allein durch einzelne Mutationen des Wildtyp-Enzyms konnte der Umsatz um etwa das Achtfache gesteigert werden (*Aac*SHC-Variante W169A). Für veränderte Diastereoselektivitäten konnten anfängliche Umsätze von etwa der doppelten (*Aac*SHC-Variante Y609A) bzw. halben Wildtypaktivität (*Aac*SHC-Variante Y609F oder W312G) erreicht werden.

Tabelle 3.2: Umsätze der diastereoselektiven Cyclisierung von (*S*)-Citronellal (*S*)-**4** mit *Aac*SHC-Varianten.

<i>Aac</i> SHC-Variante	 (+)- 5	 (-)- <i>iso</i> - 5	 (-)- <i>neo</i> - 5	 (-)- <i>neoiso</i> - 5
Wildtyp	-	1,15 % ± 0,01	-	-
W169A	-	7,90 % ± 0,23	-	-
I261A	-	7,70 % ± 0,22	-	-
S307G	-	6,44 % ± 1,39	-	-
Y609A	2,65 % ± 0,19	-	-	-
L607G	-	6,10 % ± 0,06	-	-
Y609F	-	-	0,51 % ± 0,09	-
W312G	-	-	0,47 % ± 0,07	-

Überblick über einige der *Aac*SHC-Varianten, welche (*S*)-**4** hochselektiv (> 99 % *de*) zu je einem der möglichen Isomere des Produkts Isopulegol (**5**) cyclisierten. Zum Vergleich ist der *Aac*SHC-Wildtyp (grau) aufgelistet, der bereits eine geringe Anfangsaktivität gegenüber (*S*)-**4** aufwies. Umsätze der jeweiligen Enzymvarianten sind bezogen auf 2 mM Substrat.

Ein Vergleich der thermodynamisch bedingten Boltzmann-Verteilung mit den Diastereomerenverhältnissen, welche durch Biotransformationen von (*S*)-**4** mit der *Aac*SHC-Mutantenbibliothek erhalten wurden, zeigt, wie elegant Enzyme in der Lage sind, solche thermodynamischen Tendenzen auszuhebeln. Beispielhaft sind dazu in Schema 3.1 einige der effizientesten *Aac*SHC-Mutanten für die produktspezifische Umsetzung von (*S*)-**4** aufgeführt.



Schema 3.1: Links: Die Cyclisierung von (*S*)-Citronellal (*S*)-**4** zu Isopulegol (**5**) kann über vier Übergangszustände verlaufen, die sich in der axialen (*a*) oder äquatorialen (*e*) Ausrichtung ihrer Substituenten unterscheiden. Deren Anordnung ist durch einen Drei-Buchstaben-Code (links, kursiv) angegeben, wobei die Orientierung der Substituenten in folgender Reihenfolge angegeben ist: Isopropylen, Carbonyl, Methyl. Deren gegenseitige sterische Abstoßung führt zu unterschiedlichen Energien der Übergangszustände. Rechts: Tabellarischer Vergleich zwischen der Produktverteilung gemäß Boltzmann und den diastereoselektiven *Aac*SHC-Varianten I261A, W169A, Y609A und W312G, welche definierte Produktpräferenzen aufwiesen und spezifischen Zugang zu (-)-*iso*-**5**, (+)-**5** und (-)-*neo*-**5** gewährten.

Wie in Schema 3.1 gezeigt, lieferten *Aac*SHC-Varianten I261A und W169A (-)-*iso*-**5** mit exzellenter Diastereoselektivität > 99 %, wohingegen im thermodynamischen Gleichgewicht nur 7 % erreicht werden würden. Beide Mutationen befinden sich an benachbarten Positionen am eher substrat-abgewandten Bereich der aktiven Tasche der Cyclase. Ein direkter Einfluss der eingefügten Mutationen auf die Katalyse ist daher eher unwahrscheinlich. Aminosäuremodifikationen in *Aac*SHC-Variante W312G und Y609A lieferten (-)-*neo*-**5** (W312G) und (+)-**5** (Y609A) mit jeweils > 99 % *de*, wohingegen nach der Boltzmann-Verteilung nur 77 % (+)-**5** und nur 15 % (-)-*neo*-**5** erhalten werden würde. Letztgenannte Modifikationen betreffen strukturell benachbarte Aminosäurepositionen in direkter räumlicher Nähe zur katalytisch aktiven Asparaginsäure D376 und sind daher also auch vergleichsweise nahe am reaktiv gebundenen Substrat lokalisiert, weshalb ein unmittelbarer Einfluss der Aminosäuremutationen auf Substratbindung und -umsetzung wahrscheinlich ist.

3.2.2.2 Einsatz einer kombinatorischen Mutantenbibliothek zur Cyclisierung von (*R*)-Citronellal (*R*)-**4**

Analog zu (*S*)-**4** wurde die *Aac*SHC-Mutantenbibliothek gegenüber (*R*)-Citronellal (*R*)-**4** gescreent. Zunächst war bemerkenswert, dass ebenfalls allein durch die Einbringung von Einzelmutationen (wie

bspw. A419G oder Y420C) auch für dieses Substratenantiomer Aktivitäten um ein Vielfaches im Vergleich zum Wildtyp verbessert werden konnten. Auffällig war hier jedoch, dass auf Anhiob keine Einzelvarianten gefunden wurden, die (*R*)-**4** ebenso produktspezifisch umsetzten, wie dies im Falle von (*S*)-**4** beobachtet worden war. Stattdessen wurde Hauptprodukt (*-*)-**5** stets zusammen mit bestimmten Mengen an (*+*)-*neo*-**5** gebildet. Aus einem kleinen Set an *Aac*SHC-Doppel- und Dreifachmutanten, welche bereits in vorangegangenen Arbeiten erstellt worden waren,^[65] konnten Varianten identifiziert werden, die eine Produktspezifität bzgl. (*+*)-*neo*-**5** aufwiesen. Das Screening dieser Doppel- und Dreifachmutanten gegenüber **4** ist in Abb. 3.18 gezeigt. Detailliertere Angaben zu Umsätzen einiger *Aac*SHC-Varianten mit (*R*)-**4** sind Tabelle 3.3 zu entnehmen.

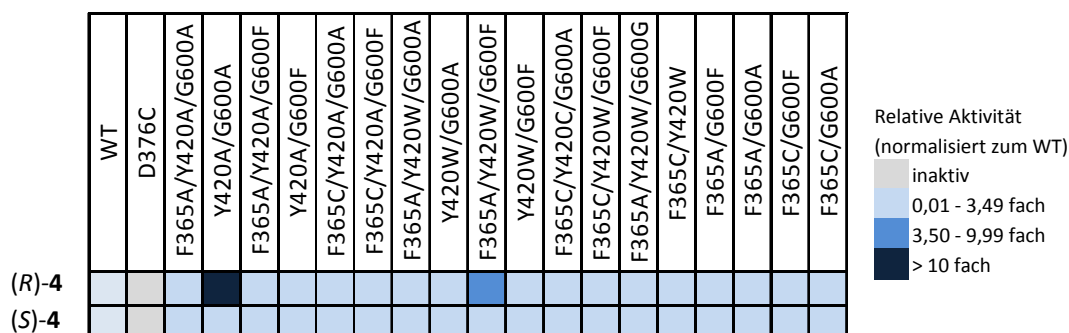
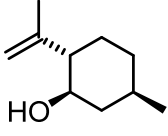
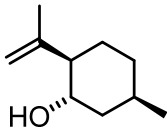
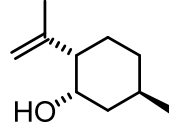
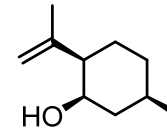


Abbildung 3.18: Untersuchung von *Aac*SHC-Doppel- und Dreifachmutanten an Aminosäurepositionen F365, Y420 und G600 bezüglich der Aktivität gegenüber enantiomerenreinem Citronellal. Mutierte Aminosäurepositionen und die entsprechenden Substitutionen sind in den Tabellenfeldern angeführt. Der Farbcode indiziert die relativen Aktivitäten der Varianten gegenüber (*R*)-**4** und (*S*)-**4** normalisiert zu der des Wildtyp-Enzyms (WT) gemäß der rechts gezeigten Legende.

Tabelle 3.3: Umsätze der Cyclisierung von (*R*)-Citronellal (*R*)-**4** mit *Aac*SHC-Varianten.

<i>Aac</i> SHC-Variante	 (<i>-</i>)- 5	 (<i>+</i>)- <i>iso</i> - 5	 (<i>+</i>)- <i>neo</i> - 5	 (<i>+</i>)- <i>neoiso</i> - 5
Wildtyp	0,33 % ± 0,41	-	0,11 % ± 0,09	-
A419G	6,09 % ± 0,67	-	1,04 % ± 0,43	-
Y420A	4,75 % ± 0,16	-	3,41 % ± 0,03	-
Y420C	10,33 % ± 0,46	-	4,05 % ± 0,25	-
Y420G	7,43 % ± 0,09	-	5,09 % ± 0,15	-
Y420A/G600A	9,59 % ± 1,15	-	8,81 % ± 1,13	-
Y420W/G600F	-	-	2,64 % ± 0,12	-
F365A/Y420W/G600F	-	-	4,64 % ± 0,18	-

Überblick über einige der *Aac*SHC-Varianten, welche (*R*)-**4** zu Isopulegolen (**5**) umsetzten. Zum Vergleich ist der *Aac*SHC-Wildtyp (grau) aufgelistet, der bereits eine geringe Anfangsaktivität für (*R*)-**4** zeigte. Die Tabelle fokussiert sich dabei auf diejenigen *Aac*SHC-Varianten, die vglw. gut zur Bildung von (*-*)-**5** geeignet waren. Umsätze der Enzymvarianten sind bezogen auf 2 mM eingesetztes Substrat.

Anfangs konnte also zunächst keine *Aac*SHC-Variante generiert werden, welche zur diastereoselektiven Cyclisierung von (*R*)-**4** zu (-)-**5** in der Lage war. Da es sich bei diesem Stereoisomer um eine wichtige Vorläuferverbindung in der industriellen Produktion des Aromastoffes (-)-Menthol handelt, ist eine möglichst isomerenreine Herstellung dieses Isomers von großem wirtschaftlichem Nutzen. Daher wurde in einem nächsten Schritt untersucht, inwiefern die Produktselektivität der *Aac*SHC-Mutanten durch kombinatorische Umformungen der aktiven Tasche weiter ausgebaut werden konnte, wobei der Fokus dieser Untersuchungen auf die Bildung von (-)-**5** gerichtet war. Um also *Aac*SHC-Varianten mit verbesserten Selektivitäten bezüglich dieser Umsetzung zu schaffen, wurden diejenigen Aminosäuremutationen zu neuen Doppel- und Dreifachmutanten kombiniert, welche in vorherigen Umsetzungen mit (*R*)-**4** eine Verbesserung hinsichtlich Substrat- und Produktselektivität bewirkt hatten. Als relevante Aminosäuren hierfür wurden Positionen A419, Y420 und G600 ausgewählt (s. Abb. 3.19). Für Position A419 sowie Y420 konnten bereits durch Einzelmutationen signifikante Steigerungen bzgl. der Bildung von (-)-**5** festgestellt werden. In Zusammenhang mit weiteren Aminosäuremodifikationen (wie im Falle von *Aac*SHC-Variante Y420A/G600A) bewirkten auch Substitutionen an Position G600 eine deutliche Erhöhung der relativen Aktivität gegenüber (*R*)-**4** um mehr als das Zehnfache im Vergleich zum Wildtyp (s. Abb. 3.18) und auch die Stereoselektivität wurde deutlich gesteigert. Daher wurden diese drei Positionen für die Erstellung einer fokussierten Bibliothek aus Doppel-/Dreifachmutanten gewählt und diejenigen Substitutionen miteinander kombiniert, die sich für die selektive Katalyse von (*R*)-**4** zu (-)-**5** als förderlich erwiesen hatten. Die Lokalisierung dieser Aminosäurepositionen ist in Abb. 3.19 visualisiert.

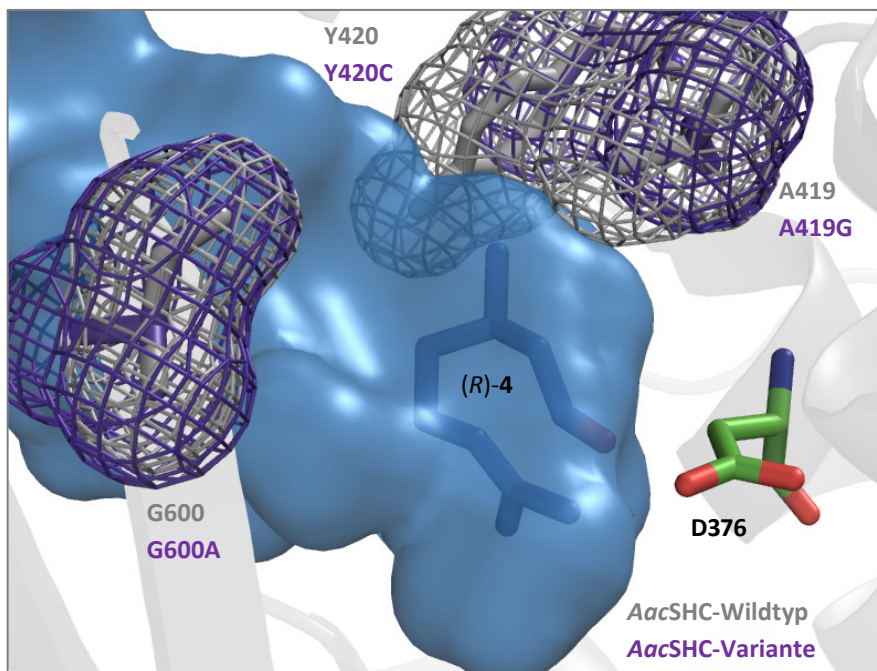


Abbildung 3.19: Visualisierung der Modellierung von (*R*)-Citronellal (*R*)-**4** in die aktive Tasche (blau) des *Aac*SHC-Wildtyps (grau). Die katalytische Asparaginsäure D376 ist als Stabmodell gezeigt. Aminosäurepositionen, welche für die Doppel- und Dreifachmutanten zur Umsetzung von (*R*)-**4** modifiziert wurden, sind grau eingefärbt; ihr räumlicher Anspruch ist als Netzhülle dargestellt. In gleicher Weise überlagert und lila eingefärbt sind Aminosäuresubstitutionen der Variante *Aac*SHC/A419G/Y420C/G600A.

Umsetzungen mit (S)-**4** wurden simultan zur Kontrolle durchgeführt, um sicherzustellen, dass durch die neu eingefügten Mutationen keine unbeabsichtigte Veränderung der Substratelektivität stattfand. Ergebnisse dieser Biotransformationen sind nachfolgend in Abb. 3.20 gezeigt. Die ausgeprägte Substratelektivität der gezeigten Enzymvarianten gegenüber (R)-**4** blieb erhalten. Aktivitäten bzgl. dieser nicht-natürlichen Umsetzung waren erwartungsgemäß im moderaten Bereich (s. Tab. 3.4).

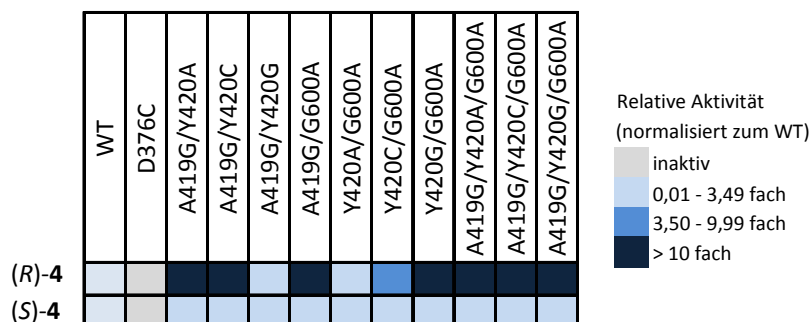
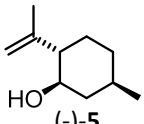


Abbildung 3.20: Untersuchung der Aktivität von *AacSHC*-Doppel-/ Dreifachmutanten an Positionen A419, Y420 und G600 gegenüber der Cyclisierung von Citronellal (**4**) zu Isopulegol (**5**). Der Farbcode zeigt die relativen Aktivitäten der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym (WT) an.

Tabelle 3.4: Umsätze der *AacSHC* Varianten bzgl. der Cyclisierung von (R)-Citronellal (R)-**4** zu (-)-Isopulegol (-)-**5**.

<i>AacSHC</i> -Variante	Wildtyp	A419G/Y420A	A419G/Y420C	Y420C/G600A	Y420G/G600A	A419G/Y420A/G600A	A419G/Y420C/G600A	A419G/Y420G/G600A
 (-)- 5	0,14 % ± 0,14	4,10 % ± 0,19	1,68 % ± 0,26	0,56 % ± 0,22	1,14 % ± 0,29	4,18 % ± 0,10	9,09 % ± 0,69	3,13 % ± 1,83

Zur Vergleichbarkeit ist neben den *AacSHC*-Doppel-/ Dreifachmutanten ebenfalls der *AacSHC*-Wildtyp (grau) aufgeführt, welcher bereits eine geringe Anfangsaktivität gegenüber (R)-**4** aufwies.

Durch Variation der Reaktionsbedingungen wurde außerdem untersucht, inwieweit auf diese Weise die Bildung von (-)-**5** weiter gesteigert werden konnte. Dazu wurden Detergengkonzentrationen zwischen 0,01 % und 0,2 % Triton X-100 (Abb. 3.21) sowie Temperaturen im Bereich von 20 – 40 °C (Abb. 3.22) variiert.

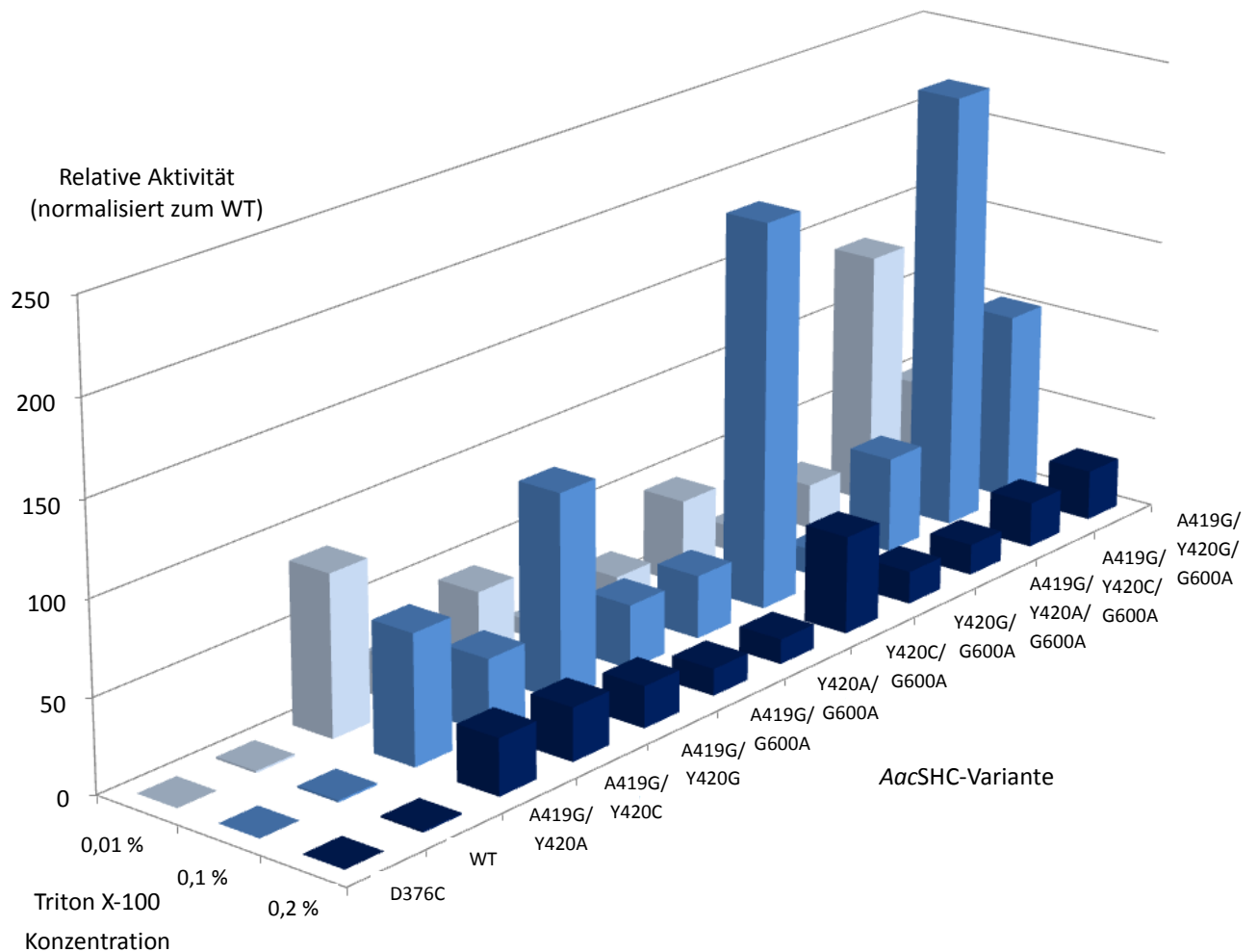


Abbildung 3.21: Untersuchungen zur Steigerung der Bildung von (-)-Isopulegol (-)-5 durch Variation der Konzentration an Detergens (Triton X-100, Blautöne). Die Abbildung vergleicht Aktivitäten der *AacSHC*-Varianten normalisiert zur Aktivität des Wildtyp-Enzyms (WT). *AacSHC*-Variante D376C (Knockout) diente als Negativkontrolle.

Von den getesteten Detergenskonzentration wurden für alle *AacSHC*-Varianten die höchsten Umsätze unter Verwendung von 0,1 % Triton X-100 erreicht. Damit verglichen führte der Einsatz von 0,2 % TX-100 sowie die Verringerung auf 0,01 % TX-100 zu einer Abnahme erreichbarer Ausbeuten an Zielprodukt. Weiterhin konnte die Bildung von (-)-5 durch eine Senkung der Temperatur auf 20 °C für alle *AacSHC*-Varianten deutlich (drei- bis siebenfach) gesteigert werden. Eine Erhöhung der Temperatur auf 40 °C führte hingegen zu einem drastischen Aktivitätsverlust auf nur mehr 10 -20 % im Vergleich zur Standardbedingung (30 °C).

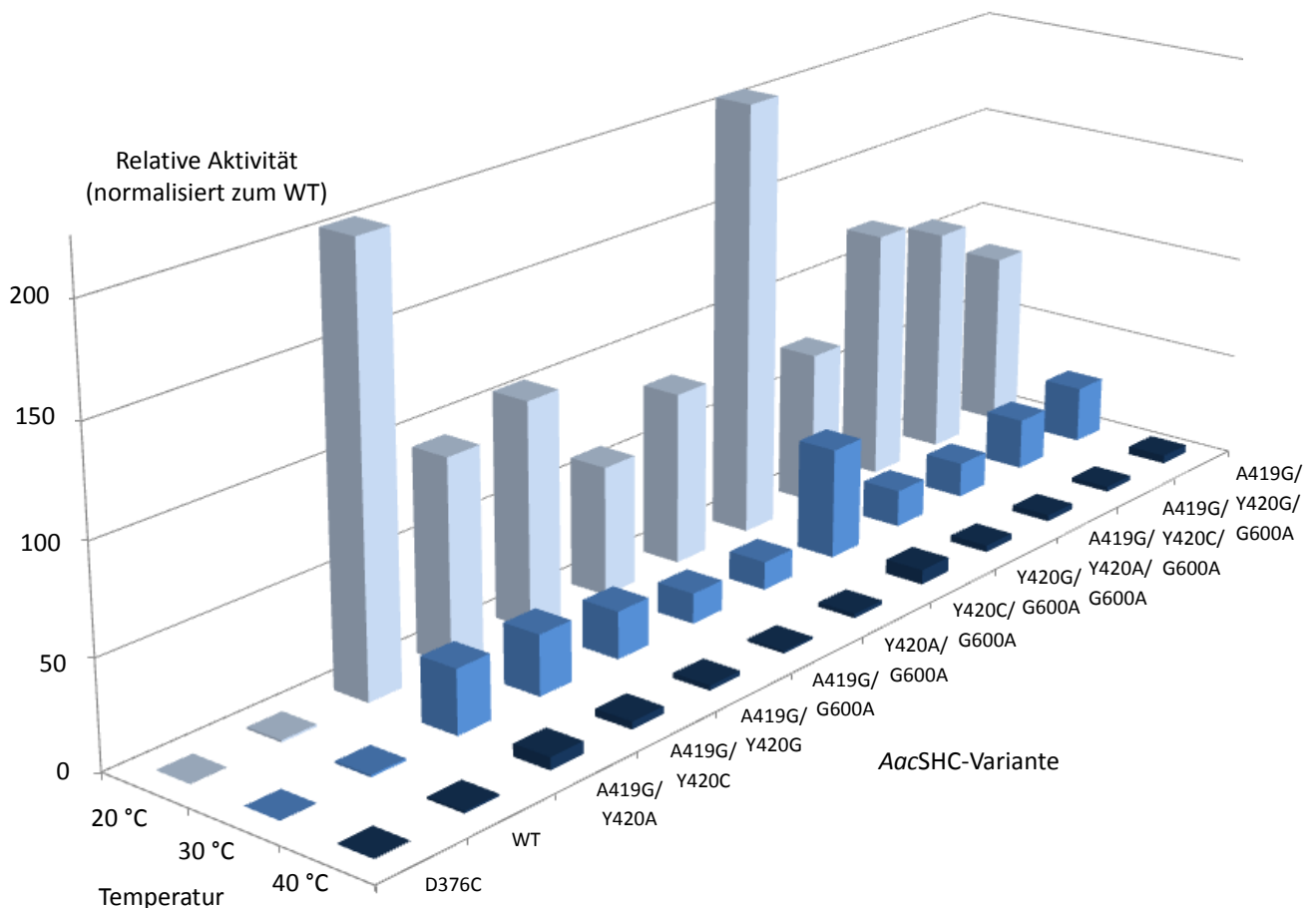
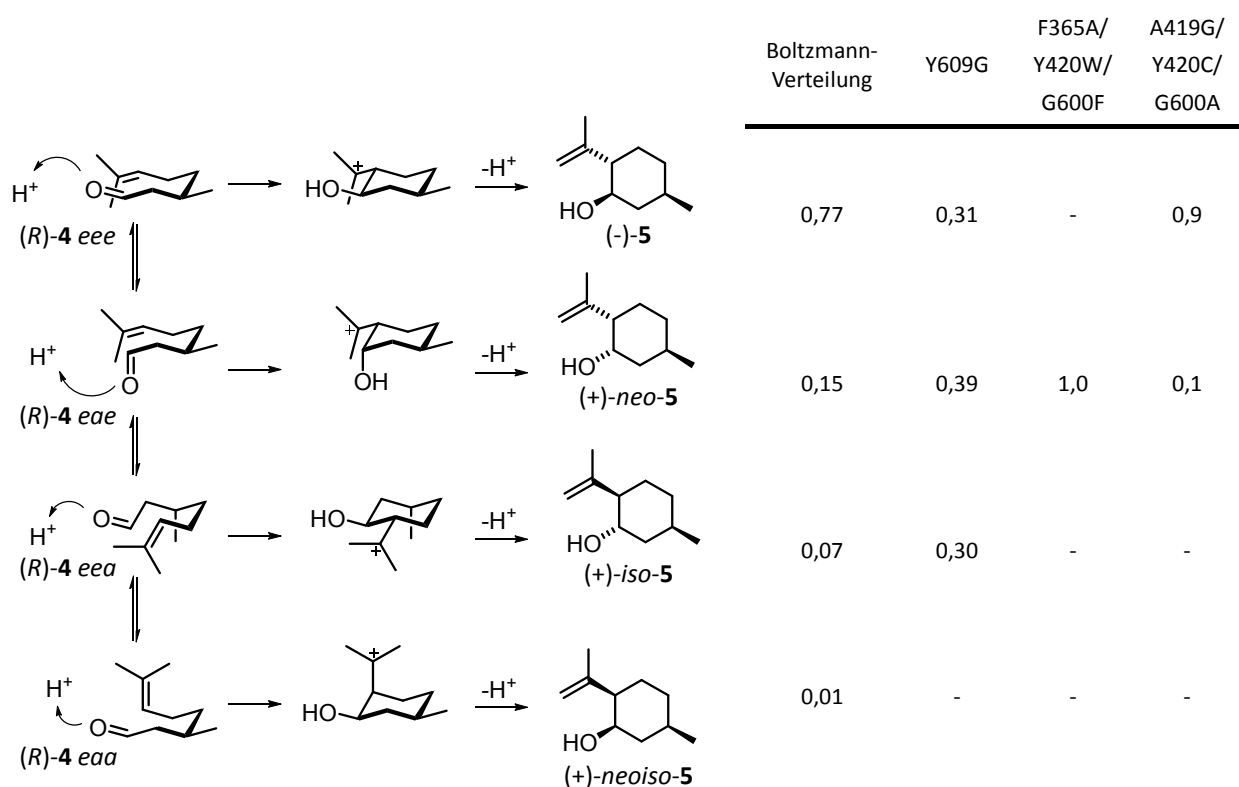


Abbildung 3.22: Untersuchungen zur Steigerung der Bildung von (-)-Isopulegol (-)-**5** durch Variation der Temperatur (Blautöne). Die Abbildung zeigt die Aktivitäten der *AacSHC*-Varianten normalisiert zur Aktivität des Wildtyp-Enzyms (WT). *AacSHC*-Variante D376C (Knockout) diente als Negativkontrolle.

Weiterhin wurden die Diastereoselektivitäten der neu geschaffenen *AacSHC*-Doppel-/ Dreifachmutanten analysiert. Dies ergab, dass durch den kombinatorischen Ansatz eine neue Cyclase, *AacSHC*-Variante A419G/Y420C/G600A, generiert werden konnte, welche die hochselektive Bildung des gewünschten Isopulegolisomeres ermöglichte: Die Produktverteilung zwischen (-)-**5** und (+)-*neo*-**5** konnte auf ein Diastereomerenverhältnis von 9 : 1 erhöht werden, d.h. die Kombination der Aminosäuresubstitutionen hatte in diesem Falle wie gewünscht zu einer Selektivitätssteigerung bzgl. des gewünschten Produktisomers geführt. Obwohl der kombinatorische Ansatz für die Mehrzahl der *AacSHC*-Varianten in der beabsichtigten Weise erfolgreich war, wurden auch Mutanten gefunden (bspw. *AacSHC*-Variante Y420C/G600A oder Y420A/G600A), für welche diese Strategie nicht zielführend war, also keine Erhöhung der Produktselektivität bewirkte. Schema 3.2 gibt nachfolgend eine abschließende Übersicht über diejenigen *AacSHC*-Varianten, welche insgesamt in den oben beschriebenen Screenings für die hochselektive Monocyclisierung von (*R*)-**4** identifiziert wurden.



Schema 3.2: Hochselektive AacSHC-Varianten für die Cyclisierung von (*R*)-Citronellal (*R*)-**4**. Diese Reaktion kann über vier Übergangszustände verlaufen, welche sich in axialer (*a*) oder äquatorialer (*e*) Ausrichtung der Substituenten unterscheiden, hier indiziert durch einen Drei-Buchstaben-Code. Die Orientierungen der Substituenten sind in folgender Reihenfolge angegeben: Isopropylen, Carbonyl, Methyl. Tabelle: Vergleich der Produktverteilung gemäß Boltzmann mit der enzymatischen Reaktion unter Verwendung hochselektiver AacSHC-Varianten, welche signifikante Produktpräferenzen gegenüber der Bildung von (+)-*neo*-**5** (F365A/Y420W/G600F) bzw. (-)-**5** (A419G/Y420C/G600A) aufwiesen. AacSHC-Variante Y609G hingegen ist Beispiel für ein Enzymdesign, bei welchem die Produktselektivität durch die eingeführte Modifikation nahezu ausgeschaltet wurde.

3.2.3 Die enzymatische Isomerisierung von (+)- β -Pinen (+)- β -6

Zu Beginn der Arbeiten mit (+)- β -Pinen (+)- β -6 und verwandter cyclischer Terpenprodukte wurden einige Vorversuche zur Handhabung und Analytik dieser flüchtigen Verbindungen durchgeführt. Ansatz, Aufarbeitung und Analytik der Reaktionen sollten optimiert werden, um unerwünschte Nebenreaktionen zu reduzieren und Probleme bei Isolierung und Analytik der Verbindungen zu verhindern. Zunächst wurde dazu kontrolliert, ob die Extraktion der Verbindungen aus dem Reaktionsansatz mittels Ethylacetat vollständig gewährleistet werden konnte. Diese Überprüfung bestätigte die quantitative Extrahierbarkeit des (+)- β -Pinsens aus der verwendeten Pufferlösung mit dem verwendeten Extraktionsmittel. Des Weiteren wurde eine analytische Methode über GC-FID/MS entwickelt, welche die Zuordnung von Terpenprodukten aus der Isomerisierung von (+)- β -6 ermöglichte. Ein entsprechendes Gaschromatogramm der relevanten Verbindungen ist in Abb. 3.23 gezeigt. Außerdem wurde in Vorscreenings überprüft, ob *Aac*SHC für die Brønsted-Säure-katalysierte Isomerisierung von (+)- β -6 verwendet werden konnte.

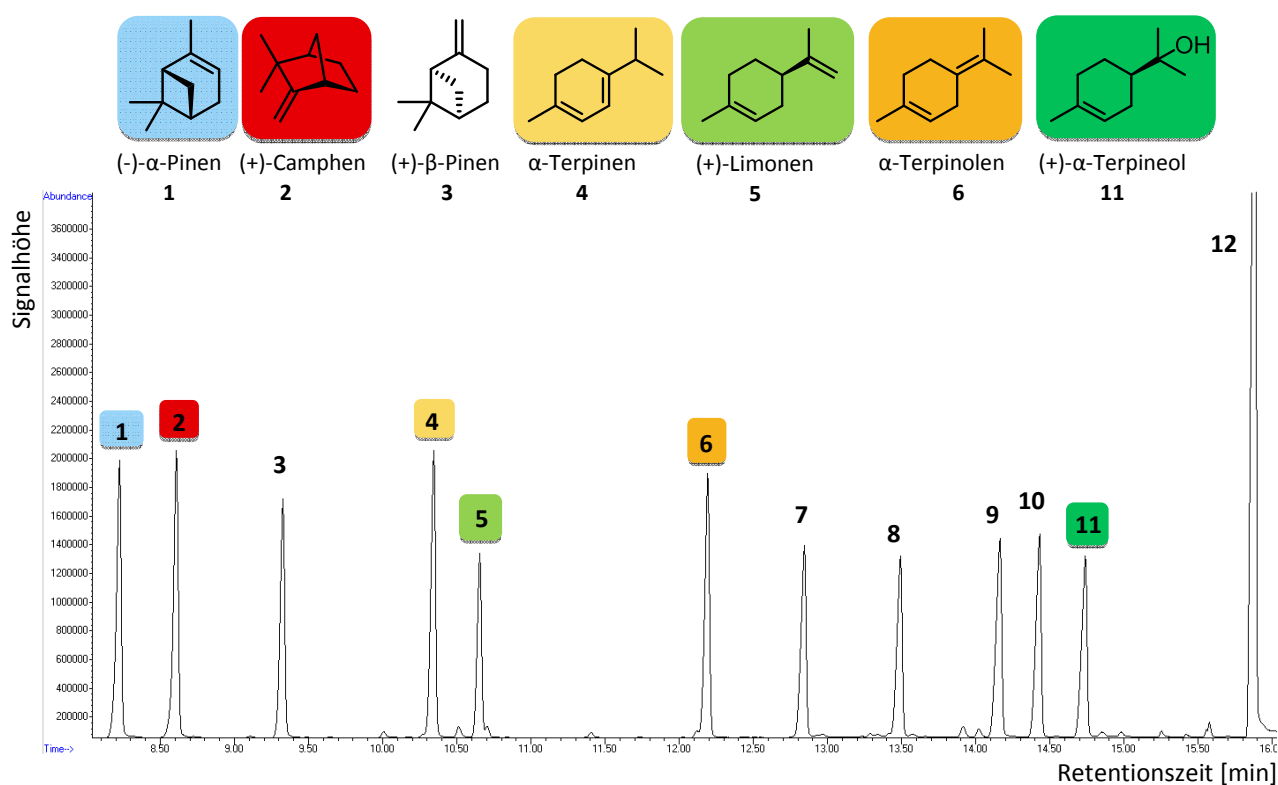


Abbildung 3.23: GC-Chromatogramm zur analytischen Trennung des Substrates **3** (+)- β -Pinen (9,30 min) und möglicher cyclohexanoider Produkte aus dessen säurekatalysierter Isomerisierung: **1** (-)- α -Pinen (8,16 min), **2** (+)-Camphen (8,54 min), **4** α -Terpinen (10,29 min), **5** (+)-Limonen (10,60 min), **6** α -Terpinolen (12,14 min), **7** Fenchol (12,79 min), **8** trans-Pinocarveol (13,44 min), **9** Borneol (14,11 min), **10** Terpinen-4-ol (14,38 min), **11** (+)- α -Terpineol (14,69 min) sowie des externen Standards **12** 1-Decanol (15,86 min). Die in Biotransformationen mit *Aac*SHC-Varianten gebildeten Produkte sind farblich hervorgehoben.

Weiterhin wurde getestet, zu welchem Grad es die bis zu diesem Zeitpunkt vorhandene Mutantenbibliothek erlaubte, durch die Kontrolle reaktiver kationischer Intermediate selektiv verschiedene cyclohexanoide Produkte (s. Abb. 3.23) herzustellen sowie ob dabei eine Bevorzugung bestimmter Produkte festgestellt werden konnte. Unterschiedliche Produktspektren verschiedener Varianten würden daher Hinweise dazu liefern, welche Aminosäurepositionen für die Handhabung auftretender Carbokationen relevant sein können. Dazu wurde die Bibliothek der *Aac*SHC-

Einzelmutanten zunächst in Ganzzell-Biotransformationen gegenüber der Isomerisierung von (+)- β -6 gescreent. Das Screening erlaubte die Identifizierung von sieben Aminosäurepositionen, an denen Modifikationen (hin zu großen bzw. kleinen hydrophoben Aminosäuren) zu einer erheblichen Verschiebung des Produktspektrums im Vergleich zum Wildtyp-Enzym führte. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass die betreffenden Aminosäurereste zu einer gewissen Plastizität der Enzymkavität beitrugen und dadurch die Stabilisierung auftretender Kationen beeinflussen konnten. Die Lage dieser Positionen (L36, W312, F365, A419, V448, G600, Y609) innerhalb der aktiven Tasche ist im Modell in Abb. 3.24 (rechts) veranschaulicht. Das Balkendiagramm (links) zeigt exemplarisch Mutationen zweier Positionen, an denen Aminosäuresubstitutionen im Ganzzell-Screening bzgl. der Isomerisierung von (+)- β -6 deutlich veränderte der Produktverteilungen hervorriefen.^[96]

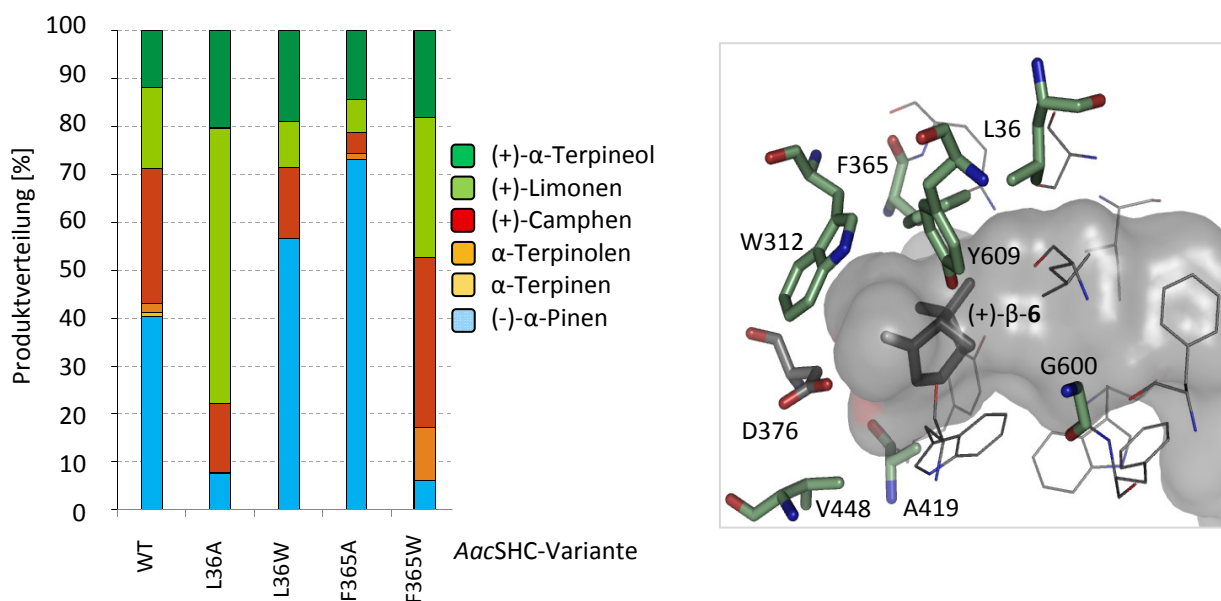


Abbildung 3.24: Links: Balkendiagramm zum Screening von AacSHC-Varianten in Ganzzell-Biotransformationen (50 °C, 96-Deepwell-Platten) bzgl. der Umsetzung von (+)- β -Pinen (+)- β -6. Beispielhaft sind hier AacSHC-Varianten zweier Aminosäurepositionen gezeigt, aus denen hervorgeht, dass die eingeführten Modifikationen zu deutlichen Verschiebungen des Produktspektrums führten. Gebildete Produkte sind der Legende (mittig) zu entnehmen. Rechts: Modell der aktiven Tasche des AacSHC-Wildtyps (graue Oberfläche). Als Stabmodell sind die katalytische Asparaginsäure D376 (rot) sowie sieben Aminosäurepositionen (dunkelgrün) abgebildet, welche sich im Screening als relevant für die Beeinflussung der Produktverteilung erwiesen hatten.

Diese Beobachtung wies darauf hin, dass die unterschiedlichen Formen aktiver Taschen - dargestellt durch die Mutantenbibliothek - in der Tat in der Lage waren, die im Reaktionsverlauf auftretenden Kationen und damit die Produktbildung signifikant zu beeinflussen. Die Identifizierung solcher Positionen innerhalb der aktiven Tasche führte zu der Frage, ob sich das Produktspektrum der Isomerisierung von (+)- β -6 durch weiteres Ummodellieren der reaktiven Umgebungen weiter verändern oder sogar in eine bestimmte Richtung dirigieren ließe. Um eine möglichst diverse hydrophobe Mutantenbibliothek für diesen Zweck zu schaffen, wurde mittels 22c-Trick^[97] an den sieben, oben genannten Aminosäurepositionen Sättigungsmutagenese durchgeführt.^[96] Die daraus resultierende Bibliothek wurde in Ganzzellumsetzungen im 96-Deepwell-Platten-Format hinsichtlich neuer, veränderter Produktspektren bzgl. der Isomerisierung von (+)- β -6 untersucht. Abb. 3.25 gibt eine Übersicht zu einigen interessanten AacSHC-Varianten, welche in diesen Experimenten identi-

fiziert wurden und verdeutlicht die Bandbreite unterschiedlicher Terpenprodukte, welche mit verschiedenen Enzymmutanten adressiert werden konnte.

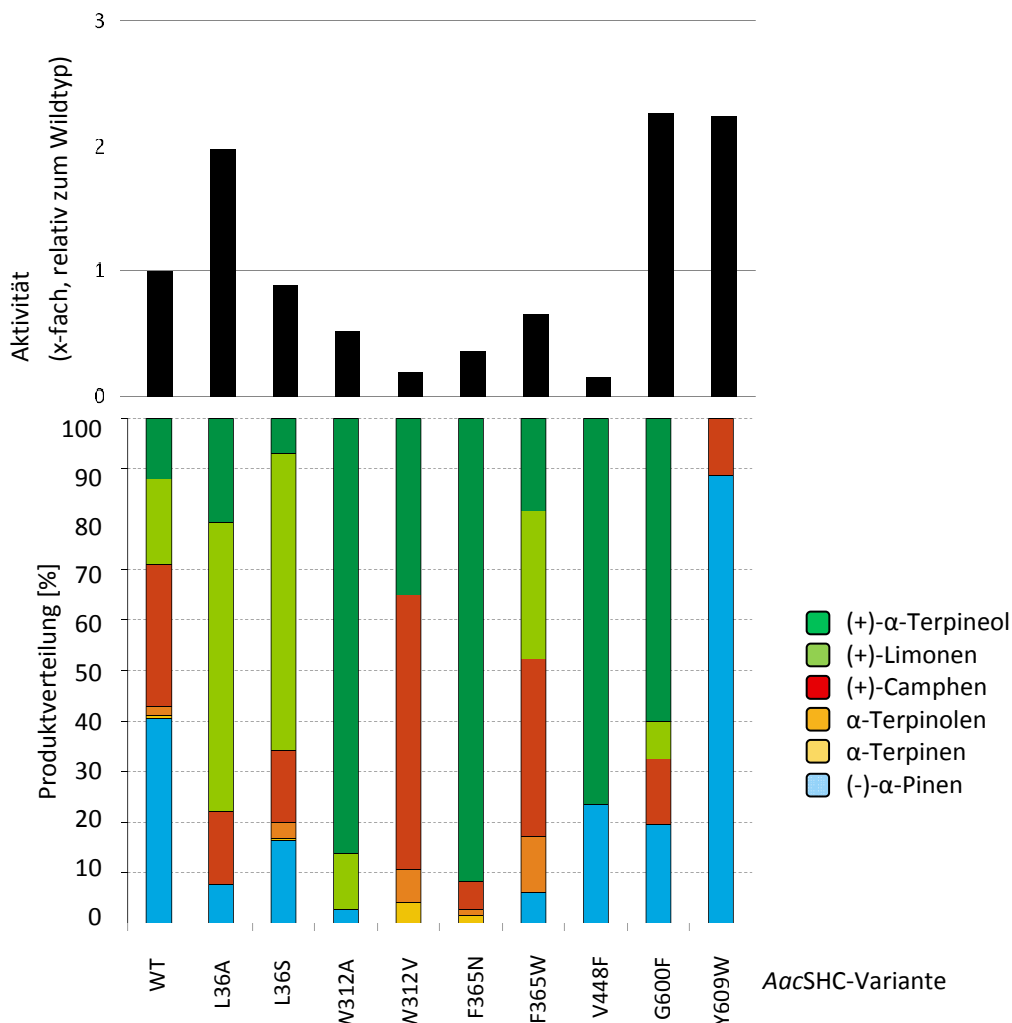


Abbildung 3.25: Balkendiagramm unten: Ganzzell-Biotransformationen von (+)-β-Pinen mit *AacSHC*-Varianten bei 50 °C in 96-Deepwell-Platten lieferten die Produkte (+)-α-Terpineol, (+)-Limonen, (+)-Camphen, α-Terpinolen, α-Terpinen, (-)-α-Pinen mit unterschiedlichen Produktverteilungen in Abhängigkeit von der verwendeten Mutante. Farbcode siehe Legende rechts. Balkendiagramm oben: Relative Aktivitäten der Varianten im Vergleich zur Wildtyp-Aktivität (WT).

Innerhalb der *AacSHC*-Mutanten waren signifikante Variationen hinsichtlich der Produktverteilungen festzustellen. So lieferte bspw. *AacSHC*-Variante W312A drei Produkte, wovon (+)-α-Terpineol das Hauptprodukt darstellte, wohingegen *AacSHC*-Variante Y609W hauptsächlich (-)-α-Pinen sowie geringe Mengen an (+)-Camphen als einzigem weiteren Nebenprodukt bildete. Aktivitäten lagen dabei im Bereich von 10 % Umsatz bezogen auf das eingesetzte Substrat und sind in Abb. 3.25 relativ zur Aktivität des *AacSHC*-Wildtyp-Enzyms angegeben. Anschließend wurden Biotransformationen mit gereinigtem Enzym durchgeführt und mit den Ganzzellumsetzungen verglichen. Dadurch sollten eventuelle Neben- oder Hintergrundreaktionen, bspw. durch *E. coli*-eigene Enzyme, gelöste Cofaktoren o.ä. ausgeschlossen und die SHC-katalysierte Reaktion somit isoliert untersucht werden. Dazu wurden zwölf *AacSHC*-Varianten gewählt, welche in 96-Deepwell-Platten-Screenings vielversprechende Ergebnisse bzgl. der Produktverteilungen geliefert hatten. Dabei handelte es sich

um *AacSHC*-Variante L36A, L36C, L36S, L36V, W312A, W312V, F365L, F365N, F365W, V448F, G600F und Y609W. Diese Varianten wurden, ebenso wie *AacSHC*-Wildtyp und Knockout-Variante D376C, über IEX gereinigt, um zellfreie Enzympräparationen für die Biotransformationen zu erhalten. Außerdem wurde der Einfluss von Detergenz und Temperatur in Umsetzungen mit gereinigten Enzymvarianten und (+)- β -6 untersucht, um das Reaktionssetup dahingehend optimieren und Nebenreaktionen unterdrücken zu können. Testansätze wurden in reinem 12 mM Citrat-Puffer mit pH 6,0 sowie in Enzymlösung mit gereinigtem *AacSHC*-Wildtyp (WT) sowie Knockout (D376C) durchgeführt. Als Detergenzien wurden Triton X-100 und CHAPS sowie jeweils Temperaturen von 30 °C und 50 °C getestet. Alle Testansätze wurden für 40 h bei 600 μ M inkubiert, zweifach mit Ethylacetat extrahiert und gaschromatographisch analysiert. In Anhang sind unter A.4 einige Polyacrylamidgele abgebildet, anhand derer die Reinigungseffizienz und Vergleichbarkeit der *AacSHC*-Varianten kontrolliert wurde. Dies evaluierte, dass die verwendeten Enzympräparationen für die Untersuchungen optimierter Reaktionsbedingungen sowie die Biotransformationen vergleichbare und ausreichende Konzentrationen sowie Reinheiten aufwiesen. Da die niedrigsten Nebenreaktionen für Umsetzungen bei 30 °C und mit Triton X-100 als Detergenz ermittelt wurden, wurden im Folgenden alle weiteren Biotransformationen mit gereinigten *AacSHC*-Varianten unter diesen Bedingungen durchgeführt. Für die Umsetzungen mit gereinigten Enzymlösungen ist in Abb. 3.26 beispielhaft eine Überlagerung verschiedener GC-Chromatogramme gezeigt, welche die Unterschiedlichkeit der Produktspektren innerhalb der Varianten hervorhebt. Ergänzend dazu ist in Abb. 3.27 eine Übersicht über einige der interessantesten Produktverteilungen der Biotransformationen mit gereinigten *AacSHC*-Varianten gezeigt.

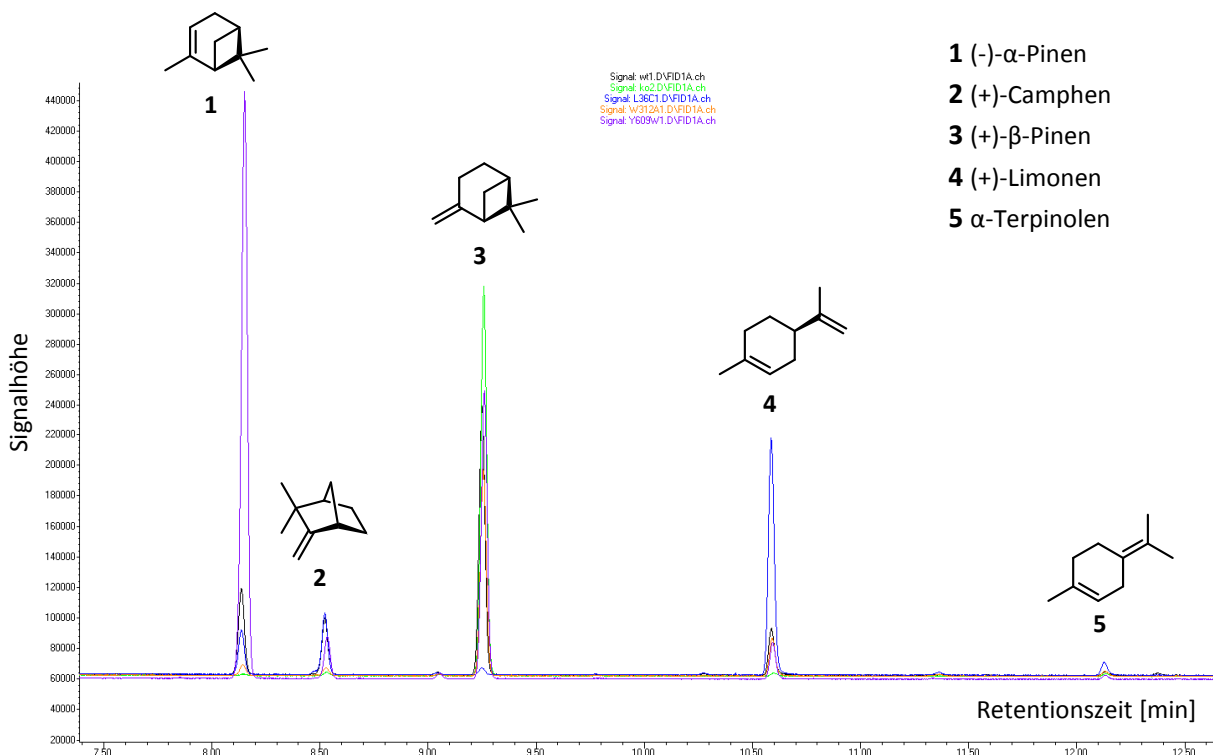


Abbildung 3.26: Überlagerung mehrerer GC-Chromatogramme zur Analytik der Biotransformationen von (+)- β -Pinen mit gereinigten Enzymlösungen des *AacSHC*-Wildtyps (schwarz) sowie der Varianten *AacSHC*/W312A (orange), *AacSHC*/L36C (blau) und *AacSHC*/Y609W (lila). Als Negativkontrolle diente Knockout-Variante *AacSHC*/D376C (grün).

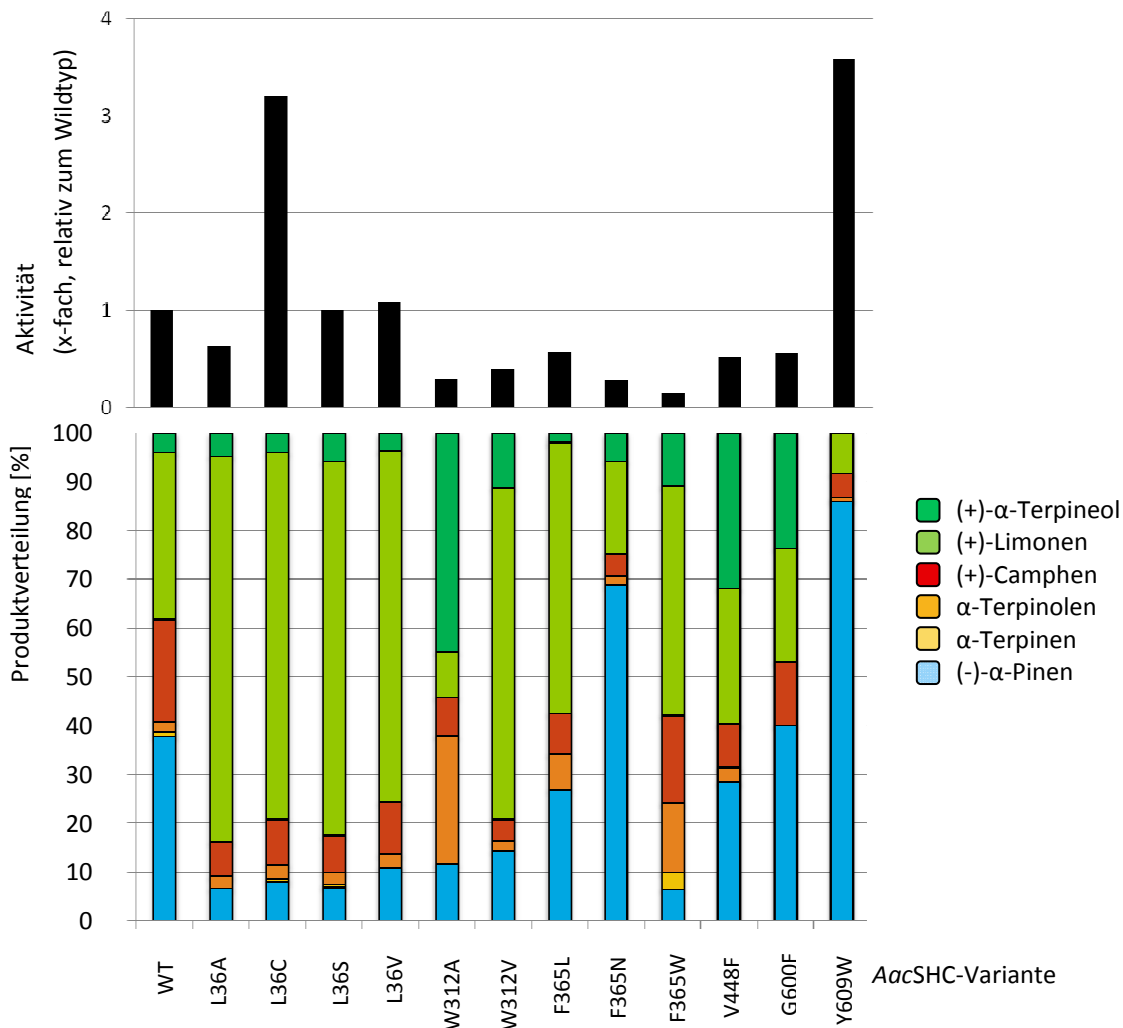


Abbildung 3.27: Balkendiagramm unten: Biotransformationen von (+)-β-Pinen mit gereinigten *AacSHC*-Varianten bei 30 °C lieferten die Produkte (+)-α-Terpineol, (+)-Limonen, (+)-Camphen, α-Terpinolen, α-Terpinen und (-)-α-Pinen mit unterschiedlichen Produktverteilungen in Abhängigkeit von der verwendeten Mutante. Farbcode siehe Legende rechts. Balkendiagramm oben: Relative Aktivitäten der Varianten im Vergleich zur Wildtyp-Aktivität (WT).

Während *AacSHC*-Wildtyp und *AacSHC*-Variante W312A geringere Aktivitäten sowie ein eher breit gefächertes, unspezialisiertes Produktspektrum besaßen, bildete bspw. *AacSHC*/L36A deutlich bevorzugt (+)-Limonen, während *AacSHC*/Y609W (-)-α-Pinen als Hauptprodukt lieferte. Weiterhin verdeutlicht ein Vergleich von *in vivo* und *in vitro*-Experimenten, dass für die selbe Enzymvariante zwischen Ganzzellumsetzungen und der Verwendung von gereinigter Enzymlösung signifikante Unterschiede im erhaltenen Produktspektrum festzustellen waren (vgl. Abb. 3.27 und Abb. 3.27).

3.2.4 Die enzymatische Spirocyclisierung allylischer Alkohole

Die Spirocyclisierung allylischer Alkohole kann unter Verwendung von Enzymen z.B. Brønsted-Säure-katalysiert in Form einer Semi-Pinacol-Umlagerung stattfinden. Mechanistische Gemeinsamkeit mit den zuvor beschriebenen Reaktionstypen ist das Vorausgehen eines *in situ* gebildeten, stabilisierten Carbokations, welches als Elektrophil eine intramolekulare Umlagerung induziert. Semi-Pinacol-Umlagerungen sind in der Regel vielfältig einsetzbar, dabei stereospezifisch, erlauben den raschen Aufbau relativ komplexer molekularer Strukturen und stellen daher eine wichtige Technik zur Bildung quaternärer Kohlenstoff(stereo)zentren dar. Diese sind oftmals wichtiger Bestandteil diverser synthetischer Bausteine, bioaktiver Verbindungen und medizinischer Wirkstoffe, weshalb diese Methode für die Anwendung in der Totalsynthese von Naturstoffen äußerst nützlich ist.^{[98]-[100]} In dieser Arbeit wurde daher geprüft, inwiefern sich AacSHC-Varianten als enzymatische Alternative auch für diesen Reaktionstyp eignen. Weiterhin wurde untersucht, ob aufgrund der strukturellen Gegebenheiten der AacSHC eine Präferenz der Cyclase bzgl. bestimmter Ringgrößen (sowohl im bicyclischen Substrat als auch im spirocyclischen Produkt) festzustellen war. Die hierfür verwendeten Substanzverbindungen **7**, **9**, **11**, **13** sowie Produkte **8**, **10**, **12** und **14** wurden wie in 2.14 beschrieben zunächst chemisch synthetisiert, über GC-FID/MS und NMR charakterisiert und die allylischen Alkohole anschließend zeitnah in Biotransformationen mit gereinigten AacSHC-Varianten der Mutantenbibliothek getestet. Dazu wurden diejenigen AacSHC-Mutanten verwendet, welche in vorherigen Screenings gegenüber Citronellal Aktivität gezeigt hatten, d.h. prinzipiell dazu in der Lage waren, kürzerkettige, nicht natürliche Substrate und Funktionalitäten zu akzeptieren und umzusetzen. Weiterhin wurden nur solche Varianten eingesetzt, welche durch die eingeführten Modifikationen *vergrößerte* aktive Taschen besaßen, da die bicyclischen Testsubstrate sterisch vglw. anspruchsvolle Verbindungen darstellten, für deren Spirocyclisierung ein erhöhter Platzbedarf innerhalb der aktiven Tasche bestand. Während **7** und **9** gut bis exzellent umgesetzt werden konnten und 10 % bis vollständigen Umsatz zeigten, blieben die Umsätze für **11** gering (< 3 %). Im Falle von **13** war sogar nur geringfügige Aktivität (Produktbildung im Spurenbereich) detektierbar. Beispielhaft sind dazu in Abb. 3.28 und Abb. A.22 verschiedene GC-Chromatogramme der Analytik von Biotransformationen gereinigter AacSHC-Varianten mit allylischen Alkoholen unter Bildung der entsprechenden spirocyclischen Produkte abgebildet. Die angegliederten Balkendiagramme geben anschließend eine zusammenfassende Übersicht über diejenigen Mutanten, welche signifikante Aktivitäten gegenüber den getesteten Bicyclen aufwiesen (Abb. 3.29 bis Abb. 3.31).

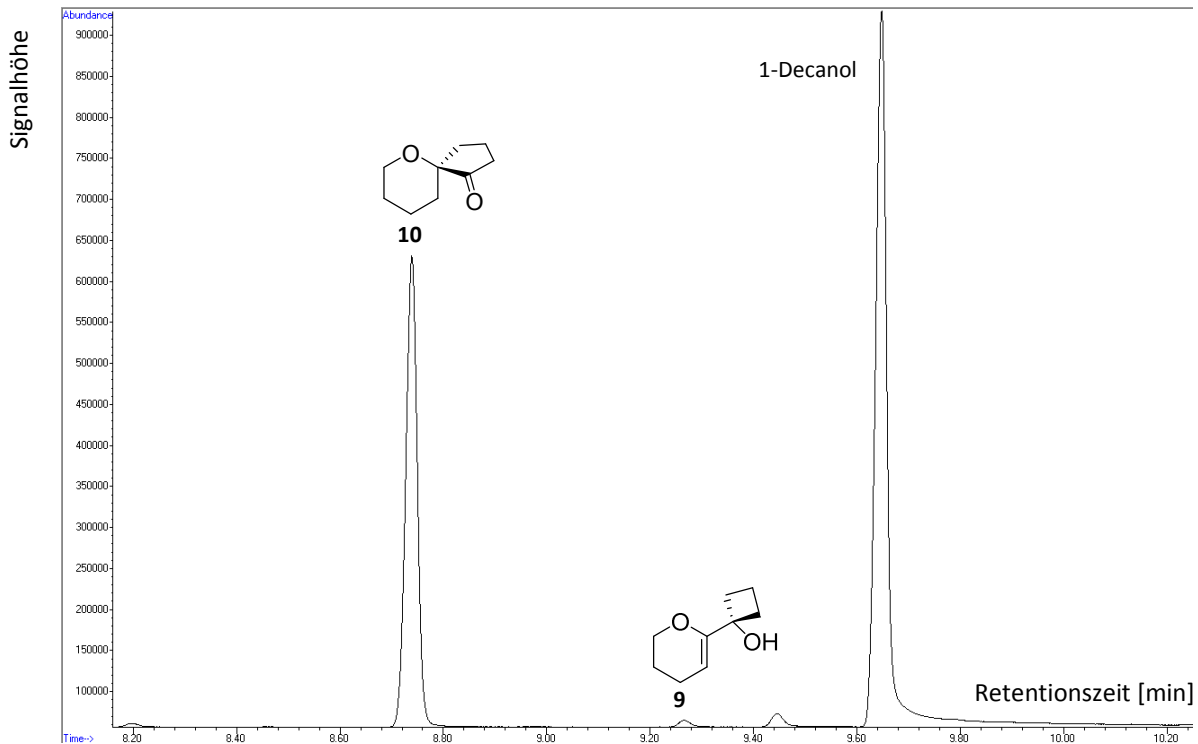


Abbildung 3.28: GC-Chromatogramm zur Analytik der Biotransformationen von **9** (9,27 min) zu **10** (8,74 min) mit gereinigter *AacSHC*-Variante Y609G. Signale von Substrat und Produkt, sowie externem Standard (1-Decanol) sind entsprechend beschriftet.

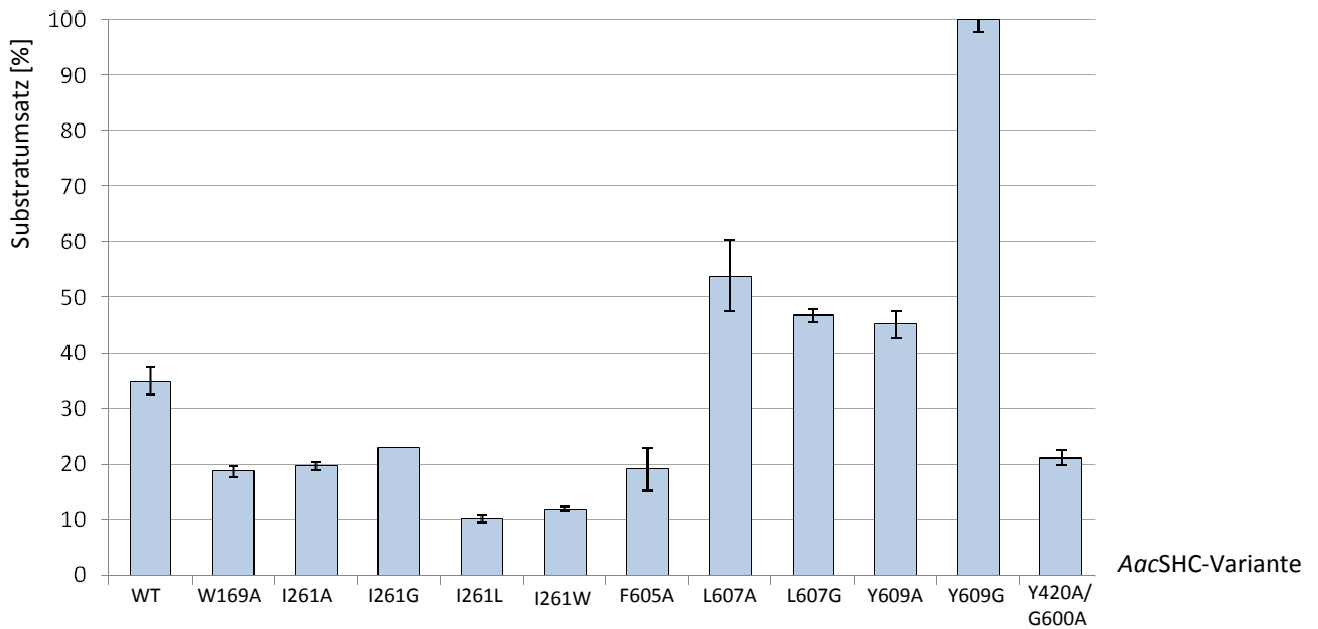


Abbildung 3.29: Balkendiagramme zur Umsetzung von **9** zu **10** mit gereinigten *AacSHC*-Varianten (Angaben prozentual bezogen auf eingesetztes Substrat).

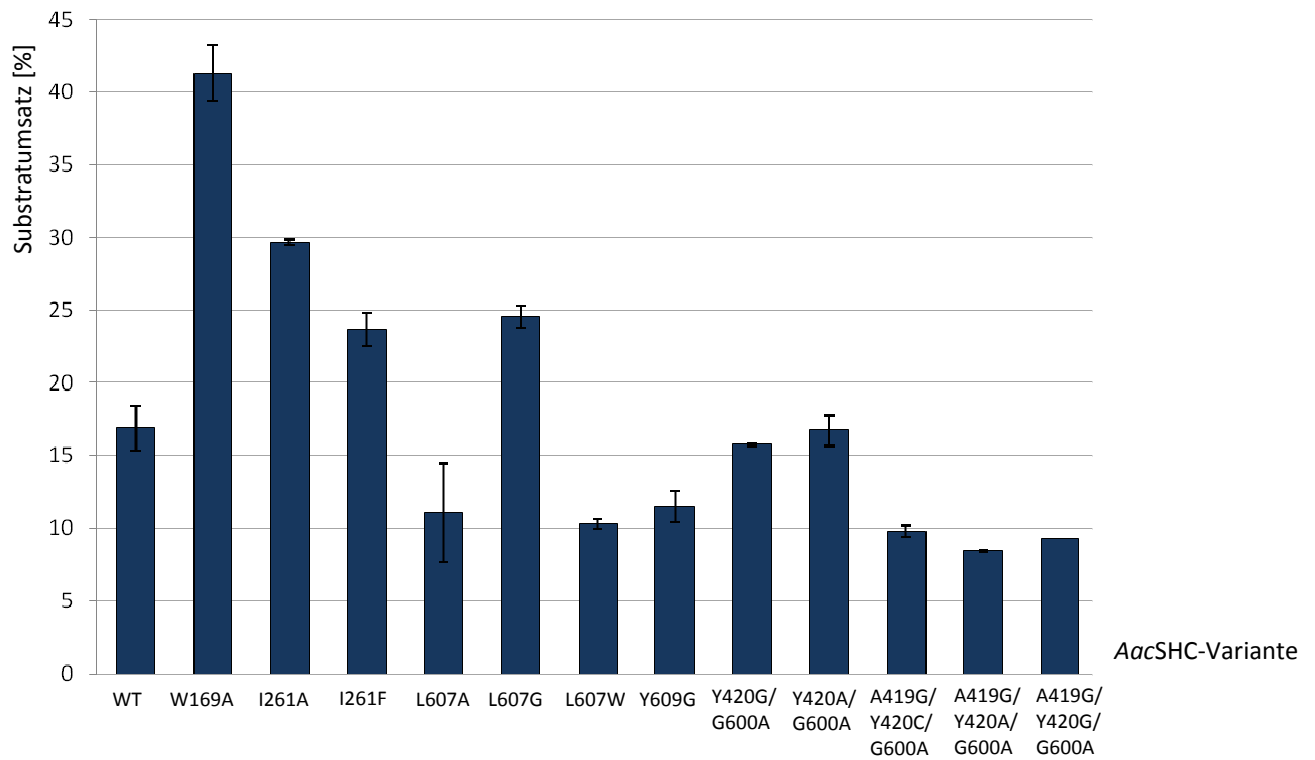


Abbildung 3.30: Balkendiagramme zur Umsetzung von **7** mit gereinigten *AacSHC*-Varianten unter Bildung von **8**. Angaben in % (bezogen auf Substrat).

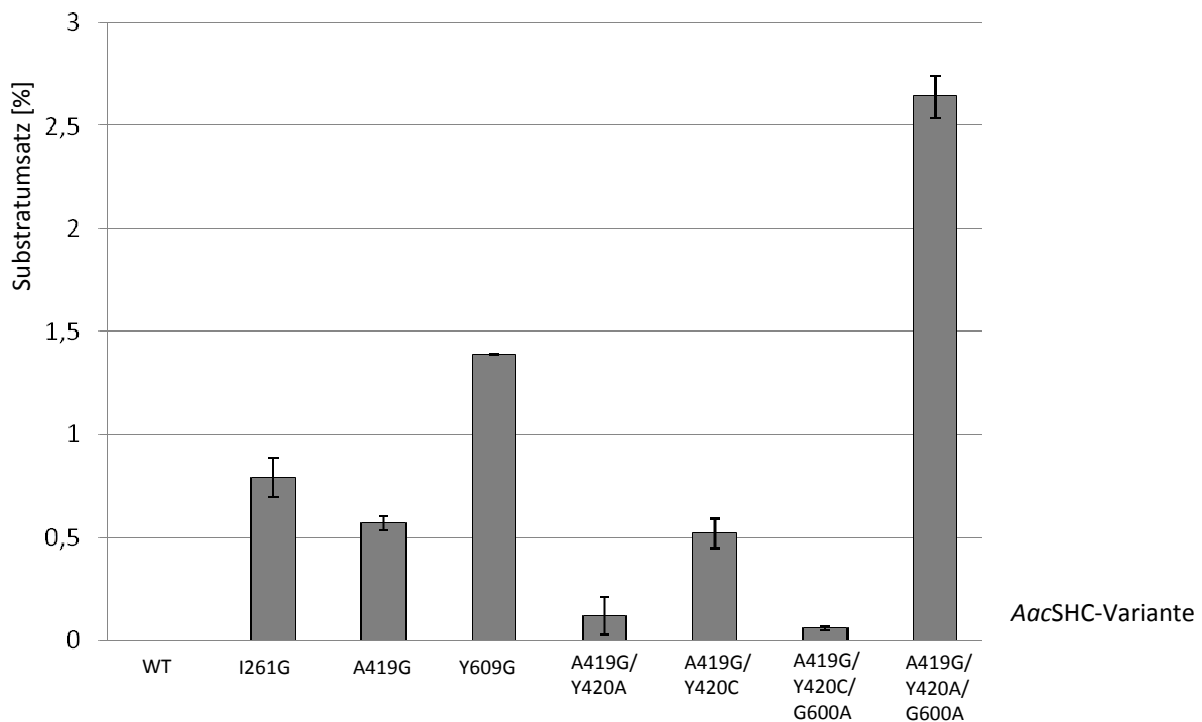


Abbildung 3.31: Balkendiagramme zur Umsetzung von **11** mit gereinigten *AacSHC*-Varianten unter Bildung von **12**. Angaben in % (bezogen auf eingesetztes Substrat).

IV DISKUSSION

4.1 Herstellung und Reinigung von *ZmoSHC1*-Varianten für die Kristallstrukturaufklärung

4.1.1 Zur Notwendigkeit der Kristallstrukturaufklärung von *ZmoSHC1*

Zymomonas mobilis Squalen-Hopen Cyclase 1 (*ZmoSHC1*) hatte in vorherigen Arbeiten bereits eine besondere, von anderen SHCs abweichende Cyclisierungsaktivität gezeigt und schien kleinere Terpensubstrate bevorzugt umzusetzen. Möglicherweise wies *ZmoSHC1* also ebenfalls promiskuitive Eigenschaften auf, welche sich im Gegensatz zu *AacSHC* jedoch auf kleinere terpenoide Substrate anwenden ließen. Damit würde eine Reihe neuer Brønsted-Säure-katalysierter Reaktionen erschlossen, welche zur Herstellung zahlreicher bioaktiver Verbindungen dienen könnten. Beispiel einer solchen Reaktion ist die in vorliegender Arbeit behandelte Cyclisierung von Citronellal zu Isopulegol, welche aufgrund ihrer Anwendbarkeit in der Synthese des Duft- und Aromastoffes (-)-Menthol von industriellem Interesse ist. Um sich jedoch genauer mit dem Substrat- und Produktspektrum dieser Cyclase auseinandersetzen zu können, ist das Vorhandensein einer Kristallstruktur eine wichtige Voraussetzung – diese konnte allerdings bis heute noch nicht aufgeklärt werden. Das mittels 3DM-Datenbank erstellte *strukturbasierte* Modell der *ZmoSHC1* ermöglichte durch eine vereinheitlichende Nomenklatur der Aminosäuren den direkten Vergleich „strukturell gleicher“ Aminosäuren, also derjenigen Aminosäuren, die in der Grundstruktur (*core structure*) innerhalb verschiedener Terpensynthesen an gleicher Stelle positioniert waren. Außerdem ist aufgrund der hohen Konserviertheit der, das aktive Zentrum aufbauenden Aminosäuren ein direkter Vergleich dieser Bereiche innerhalb verschiedener SHCs anhand von Sequenzalignments möglich. So lassen sich Modifikationen bestimmter Aminosäurereste prinzipiell leicht auf die entsprechenden Positionen anderer SHCs übertragen und die dadurch hervorgerufenen Effekte miteinander abgleichen. Trotz dieser Möglichkeiten konnten die ausgeprägten reaktiven Unterschiede, welche zwischen *AacSHC* und *ZmoSHC1* beobachtet werden, bisher nicht genau erklärt werden. Auch konnten durch die Reduzierung auf strukturell konservierte Bereiche innerhalb des 3DM-Datensatzes keine weiteren Erkenntnisse hinsichtlich des N-terminal überhängenden Bereiches der *ZmoSHC1* erhalten werden. Die Möglichkeit, dass es sich dabei um einen intrinsisch unstrukturierten Bereich handelt, also um einen Strukturbereich, dem eine strukturierte Form unter physiologischen Bedingungen *per se* fehlt, besteht zwar, ist allerdings sehr gering.^{[101]-[103]} Ein Vergleich der ersten 55 Aminosäuren dieser N-terminalen Aminosäuresequenz über das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) lieferte auf Nukleotidebene keinerlei Treffer, d.h. verwandte Gensequenzen. Auf Proteinebene wurde nur eine einzige, mit ca. 37 % Sequenzidentität eher entfernt verwandte Aminosäuresequenz einer Pyrophosphatase aus *Geobacillus caldoxylsilyticus* (WP_017435689.1) gefunden, welche eine gewisse Ähnlichkeit mit diesem Abschnitt besaß.

Da korrelierende Aminosäurepositionen im strukturbasierten (3DM-)Modell in einem katalytisch nicht aktiven Strukturbereich inmitten einer der beiden Domänen des Enzyms lokalisiert waren, ließe sich die Vermutung aufstellen, dass der zugrundeliegende Terpensynthesen-Datensatz nicht ausreichend angepasst worden war. Eine spezifischere Auswahl verwendeter Kristallstrukturen hätte dem eventuell entgegenwirken können. Weiterhin ist es möglich, dass *ZmoSHC1* aufgrund der bereits erwähnten funktionellen Besonderheit auch strukturell vielen anderen Terpensynthesen eher unähnlich ist. Ein Vergleich mit „regulären“ Triterpensynthesen würde daher ein zutreffendes Strukturmodell der *ZmoSHC1* vmtl. gar nicht liefern können. Eventuell wäre hier also ein ausschließlicher Vergleich mit Mono- oder Diterpencyclasen geeigneter gewesen. Diese Unähnlichkeit unterstreicht jedoch deutlich die Einzigartigkeit der *ZmoSHC1* gegenüber anderen

SHCs. Umso wichtiger und spannender wäre deshalb die Aufklärung der Kristallstruktur der *ZmoSHC1*, um strukturelle Details und vor allem Unterschiede des Enzymaufbaus aufdecken zu können. Auch für die gezielte Mutagenese der Cyclase zur Beeinflussung katalytischer Fähigkeiten (wie Selektivitäten, Substratspezifitäten oder der Umsetzbarkeit kleiner, nicht-natürlicher Terpene) wären solche Kenntnisse von entscheidendem Vorteil. Die in vorliegender Arbeit beschriebenen Experimente stellten als Teil eines Kooperationsprojektes (mit Dr. A.M.W.H. Thunnissen, Laboratory of Biophysical Chemistry, RUG, Groningen, Niederlande) entscheidende (Vor)arbeiten für die darauf folgenden Kristallisationsstudien dar.

4.1.2 *ZmoSHC1*-Varianten für die Kristallisierung

Um geeignete Bedingungen für die Kristallisierung zu finden, waren in dieser Arbeit *ZmoSHC1*-Deletionsmutanten generiert und ein Verfahren zur Proteinreinigung erstellt worden. Grund für die Erstellung dieser Varianten war das Vorhandensein des unstrukturierten N-terminalen Bereiches. Eine solche frei bewegliche, vergleichsweise weit aus dem eher globulären Enzymkorpus herausragende Aminosäuresequenz wäre aufgrund ihrer Beweglichkeit sowohl für den Reinigungsprozess (Instabilität, Denaturierung, Präzipitation) als auch die Kristallisierung (inhomogene Kristallpackung, niedrige, unscharfe Strukturauflösung) problematisch. Da angenommen wurde, dass dieser Bereich des Enzyms keine katalytische oder stabilisierende Funktion besitzt, wurde davon ausgegangen, dass eine Deletion in diesem Bereich keinen direkten Einfluss auf die Aktivität des Enzyms haben würde. Der Umfang der N-terminalen Deletionen orientierte sich dabei an den in 3.1.2 beschriebenen, sequenziellen und strukturellen Kriterien, wobei die Klonierung der entsprechenden Mutanten problemlos im ebenfalls dort beschriebenen Plasmidvektor erfolgte. Nicht nur Deletionen wurden auf gentechnischem Wege in die *ZmoSHC1*-Varianten eingefügt. So wurden diese auch mit einem zusätzlichen Polyhistidin-Tag für die Reinigung über Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) versehen. Dabei wurden sowohl verschieden lange Polyhistidinsequenzen (His_6 , His_{10}) als auch unterschiedliche Loci (C-terminal, N-terminal) getestet. Versuchsweise wurden außerdem zwischen Zielprotein und Affinitäts-Tag verschiedene Schnittstellen für Proteasen (Enterokinase, Factor Xa) für die spätere enzymatische Abspaltung des Tags addiert. Das Einbringen der Schnittstellen hatte keinen merklichen Einfluss auf Proteinbiosynthese, Löslichkeit, Reinigung oder Aktivität der *ZmoSHC1*-Varianten. Ein verlängerter Polyhistidin-Tag ergab dabei gegenüber dem His_6 -Tag keinerlei Verbesserung während des IMAC-Schrittes – im Gegenteil führte die Anbringung eines N-terminalen His_{10} -Tags nach der Enzym-Solubilisierung größtenteils sogar eher zu unlöslich pelletiertem Zielprotein. Auch Versuche, die Reinigung über IMAC durch einen Wechsel des verwendeten Metallions zu optimieren, waren nicht zielführend. So waren zu Testzwecken auch mit Co^{2+} statt Ni^{2+} beladene Gravitationsdurchfluss-Säulen für IMAC-Läufe verwendet worden – allerdings wurde für alle Varianten ein vergleichsweise schlechteres Bindungsvermögen bei der Verwendung von Co^{2+} -Ionen festgestellt, sodass große Mengen des Zielproteines direkt im Auftragungsschritt wieder von der Säulenmatrix gespült wurden. Obwohl Cobalt(II)ionen in der Literatur oft wegen ihrer häufig besseren Bindeeigenschaften in der IMAC als Ersatz für Nickel(II)ionen beschrieben und verwendet werden, waren für die Reinigung der hier verwendeten *ZmoSHC1*-Varianten Nickel(II)ionen eindeutig effektiver.

4.1.3 Studien zur Herstellung der *ZmoSHC1*-Varianten in *E. coli*

Die Proteinbiosynthese lieferte in *E. coli* C43(DE3) für alle *ZmoSHC1*-Varianten vergleichbare Enzymmengen und dabei über 90 % lösliches Protein (visuelle Analyse über Polyacrylamidgele). In *E. coli* BL21(DE3) konnte lediglich der *ZmoSHC1*-Wildtyp in zufriedenstellender Menge als lösliches Protein erhalten werden - Variante *ZmoSHC1_d1-27* wurde in *E. coli* BL21(DE3) nur geringfügig exprimiert und Varianten *ZmoSHC1_d1-65* sowie *ZmoSHC1_d671-696* waren größtenteils als unlösliche Aggregate pelletiert. Außerdem besaßen alle, in *E. coli* C43(DE3) produzierten Enzyme eine deutlich höhere Aktivität gegenüber den Testsubstraten Geranylaceton und Squalen, als dies für diejenigen Enzyme der Fall war, welche in *E. coli* BL21(DE3) hergestellt wurden. Von letzteren war nur das Wildtyp-Enzym aktiv, wohingegen *ZmoSHC1_d1-27*, *ZmoSHC1_d1-65* sowie *ZmoSHC1_d671-696* keinerlei Aktivität gegenüber den Testsubstraten zeigten. Die geringere Biosynthese löslicher Proteine bei gleichzeitigem Aktivitätsverlust waren Indizien dafür, dass die korrekte Proteinfaltung in *E. coli* BL21(DE3) vergleichsweise schlechter möglich war, während dies in *E. coli* C43(DE3) deutlich problemloser bewerkstelligt werden konnte. Diese Beobachtung bestätigt die Effektivität dieses *E. coli*-Stammes hinsichtlich der Expression rekombinanter Proteine.^[104] Aufgrund des geplanten Proteinreinigungsvorgangs über IMAC war außerdem der Einsatz eines alternativen Puffersystems nötig: Obwohl in vorherigen Arbeiten für Biotransformationen mit *ZmoSHC1* bereits erfolgreich Citratpuffer (pH 6,0) eingesetzt wurde, konnte dieser aufgrund seiner Inkompatibilität mit IMAC nicht für den Proteinreinigungsprozess verwendet werden. Stattdessen wurde ein Kaliumphosphat-Puffersystem (pH 7,0) eingesetzt, in welchem der *ZmoSHC1*-Wildtyp ebenfalls Aktivität zeigte.

Eine weitere wichtige Stellschraube des Reinigungsprozesses war die Wahl eines geeigneten Detergens zur Solubilisierung der Membranproteine aus den *E. coli*-Zellen. Detergenzien hierfür müssen –neben der Herauslösung der Zielproteine aus der Membran selbst- über weitere Fertigkeiten verfügen: So kann bspw. die Stabilität des Zielproteins in Lösung signifikant vom verwendeten Detergens beeinflusst werden. In vorherigen Arbeiten an diesem Institut wurde außerdem gezeigt, dass auch die Aktivität einer SHC bzgl. eines bestimmten Substrates in Abhängigkeit vom jeweils verwendeten Detergens deutlich variieren kann. Diese Beobachtung wurde in der Literatur bereits ebenfalls für andere Membranproteine beschrieben.^{[105],[106]} Des Weiteren war zuvor bereits gezeigt worden, dass ebenso die Konzentration eines verwendeten Detergens ein entscheidender Faktor für die Enzymaktivität ist. Durch Variation der Tensidkonzentration verändert sich in Abhängigkeit der stoffspezifischen CMC dessen Aggregationszustand. Durch das Einstellen bestimmter Detergenkonzentrationen lässt sich so das Vorliegen freier, ungeordneter Tensidmoleküle oder dessen Anordnung zu Mizellen gezielt steuern. Dieser Faktor kann wiederum die Wechselwirkungen zwischen solubilisiertem Enzym und dessen Umgebung, wie bspw. die Verfügbarkeit von Substraten für das Enzym, erheblich beeinflussen. Bis heute ist jedoch nur vergleichsweise wenig über die genaue Wirkung von Detergenzien oder Mizellen auf Enzymaktivitäten bekannt.^{[107],[108]} Vor allem ist bei der Auswahl des Detergens stets auch die Wahl der zu verwendenden Reinigungstechniken, Säulenmaterialien oder eventueller Dialyse- oder Filtrationschritte zu beachten, für welche das Detergens ebenfalls kompatibel sein muss. In dieser Arbeit hatte sich CHAPS in Voruntersuchungen als adäquat erwiesen: Es war für die Solubilisierung der *ZmoSHC1*-Varianten aus der Zellmembran gut geeignet, war kompatibel mit allen präparativen (Dialyse, Filtration) sowie chromatographischen Schritten (IMAC, SEC), welche für den Reinigungsprozess geplant waren und hatte sich zudem vor allem für die Biotransformationen mit kleineren Terpen-substraten als hilfreich erwiesen. Zur Überprüfung der nachfolgenden Proteingewinnung, -isolation sowie des Reinigungserfolges wurden Polyacrylamidgele mittels sensitiver kolloidaler Coomassie-Färbung gefärbt. Diese Technik wurde bereits in der Literatur mehrfach (mit einer Sensitivität bis zu

1 ng/Bande) als zuverlässige Methode zur Visualisierung der Reinheit einer Proteinprobe beschrieben und eignete sich daher hervorragend, um die Effektivität einzelner Schritte im Verlauf des Reinigungsprozesses zu analysieren.^{[87],[89]}

4.1.4 Reinigung und Charakterisierung der *ZmoSHC1*-Varianten

4.1.4.1 Reinigung über Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die Anreicherung und Vorreinigung der, mit einem C-terminalen His₆-Affinitäts-Tag versehenen *ZmoSHC1*-Mutanten über Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) war für fast alle Varianten sehr gut durchführbar und lieferte zufriedenstellende Mengen aktiver, gereinigter Cyclasevarianten (0,95 – 6,82 mg aus 42,7 g Zellmasse, s. 3.1.5). Einzig Variante *ZmoSHC1_d671-696*, die Mutante mit deletierter intermediärer Loopsequenz, zeigte kein bis nur geringes Bindungsvermögen an das Säulenmaterial. Der Western Blot mit (positivem) Antikörpernachweis ergab, dass ein Fehlen des His₆-Tags als Ursache hierfür ausgeschlossen werden konnte. Diese Beobachtung konnte ein Hinweis darauf sein, dass die eingebrachte Modifikation weiterreichende Veränderungen in der Enzymstruktur (partielle Entfaltung) bewirkt hatte, wodurch das C-terminale Polyhistidin-Tag nicht mehr ausreichend exponiert vorlag. Für Varianten *ZmoSHC1_d1-27*, *ZmoSHC1_d1-58*, *ZmoSHC1_d1-65* und den *ZmoSHC1*-Wildtyp hingegen konnte die Reinigung über IMAC erfolgreich und mit vergleichbarer Effizienz durchgeführt werden, wobei für *ZmoSHC1_d1-27* und *ZmoSHC1_d1-65* etwas geringere Ausbeuten an gereinigtem Enzym erhalten wurden. Die Reinheit der Enzymlösungen war innerhalb der Varianten vergleichbar hoch (> 90 %, s. 3.1.5.1) und jede *ZmoSHC1*-Variante konnte zweifelsfrei mittels Immundetektion identifiziert werden.

Die Tatsache, dass die durchgeführten strukturellen Modifikationen nicht unerheblichen Einfluss auf die Enzymstabilität hatten, zeigte sich ebenfalls vor allem in der unterschiedlichen Tendenz der Varianten zur Präzipitation sowie im unterschiedlichen Ausmaß des Aktivitätsverlustes im Verlauf des Reinigungsprozesses. Dabei wurde festgestellt, dass die *ZmoSHC1*-Varianten während der Lagerung über Nacht bei 4 °C als verdünnte Lösungen vergleichsweise stabil blieben - konzentriertere Proteinlösungen neigten hingegen deutlich schneller zur Präzipitation. Vor allem die Varianten *ZmoSHC1_Δ27*, *ZmoSHC1_Δ58* und *ZmoSHC1_Δ65* waren dabei im Vergleich zum Wildtyp-Enzym deutlich stabiler, während letzteres signifikant früher und stärker denaturierte. Dies kann vermutlich mit der Verkürzung des abstehenden N-terminalen Bereiches begründet werden, der im Falle des Wildtyps v.a. in konzentrierten Enzymlösungen eher zur Aggregation und dadurch bedingtem Ausfällen neigt. Verkürzung oder vollständiges Entfernen der N-terminale Sequenz verringerte bei den Deletionsvarianten vermutlich solche destabilisierenden Proteinbewegungen. Weitere Verluste an Zielprotein, die durch Denaturierung aufgrund des im IMAC-Elutionspuffer enthaltenen Imidazols verursacht wurden, können aufgrund gleicher Arbeitsabläufe für alle Varianten etwa gleich hoch eingeschätzt werden. Dies trägt damit also zwar zum Verlust an aktivem Enzym bei, kann vmtl. jedoch nicht die unterschiedlich hohe Tendenz zur Denaturierung innerhalb der *ZmoSHC1*-Varianten erklären.

4.1.4.2 Proteinreinigung über Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

Um die *ZmoSHC1*-Varianten nach durchgeführter IMAC für die spätere Kristallisierung in ihre oligomeren Formen aufzutrennen, wurde Größenausschluss-Chromatographie (SEC) eingesetzt. Gleichzeitig konnten die Enzymlösungen dadurch entsalzt und in die finale Pufferlösung umgepuffert werden. Da Proteinlösungen vor der SEC auf ein möglichst geringes Probenvolumen von < 1 % CV (hier: < 5 ml) reduziert werden mussten, war außerdem in manchen Fällen ein vorheriger Konzentrierungsschritt über Ultrafiltration nötig. Die Reinigung über SEC konnte für alle *ZmoSHC1*-Varianten mit vergleichbarer Effizienz durchgeführt werden, wobei die Fraktionen der SEC je nach *ZmoSHC1*-Variante unterschiedliche Anteile verschiedener Oligomere enthielten. Vor allem die entsprechenden Dimere der *ZmoSHC1*-Deletionsmutanten stellten dabei den Hauptbestandteil dar. Außer im Falle des *ZmoSHC1*-Wildtyps waren von den entsprechenden monomeren Formen nur vergleichsweise geringe Mengen erhalten worden. Abweichungen zwischen den Elutionsvolumen der unterschiedlichen Proteinproben untereinander sowie im Vergleich zum Gelfiltrationsstandard können dabei z.T. durch Solubilisierungseffekte (wie die Anlagerung von Detergenzien an das solubilierte Protein) erklärt werden, wodurch die detektierte Molekülmasse des Proteins von der tatsächlichen in gewissem Maße abweichen konnte.

Bei vergleichbarer finaler Reinheit (> 95 %, s. 3.1.5.3) wurden innerhalb der einzelnen *ZmoSHC1*-Varianten unterschiedliche finale Ausbeuten an gereinigten Monomer- bzw. Dimer-Fractionen erhalten. So konnten von *ZmoSHC1*-Wildtyp sowie *ZmoSHC1_d1-58* deutlich größere Mengen gereinigtes Enzym isoliert werden als dies für *ZmoSHC1_d1-27* oder *ZmoSHC1_d1-65* der Fall war. Für letztere Varianten konnte allerdings auch vglw. weniger Enzym für die Reinigung über SEC eingesetzt werden, da die Proteinbiosynthese geringere Mengen an Zielprotein geliefert hatte und auch durch die vorangegangene Reinigung über IMAC Verluste zu verzeichnen waren. Dies war nicht nur den säulenchromatographischen Schritten selbst, sondern vor allem auch der Denaturierung des Zielproteins während Dialyse oder Lagerung zuzuschreiben. Generell konnte festgestellt werden, dass Enzymlösungen umso stärker zur Präzipitation neigten, je gereinigter und je konzentrierter sie vorlagen. Aufgrund dessen wurden Enzymproben, wenn möglich, verdünnt zwischengelagert. Gereinigte Enzymlösungen wurden in Biotransformationen mit Geranylaceton auf ihre katalytische Aktivität hin untersucht. Nicht die katalytische Effizienz an sich war dabei von vorrangigem Interesse, sondern vielmehr sollte dadurch geprüft werden, ob die gereinigten Cyclasen in einer nativen und aktiven Konformation vorlagen, denn nur solche Enzymfaltungen waren für die geplanten Kristallisierungsversuche sinnvoll. Nach Durchführung von IMAC und SEC wurde für alle Enzympräparationen ein dramatischer bis vollständiger Verlust der Aktivität gegenüber den getesteten Substraten festgestellt. Wie oben bereits erwähnt, war die zunehmende Instabilität (Denaturierung) der *ZmoSHC1*-Varianten bereits während der Lagerungsphasen beobachtet worden. Auch konnte ein Aktivitätsverlust durch notwendige Konzentrierungsschritte (Ultrafiltration) nicht ausgeschlossen werden. Da die Aktivitätstests für alle *ZmoSHC1*-Varianten zur Vergleichbarkeit zeitgleich durchgeführt wurden, waren die verwendeten Enzymlösungen zum Zeitpunkt des Tests bereits mehrere Tage alt, d.h. es konnten z.T. keine frisch gereinigten Lösungen eingesetzt werden. Auf ein Einfrieren von Enzympräparationen für Lagerungszwecke musste ebenfalls verzichtet werden, um Enzymverluste durch Auftauprozesse zu vermeiden. Daher kann auch ein Aktivitätsverlust durch und während dieser Lagerungsphase nicht ausgeschlossen werden. So wurden die Zielproteine zwar effektiv durch eine Kombination aus IMAC und SEC gereinigt und auch über einige Tage stabil in Lösung gehalten - allerdings bestand hinsichtlich des Erhalts der nativen Enzymfunktion weiterer Verbesserungsbedarf. Aus Studien anderer Membranproteine ist bekannt, dass eine vollständige Delipidisierung, also die Entfernung aller Membranlipide im Zuge des Reinigungsprozesses, zu einem

gravierenden Aktivitätsverlust des Enzyms führen kann.^[109] Um dies zu verhindern, kann versucht werden, das Enzym anstatt in reinem Detergens in einer Detergens-Lipid-Mischung (gemischten Mizellen) zu solubilisieren oder alternativ nach einem geeigneteren Detergens zu screenen. Nachdem das erstellte Reinigungsprotokoll dem Kooperationspartner übergeben wurde, deuteten erste Hinweise darauf hin, dass eine weitere Optimierung dieses Protokolls eben durch einen solchen Wechsel des Detergens von CHAPS auf DDAO erreicht werden konnte. Dieser Detergenswechsel war vorgenommen worden, um die Proteinstabilität in Lösung zu verbessern, nachdem dieses unter Verwendung von CHAPS beim Aufkonzentrieren (Konzentrationen > 5 mg/ml) aggregierte. Diese Maßnahme schien die zuvor beobachtete Aggregation während SEC und Proteinkonzentrierung zu verhindern und eine deutliche Verbesserung hinsichtlich der Stabilisierung bewirken zu können. Auch bei unterschiedlichen Detergenskonzentrationen (von 5 mM bis 20 mM DDAO) schien der *ZmoSHC1*-Wildtyp hierbei stabil zu sein und nicht zu denaturieren. Dies unterstreicht, wie kritisch die Wahl eines Detergens bei der Handhabung von Membranproteinen ist. Ebenso wie dies bereits für die Humane Oxidosqualencyclase gezeigt worden war,^[107] schien auch für *ZmoSHC1* eine Änderung der Detergenzienkonzentration den oligomeren Zustand des Proteins zu beeinflussen, sodass dieses unter den eingesetzten Bedingungen zu bestimmten Anteilen als Monomer bzw. Dimer vorlag. Unter Verwendung von 20 mM DDAO lag *ZmoSHC1* jedoch praktisch nur mehr als Homodimer vor, was analog zur *AacSHC* vmtl. dessen aktiver Form entspricht.^[40] Allerdings konnte unter Verwendung von DDAO als Detergens keine Aktivität gegenüber den Testsubstraten Geranylacetone und Citronellal detektiert werden. Bis zur Fertigstellung dieser Arbeit konnten basierend auf den gelieferten *ZmoSHC1*-Varianten sowie dem erstellten Reinigungsprotokoll erste Proteinkristalle gewonnen und über Röntgenbeugungsmessungen untersucht werden. Allerdings war die Symmetrie der erhaltenen Proteinkristalle bisher noch zu niedrig, um daraus eine hochaufgelöste Kristallstruktur erhalten zu können. Weitere Maßnahmen zur Optimierung des Reinigungs- und Kristallisierungsprotokolls sowie der Proteinstabilisierung werden jedoch bereits unternommen, sodass die Packung der Proteinkristalle weiter verbessert und die Auflösung der Röntgenbeugungsmessungen erhöht werden kann.^[110]

4.2 *Aac*SHC-Varianten für die enzymatische Brønsted-Säure-Katalyse neuer, nicht-natürlicher Reaktionen

Brønsted-Säure-Katalyse bietet eine breit anwendbare Methode zur Aktivierung einer Reihe verschiedener funktioneller Gruppen und eröffnet damit ein breites Spektrum unterschiedlicher Reaktionen. Die Entwicklung enzymatischer Alternativen zur Ausnutzung dieser reaktiven Diversität ist daher von großem synthetischen Interesse, da der Zugang zu neuen Reaktionen, d.h. die Erweiterung der Substratpalette, auch eine Vergrößerung der Bandbreite zugänglicher Naturstoffe darstellt. Daher sollte in dieser Arbeit die katalytische Asparaginsäure (D376) der Squalen-Hopen Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*Aac*SHC) als starke enzymatische Brønsted-Säure für neue Reaktionen eingesetzt werden. Um mit *Aac*SHC neue, nicht-natürliche Terpensubstrate umsetzen zu können, wurde mittels semi-rationaler Mutagenese eine Enzymvarianten-Bibliothek der *Aac*SHC erstellt. Die Schwierigkeit der Umsetzbarkeit kleiner terpenoider Substrate aufgrund der vergleichsweise viel größeren aktiven Tasche der *Aac*SHC war bereits in früheren Arbeiten beschrieben worden.^{[65],[68]} Generell sind für solche katalytischen Hindernisse mehrere Strategien möglich. Vorgehensweisen hierfür sind bspw. das Umformen der aktiven Tasche (*Active Site Redesign/ Reshaping*)^[31] oder das Einbringen von Co-Substraten. Letzteres dient zur Blockade von Teilen der aktiven Tasche durch ein eingebrachtes zweites Molekül, welches nicht an der Reaktion teilnimmt, aber durch die Blockade von Teilen der aktiven Tasche die reaktive Faltung des eigentlichen Substratgerüsts ermöglicht. Die Verwendung solcher „Dummy-Moleküle“ setzt voraus, dass diese in der zeitlich und räumlich korrekten (An)ordnung zusammen mit dem eigentlichen Zielsubstrat ins aktive Zentrum des Enzyms gelangen, dieses dabei weder inhibieren, noch mit dem eigentlichen Zielsubstrat (biomolekular) abreagieren. Die räumliche Anpassung der aktiven Tasche hingegen umgeht diese Hindernisse. Allerdings ist hierfür oft eine vorsichtige Feinabstimmung und/oder umfangreiches Screening nötig, um strukturelle Veränderungen sukzessive anzupassen, ohne dabei die katalytische Funktion des Enzyms (zu) negativ zu beeinflussen. Da die reaktive Kavität der *Aac*SHC großteils auf relativ flexiblen Loopstrukturen lokalisiert ist, bestand hierbei Gefahr und gleichzeitig Chance darin, dass schon durch geringe Aminosäuremodifikationen weitreichendere Verformungen der aktiven Taschen bewirkt werden konnten.

4.2.1 Design und Charakterisierung neuer *Aac*SHC-Mutanten für die Umsetzung nicht-natürlicher Substrate

Obwohl *Aac*SHC von Natur aus nicht für die Cyclisierung kleinerer (Mono-, Di-)Terpene evolviert ist, bringt diese SHC einige Vorteile mit sich, die sie zum geeigneten Ausgangspunkt für die Entwicklung solcher neuer Aktivitäten macht: Zum einen ist die Kristallstruktur der *Aac*SHC bereits aufgeklärt, was einen immensen Vorteil in Hinblick auf die Erschaffung einer Mutantenbibliothek darstellt. Zum anderen ist *Aac*SHC aufgrund ihrer Herkunft aus einem thermophilen Bakterium vergleichsweise stabil gegenüber Aminosäuremodifikationen. Dies eröffnete die Möglichkeit einer fokussierten Vorgehensweise bei der Erschaffung einer Mutantenbibliothek. Weitere Vorteile der *Aac*SHC sind v.a. ihre stark acide katalytische Asparaginsäure für die Substrataktivierung, sowie die geräumige hydrophobe aktive Tasche, welche aufgrund ihrer Vielzahl aromatischer Aminosäurereste ideal für die Handhabung reaktiver kationischer Intermediate ausgestattet ist. Daher war *Aac*SHC trotz nur geringer Wildtypaktivität gegenüber den angestrebten nicht-natürlichen Substraten bzw. Reaktionen ein vielversprechender Ausgangspunkt für eine „Umprogrammierung“ in diese Richtung. Klonierung, Proteinbiosynthese und Reinigung aller *Aac*SHC-Mutanten konnte komplikationslos und

reproduzierbar durchgeführt werden, sodass vergleichbare Mengen gereinigter *AacSHC*-Präparationen mit standardmäßigen Konzentrationen im Bereich von 3–5 mg/ml erhalten wurden. Auch das additive Einbringen von Aminosäuremodifikationen in die aktive Tasche hatte keinen merklichen negativen Einfluss auf Stabilität oder Produktion der *AacSHC*-Varianten, was ebenfalls die oben genannte Robustheit des Enzyms unterstreicht. Die erstellte *AacSHC*-Mutantenbibliothek aus über 90 *AacSHC*-Varianten wurde in Biotransformationen mit nicht-natürlichen Substraten untersucht. Dabei stellten vor allem Substrat- und Produktselektivitäten sowie die Verfolgung neuer enzymatischer Brønsted-Säure-katalysierter Reaktionen den Fokus dieser Arbeit dar.

4.2.2 Die enzymatische Cyclisierung von Citronellal (4) zu Isopulegol (5)

Aufbauend auf den Vorarbeiten zur Prins-Reaktion von (*S*)-Citronellal (*S*)-4 wurde in dieser Arbeit anhand der Cyclisierung von (*R*)-Citronellal (*R*)-4 untersucht, wie weit sich verschiedene Substratorientierungen durch den veränderten räumlichen Ausbau der Substratumgebung innerhalb der aktiven Tasche der *AacSHC* beeinflussen ließen, um damit Zugang zu alternativen Stereoselektivitäten zu schaffen. Vor allem die Bildung des Produktes (-)-Isopulegol (-)-5 war dabei von besonderem Interesse, da dieses eine wichtige Vorstufe in der industriellen Herstellung von (-)-Menthol darstellt. Trotz ihrer vergleichbaren katalytischen Einfachheit kann die Cyclisierung von 4 schon deshalb zu Schwierigkeiten führen, da hier simultan gleich zwei neue chirale Zentren im Produkt aufgebaut werden. Während des Cyclisierungsprozesses kann *rac*-4 im Prinzip acht verschiedene Übergangszustände durchlaufen, die sich in ihren relativen Energien unterscheiden. Die Energien dieser reaktiven Konformationen kommen dadurch zustande, dass sich die Substituenten im Substrat während des Faltungsprozesses im sesselartigen Übergangszustand gegenseitig sterisch abstoßen. Daher besitzen diejenigen Konformationen mit der geringsten sterischen Abstoßung die niedrigsten relativen Energien und sind daher energetisch am günstigsten.^[78] In einer achiralen Umgebung führt dieser Sachverhalt zu einer Produkt(isomeren)verteilung, welche bei Raumtemperatur durch die Boltzmann-Verteilung wiedergespiegelt wird. Aufgrund der natürlichen Eigenschaft der SHCs, gleich mehrere neue Stereozentren an verschiedenen prochiralen Zentren in einem Molekül aufbauen zu können, war *AacSHC* sehr gut geeignet, um zu untersuchen, inwiefern diese katalytische Fähigkeit auch auf kleinere, nicht-natürliche Terpensubstrate übertragbar ist. So sollten aus 4 enantioselektiv bestimmte Isopulegolisomere zugänglich gemacht und damit die Strategie zu Beeinflussung der Enantiopräferenz überprüft werden. Daher wurde getestet, welche Modifikation innerhalb der aktiven Tasche vorzunehmen waren, um Varianten zu identifizieren, die einerseits eine geeignete katalytische Matrix darstellten und andererseits noch die nötige Kontrolle und Stabilisierungsfähigkeit entstehender Carbokationen gewährleisten konnten. Neue chirale Template sollten so die Anordnung der reaktiven Citronellal-Konformere kontrollieren und damit die selektive Bildung unterschiedlicher Produktisomere ermöglichen. Bei der Erschaffung der hydrophoben *AacSHC*-Mutantenbibliothek wurde dem Substrat einerseits durch Vergrößerung der Umgebung (d.h. Substitutionen gegen kleinere Aminosäurereste wie Alanin oder Glycin) zusätzlicher Raum für Faltung und Anordnung zur Verfügung gestellt. Andererseits sollte durch eine Erhöhung des räumlichen Anspruchs in verkleinerten aktiven Taschen (d.h. Substitutionen gegen größere Aminosäurereste wie Phenylalanin oder Tryptophan) der nötige sterische Druck für bestimmte Substratkonformationen aufgebaut werden. Auf diese Weise konnten räumliche Effekte der aktiven Tasche auf die Katalyse untersucht werden.

Für Biotransformationen mit reaktiveren Substraten war die Durchführung eines vorherigen Reinigungsschritt der *AacSHC*-Varianten über IEX war zwingend notwendig, um störende Zellbestandteile wie Metalle oder *E. coli*-eigene Aldo-/Ketoreduktasen^[16] aus der Enzympräparation zu entfernen, welche anderenfalls zu Nebenreaktionen mit dem Substrat führten. Nebenreaktionen wie Reduktionen oder das Abfangen intermediärer Kationen durch nukleophile Angriffe von Wassermolekülen^[111] wurden ebenfalls dadurch verringert, dass Biotransformationen bei 30 °C durchgeführt wurden, obwohl das Temperaturoptimum des *AacSHC*-Wildtyps bei deutlich höheren Temperaturen (um 50 - 60 °C) liegt.^{[56],[112]} Durch diese Anpassung der Reaktionsbedingungen konnten unerwünschte Hintergrundreaktionen weitestgehend reduziert und eine saubere Umsetzung und Analytik gewährleistet werden. Abb. 4.1 gibt eine Übersicht zum Screening der *AacSHC*-Mutantenbibliothek gegenüber (*R,S*)-**4** zur Identifizierung von Mutanten mit selektiven Eigenschaften bzgl. dieser nicht-natürlichen Reaktion.

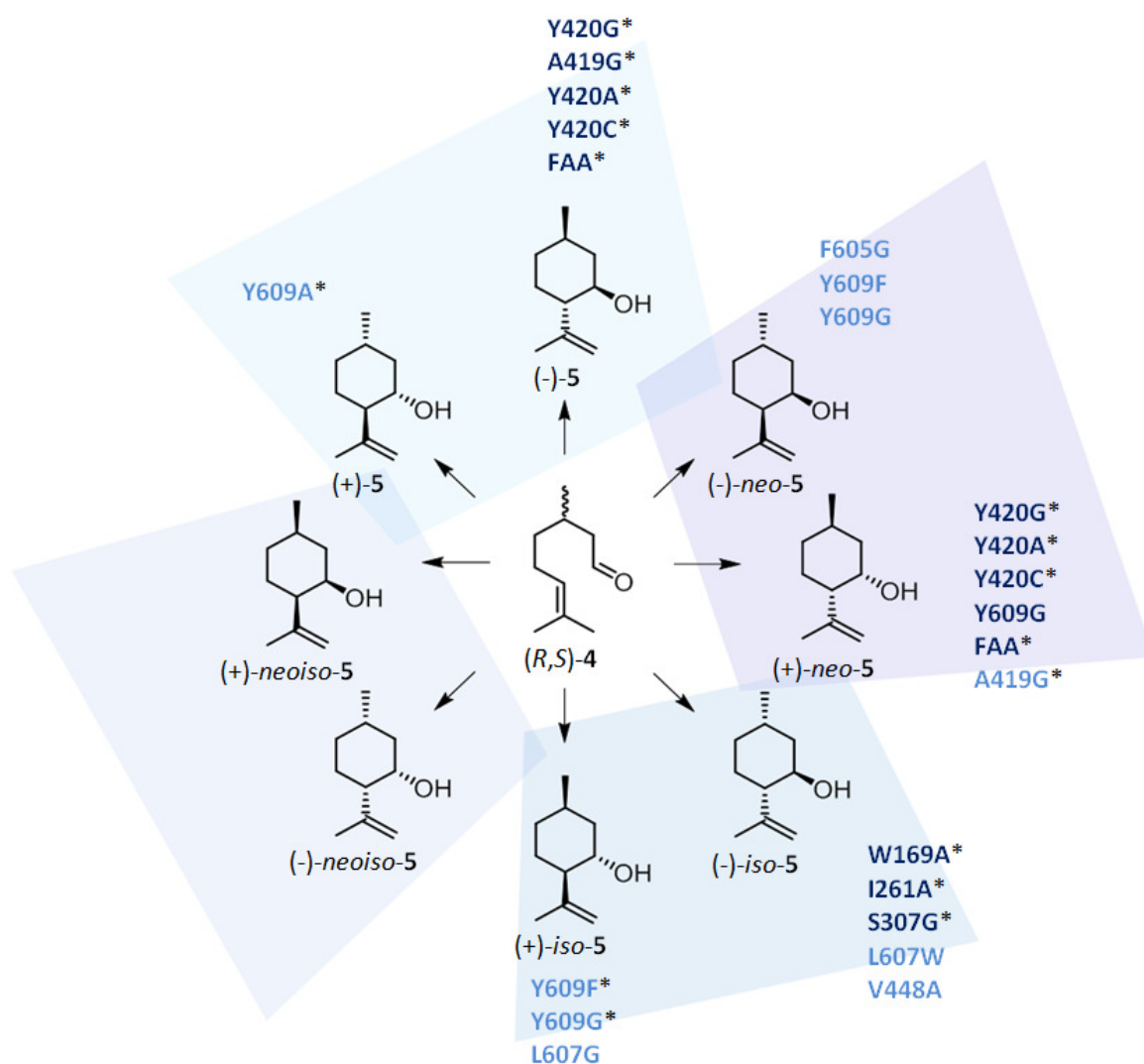


Abbildung 4.1: Überblick über *AacSHC*-Einzelmutanten (fettgedruckt, blau), welche die stereoselektive Cyclisierung von enantiomerenreinem Citronellal (**4**, mittig) zu einem der korrespondierenden Isopulegole (**5**, außen) katalysierten. Jedes Enantiomerenpaar ist mit derselben Hintergrundfarbe unterlegt. Dunkelblau gefärbte Beschriftungen indizieren *AacSHC*-Varianten mit deutlich höherer Aktivität verglichen mit denjenigen in hellerer Schriftfarbe. * Varianten, die Citronellal mit exzellenter Substratselektivität (> 99 % ee) umsetzten.

Zunächst ist der Abbildung zu entnehmen, dass bereits eine Vielzahl an *AacSHC*-Einzelmutanten direkt in der Lage war, die nicht-natürliche Reaktion zu katalysieren und dabei sowohl Enantioselektivität bzgl. der Substrate als auch Produktpräferenzen auszubilden. Während *AacSHC*-Wildtyp noch sowohl (*S*)- als auch (*R*)-**4** umsetzte, wies bereits die Mehrheit der *AacSHC*-Einzelmutanten eine erstaunlich hohe (< 85 % ee) bis exzellente (> 99 % ee) Substratselektivität auf, wobei v.a. Substitutionen hin zu kleineren hydrophoben Aminosäureresten dabei einen positiven Einfluss hatten und nur in wenigen Fällen das Einbringen einer großen Aminosäure von Vorteil war. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Cyclisierung von (*S*)- bzw. (*R*)-**4** getrennt voneinander diskutiert.

4.2.2.1 Untersuchungen zur Cyclisierung von (*S*)-Citronellal (*S*)-**4**

Für die Umsetzung von (*S*)-Citronellal (*S*)-**4** wurden *AacSHC*-Varianten identifiziert, bei denen bereits das Einbringen einer einzelnen Mutation innerhalb der aktiven Tasche Substratselektivität erzielte, die thermodynamisch bedingte Boltzmann-Verteilung umgangen und diastereoselektiver Zugang zu drei von vier möglichen Produktisomeren gewährt werden konnte: (-)-*neo*-**5** (*AacSHC*/W312G), (+)-**5** (*AacSHC*/Y609A) und (-)-*iso*-**5** (*AacSHC*/W169A). Die Cyclisierung über den energiereichsten Übergangszustand unter Bildung des entsprechenden Isomers (-)-*neoiso*-**5** hingegen konnte mit diesem Ansatz (vmtl. aus energetischen und/oder sterischen Gründen) nicht ermöglicht werden. Ein Vergleich der Aktivitäten des *AacSHC*-Wildtyps und der Mutanten zeigte, dass bspw. mit *AacSHC*-Mutante W169A die Bildung von (-)-*iso*-**5** um das Achtfache der natürlichen Wildtypaktivität gesteigert werden konnte (s. 3.2.2.1, Tab. 3.2). Gleichzeitig wurde eine Diastereoselektivität von > 99 % erreicht. Für diejenigen Varianten, bei denen durch die eingefügten Aminosäuresubstitutionen neue Diastereoselektivitäten bewirkt wurden, welche von der des Wildtyps abwichen, wie bspw. *AacSHC*-Varianten Y609A, Y609F oder W312G, war eine vergleichsweise deutlich geringere Enzymaktivität (von 0,5 % bis 2,7 % der Wildtypaktivität) zu verzeichnen. Diese Aktivitätsabnahme der *AacSHC*-Varianten bei gleichzeitiger Veränderung der Diastereoselektivität überrascht nicht. Solche Effekte werden generell beobachtet, sobald durch Mutationen neue katalytische Fähigkeiten (v.a. gegenüber nicht-natürlichen Substraten) geschaffen werden, da zunächst eine geringe neue Grundaktivität auf Kosten der bestehenden Wildtypaktivität generiert und diese dann im Folgenden weiter intensiviert werden muss.^{[113],[114]} Dahingegen tritt die Steigerung einer bereits vorhandenen Enzymaktivität bei gleichbleibender Selektivität deutlich häufiger auf. Allerdings ist hier die Verstärkung der Aktivität auf das Achtfache der Wildtyp-Aktivität durch Einführung von nur einer einzigen Aminosäuresubstitution (W169A) natürlich bemerkenswert.

4.2.2.2 Einsatz einer kombinatorischen Mutantenbibliothek zur Cyclisierung von (*R*)-Citronellal (*R*)-**4**

Auch für (*R*)-Citronellal (*R*)-**4** verbesserten bereits Einzelmutanten wie *AacSHC*/A419G (ca. 7 % Umsatz) oder *AacSHC*/Y420C (ca. 14 % Umsatz) den Substratumsatz im Vergleich zum *AacSHC*-Wildtyp (ca. 0,5 % Umsatz) um ein Vielfaches. Über die Umformungsstrategie der aktiven Tasche konnten für die Bildung des Isopulegolisomers (+)-*neo*-**5** diastereoselektive Mutanten wie *AacSHC*/F365A/Y420W/G600F (> 99 % ee, ca. 4,6 % Umsatz) identifiziert werden. Vor allem jedoch für die präparativ wertvolle Cyclisierung von (*R*)-**4** zu (-)-**5** waren einzelne Aminosäuresubstitutionen nicht ausreichend, um vergleichbar hohe Produktselektivitäten wie für die Umsetzung von (*S*)-**4** zu erzielen. Um dies zu bewerkstelligen, wurde ein kombinatorischer Ansatz für das Design neuer

AacSHC-Varianten verfolgt. Dies ermöglichte große Fortschritte in Richtung einer Enzymvariante mit differenzierterer Produktselektivität: So erlaubte schließlich *AacSHC*-Variante A419G/Y420C/G600A mit einem Diastereomerenverhältnis von ca. 0,9 zu 0,1 zwischen (-)-**5** und (+)-*neo*-**5** die hochselektive Bildung des gewünschten Isomers (-)-**5**. Die chemische Katalyse hält zur Herstellung von (-)-**5** für die (-)-Mentholproduktion verschiedene synthetische Ansätze bereit. Für die Lösung dieser katalytischen Fragestellung werden hochspezifische Katalysatoren benötigt, welche bei gleichzeitiger Bildung des Zielproduktes (-)-**5** die Entstehung der sieben anderen, unerwünschten Isopulegolisomere sowie weiterer Nebenprodukte unterdrücken. Bisherige Methoden bringen dabei stets bestimmte Vor- und Nachteile mit sich: Homogene Katalysatoren sind in der Lage, exzellente Selektivitäten bzgl. der Herstellung von (-)-**5** zu bieten,^{[115],[116]} allerdings ist eine umfangreiche Aufarbeitung nötig, um die teuren Metallkatalysatoren aus der Reaktion zurückzugewinnen bzw. entfernen zu können. Dies erfordert zusätzliche energie- und kostenintensive Schritte und erhöht unvermeidlich das Abfallaufkommen des Prozesses. Andere Beispiele liefern zwar hohe Ausbeuten an Isopulegolen - allerdings auf Kosten der Selektivität der Reaktion. So werden oftmals nur Produkt(isomer)-verteilungen erreicht, welche derjenigen des thermodynamischen Gleichgewichts (Boltzmann-Verteilung) in etwa entsprechen und keine erhöhte Präferenz für das gewünschte Isomer (-)-**5** aufweisen.^{[78],[111],[115],[117],[118]} Heterogene Katalysatoren hingegen können also zwar leichter wieder aus der Reaktion entfernt bzw. zurückgewonnen werden, erreichen allerdings bisher nicht das geforderte hohe Maß an (diastereo)selektiver Präzision. Zusätzlich ist die Bildung unerwünschter Isopulegole oftmals begleitet von weiteren Nebenreaktionen wie Defunktionalisierungen, Etherbildungen oder Dimerisierungen.^[119]

AacSHC-Varianten stellen demgegenüber umweltfreundliche, enzymatische Alternativen zu solchen chemischen Katalysatoren dar. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *AacSHC* sich mit vergleichsweise wenigen Schritten zu hochselektiven Katalysatoren maßschneidern ließ. Bereits mit geringen Eingriffen, welche auf wenige ausgewählte Positionen und Aminosäuresubstitutionen innerhalb der aktiven Tasche des Wildtyp-Enzyms beschränkt waren, konnte eine kondensierte *AacSHC*-Mutantenbibliothek geschaffen werden. Das Screening von weniger als 200 *AacSHC*-Varianten war damit schon ausreichend, um vielversprechende Aminosäurereste identifizieren zu können, die eine entscheidende Rolle in der reaktiven Orientierung des Substrates spielten. Gleichzeitig konnte zwischen den Substratanantiomeren unterschieden und die Produktselektivität der *AacSHC* verfeinert werden. Darüber hinaus waren die erreichten Diastereoselektivitäten der enzymatischen Cyclisierung von **4** zu **5** verglichen mit chemischen Katalysatoren industrieller Prozesse für diese spezifische Reaktion ausgesprochen hoch.^{[78],[117],[118]} Wie lassen sich nun die positiven Einwirkungen der Aminosäuresubstitutionen auf die Produktbildung erklären?

Ein wichtiger Faktor ist zum einen die enzymtypische Hydrophobizität der aktiven Tasche, deren aromatische Aminosäureseitenketten formgebende Funktion besitzen und ausgezeichnet dafür ausgerüstet sind, um die Bildung und Erhaltung von hochreaktiven carbokationischen Spezies zu stabilisieren und diese vor vorzeitigen Abbruchreaktionen wie dem Abfangen durch Wassermoleküle zu schützen. Zielführende Modifikationen der *AacSHC*-Mutanten waren mehrheitlich solche gegen deutlich kleinere Aminosäureseitenketten. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch die dadurch geschaffene Vergrößerung der aktiven Tasche erst der nötige Raum für die Bildung von ganz bestimmten Substratanordnungen geschaffen und damit bereits der Reaktionsausgang in eine definierte Richtung dirigiert werden konnte. Im Falle der Aminosäuresubstitutionen an Positionen W312, A419, Y420, G600 oder Y609, welche allesamt in direkter Nähe zur Substratbindestelle in der

aktiven Tasche der *Aac*SHCs lokalisiert sind, kann ein direkter Einfluss der eingeführten Modifikationen auf Faltung und Umsetzung des Substrates angenommen werden (s. Abb. 4.2).

Für Aminosäurepositionen wie I261 oder W169 jedoch ist der positive Einfluss auf die Umsetzung kleiner Substrate zunächst überraschend, da diese benachbarten Aminosäuren in einem substratabgewandten Teil der aktiven Tasche lokalisiert sind, der zu weit von der katalytischen Asparaginsäure D376 und/oder dem gebundenen Substrat entfernt liegt, um einen direkten Einfluss auf die Katalyse haben zu können.

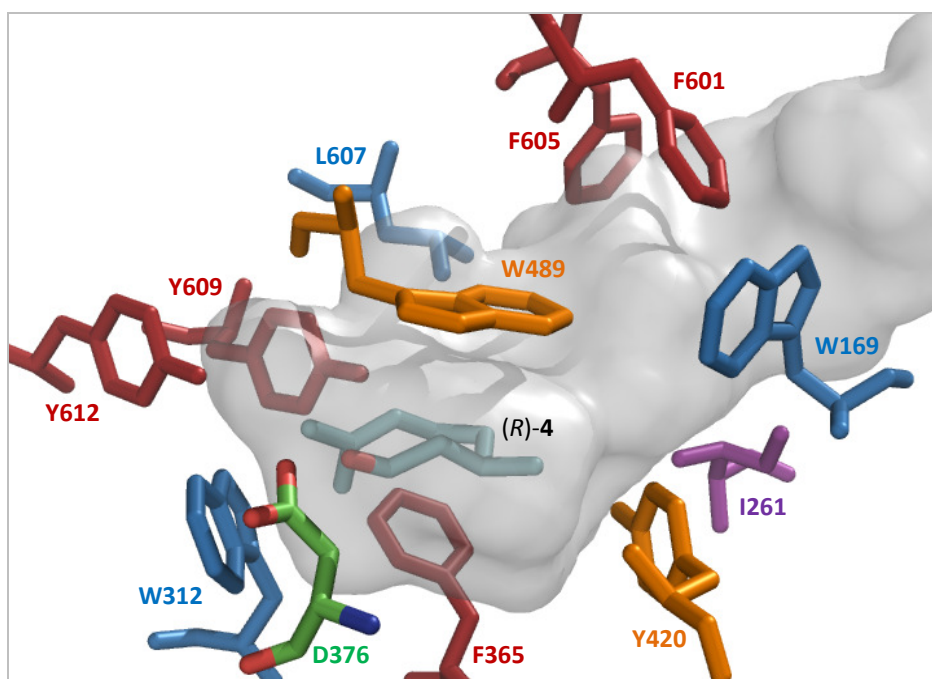


Abbildung 4.2: Die aktive Tasche der *Aac*SHC (grau) beherbergt eine Vielzahl funktioneller Aminosäurereste, die zusätzlich zur hydrophoben und formgebenden Rolle noch weitere Funktionen während der Cyclisierung terpenoider Substrate einnehmen:^[46] So dienen manche der Stabilisierung auftretender Carbokationen (rot, orange), unterstützen die Substratbindung (blau, orange) oder beeinflussen die Stereokontrolle (lila). Die katalytische Asparaginsäure D376, die zur Protonierung des Substrates dient, ist in grün dargestellt. Für die Umsetzung des nicht-natürlichen Substrates Citronellal (**4**, graublaues Stabmodell) waren davon v.a. Aminosäuremutationen der Positionen W169, I261, W312, Y420 und Y609 aktivitätssteigernd.

Frühere Studien hatten bereits Hinweise auf die funktionelle Bedeutung bestimmter Aminosäurepositionen in *Aac*SHC geliefert, von denen sich interessanterweise einige auch gegenüber der hier untersuchten Cyclisierung von **4** als besonders wichtig herauskristallisiert hatten: Für die Umsetzung des natürlichen Substrates Squalen war durch Mutagenesestudien gezeigt worden, dass Positionen W169, W312 und L607 für die Substratbindung eine entscheidende Rolle spielten. Position I261 wiederum bewirkte die Stereokontrolle der acyclischen Seitenkette des Substrates und Positionen Y420 und Y609 waren für die Handhabung entstehender Carbokationen während der Substratbindung (Y420) und –stabilisierung (Y609) entscheidend.^{[46],[120]} Vor allem für Positionen W169 und I261 ist bemerkenswert, dass deren katalytische Funktion auch bei der Umsetzung eines kleinen, nicht-natürlichen Terpensubstrates wie **4** erhalten blieb bzw. gerade hierbei eine wesentliche Rolle spielte. Obwohl also in der Regel die Aminosäuren der ersten Sphäre der aktiven Tasche in direktem Kontakt mit einem Zielsubstrat stehen, und daher Modifikationen dieser

Positionen im Hinblick auf die Schaffung von Aktivitäten tendenziell am wichtigsten sind, können auch entferntere Mutationen einen entscheidenden Einfluss auf die Feinabstimmung von Aktivitäten und Selektivitäten nehmen. So können Aminosäurereste der zweiten Sphäre maßgeblich bei der Ausrichtung katalytisch aktiver Reste der ersten Sphäre beteiligt sein und dadurch Größe und Form der aktiven Tasche dirigieren.^[31] Für die positiven Effekte der *AacSHC*-Varianten I216A und W169A lässt sich daher postulieren, dass diese Modifikationen über die erste Aminosäuresphäre keinen direkten Einfluss auf die Katalyse nehmen, sondern über die zweiten Sphäre weitere, komplexere Veränderungen innerhalb der aktiven Tasche bewirken und damit die Orientierung anderer, direkt an der Katalyse beteiligter Positionen steuern, welche so ebenfalls in die Umsetzung von Monoterpenen eingreifen. Da *AacSHCs* aktive Tasche auf beweglichen Loopstrukturen positioniert ist, sind finale strukturelle Veränderungen durch eingebrachte Mutationen anhand einfacher Studien der vorhandenen *AacSHC*-Kristallstruktur allerdings kaum exakt vorhersagbar. Mutationen könnten bspw. ebenfalls Auswirkungen auf benachbarte Aminosäureseitenketten, die Flexibilität einer Loopsequenz oder eines ganzen Bereiches der mutierten Kavität selbst haben. Solche Fragen können letztendlich nur durch die Aufklärung der Kristallstruktur betreffender Mutanten abschließend geklärt werden.

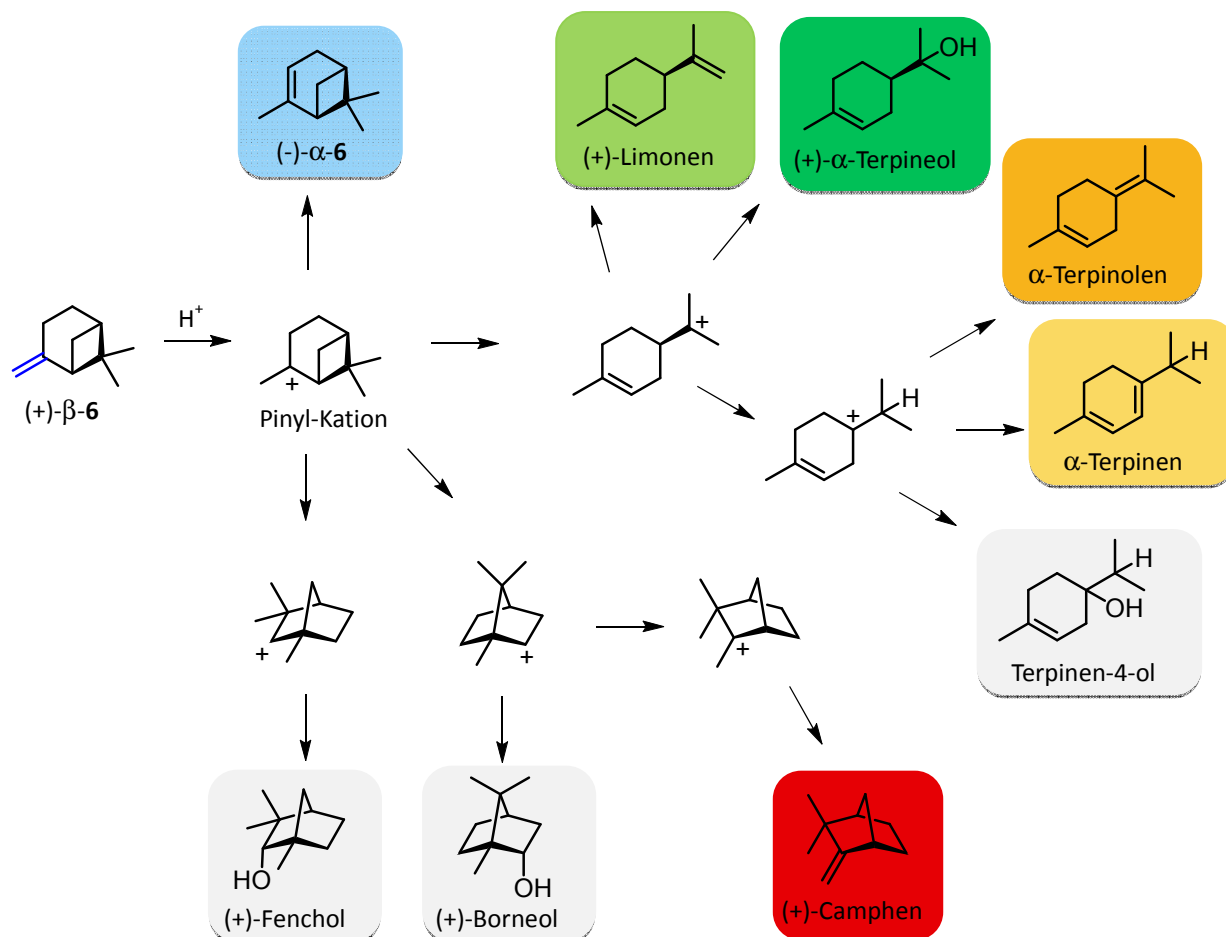
Um die Frage der unterschiedlichen Substratelektivität zu diskutieren, muss eine weitere Eigentümlichkeit der *AacSHC*-Katalyse betrachtet werden - der dirigierende Effekt der Methylgruppe des Substrates selbst. In Abhängigkeit der jeweiligen *AacSHC*-Variante war für eines der beiden Substratenantiomere die nötige Positionierung dieser Methylgruppe durch bestimmte Ausformungen der Enzymkavität energetisch ungünstiger, wodurch die produktive Faltung des betreffenden Enantiomers verhindert wurde. Diese Hypothese stimmt überein mit früheren Untersuchungen, welche zeigen konnten, dass die Orientierung der Methylgruppe eines Terpensubstrates eine bedeutende Rolle für dessen Umsetzbarkeit mit *SHCs* spielt.^{[121]-[123]} Vermutlich kann dies mit einer Art Ausrichtungsfunktion der Methylgruppe innerhalb der aktiven Tasche begründet werden, welche sicherstellt, dass das Substrat reaktiv positioniert ist und damit auch zielführend gefaltet und cyclisiert werden kann. Diese Erklärung macht die unterschiedliche Bevorzugung von Citronellal-Enantiomeren plausibel.

Durch den kombinatorischen Ansatz, der in dieser Arbeit zur Erstellung spezialisierter Enzymmutanten verwendet wurde, konnte ebenfalls eine Variante, *AacSHC/A419G/Y420C/G600A*, zu einem hochselektiven Katalysator für die Umsetzung von (*R*)-**4** zu (*-*)-**5** umfunktionalisiert werden. Trotz der prinzipiellen Schwierigkeit, kombinatorische Effekte gleichzeitiger Aminosäuresubstitutionen in einem Enzym abzuschätzen, ist eine solche Vorgehensweise in der Literatur oftmals als zielführend beschrieben. Durch gleichzeitige Variation (zweier) benachbarter Aminosäurepositionen der aktiven Tasche werden synergistische Effekte ermöglicht, welche durch die (Neu)ausrichtung der Aminosäureseitenketten zustande kommen und durch Einzelmutationen so nicht hervorgebracht werden können.^{[33],[124],[125]} Ebenso hoch ist jedoch auch das Risiko, durch nicht vorhersehbare Auswirkungen eingefügter Modifikationen gegenteilige Effekte zu bewirken und Aktivitäten oder Selektivitäten abzuschwächen oder gar zu zerstören. Auch dies war für einen Teil der in dieser Arbeit erstellten kombinatorischen Mutanten festzustellen, welche nur unveränderte oder verringerte Aktivität im Vergleich zu den Einzelmutanten aufwiesen.

Umsätze der Biotransformationen ließen sich dabei zusätzlich zur Wahl verschiedener *AacSHC*-Varianten auch durch die Variation der Reaktionstemperatur und vor allem der Detergengkonzentration noch deutlich weiter verbessern, was hinsichtlich der Reaktion von (*R*)-**4** zu (-)-**5** untersucht wurde. Von den getesteten Detergengkonzentrationen wurden jeweils unter Verwendung von 0,1 % (*w/v*) Triton X-100 (ca. 5 CMC) die höchsten Umsätze erzielt. Im Vergleich dazu war sowohl für 0,2 % (*w/v*) Triton X-100 (ca. 10 CMC) als auch durch Einsatz von 0,01 % (*w/v*) Triton X-100 (ca. 0,5 CMC) für alle *AacSHC*-Varianten eine Verminderung der erreichten Ausbeute an Zielprodukt zu verzeichnen. Dies deutete darauf hin, dass sowohl zu hohe Detergengkonzentrationen als auch zu niedrige Konzentrationen (< CMC) weniger geeignet waren. Die aufgrund des Reinigungsprotokolls verwendete standardmäßige Detergengkonzentration von 0,2 % Triton X-100 lag damit vmtl. über dem Reaktionsoptimum und hätte für eine Verbesserung der Reaktionsbedingungen sogar noch weiter, auf 0,1 % Triton X-100 gesenkt werden können. Derartige Detergenseffekte sind in der Literatur bisher zwar nur geringfügig untersucht, sind jedoch in Einklang mit Vorarbeiten an diesem Institut. Diese konnten bereits erste Hinweise dazu liefern, dass SHCs in Biotransformationen mit manchen kleineren Terpensubstraten unter Verwendung verringerter Detergengkonzentrationen höhere Umsätze liefern konnten.^[126] Bei der Betrachtung der getesteten Reaktionstemperaturen fällt weiterhin Folgendes auf: Verglichen mit Umsetzungen bei 30 °C konnte durch eine Erniedrigung der Temperatur um 10 °C auf 20 °C die Aktivität aller *AacSHC*-Varianten deutlich (drei- bis siebenfach) erhöht werden, wohingegen eine Erhöhung der Temperatur um 10 °C auf 40 °C zu einem drastischen Aktivitätsverlust führte und nur noch 10 – 20 % der Aktivität bei 30 °C erreicht werden konnten. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung konnte die erhöhte Beweglichkeit des Substrates mit zunehmender Temperatur sein, was die Wahrscheinlichkeit zur produktiven Bindung des Substrates verringerte und damit zu einem Rückgang der Enzymaktivität führte. Um darüber hinaus Aussagen bzgl. einer evtl. veränderten Stabilität der mutierten Enzyme treffen zu können, wären Thermostabilitätsuntersuchungen nötig, durch die sich Verschiebungen des Temperaturoptimums der *AacSHC*-Varianten im Vergleich zum Wildtyp feststellen ließen.

4.2.3 Die enzymatische Isomerisierung von (+)- β -Pinen (+)- β -6

Ein weiteres Thema dieser Arbeit war die Untersuchung der Brønsted-Säure-katalysierten Isomerisierung von (+)- β -Pinen (+)- β -6, welche den Zugang zu einer Vielzahl unterschiedlicher Monoterpene eröffnet. Dabei führt der Reaktionsbeginn durch Protonierung der Doppelbindung in (+)- β -6 zunächst zum Pinyli-Kation, d.h. das Substrat liegt anfänglich stets in derselben reaktiven Form vor. Dieses hochenergetische carbokationische Intermediat kann dann in einer achiralen Umgebung unvermeidlich nur unselektiv weiter reagieren, da jegliche Art einer nötigen, richtungsweisenden Funktionalität fehlt. So wird zwangsläufig ein Produktgemisch verschiedener Terpene erhalten, dessen Verteilung die jeweiligen Energien der zu durchlaufenden Übergangszustände widerspiegelt. Ausgehend vom Pinyli-Kation kann hier also eine Vielfalt unterschiedlicher Produkte zugänglich gemacht werden – sofern alternative Wege zur Stabilisierung und Führung der entsprechenden intermediären Kationen bereitgestellt werden können. Die Isomerisierung von α -6 in Gegenwart von Säurekatalysatoren wurde bereits umfangreich untersucht, wobei die Selektivität der Reaktion von der Natur und Stärke des eingesetzten Säurekatalysators abhängt. In der Regel wird eine komplexe Mischung aus mono-, bi- und tricyclischen Terpenen (v.a. β -6, Tricyclen, Camphen, Limonen, p-Cymen, Terpinen, Terpinolen) erhalten. Vor allem Limonen oder Camphen sind dabei v.a. für die Herstellung von Duft- und Geschmackstoffen, Insektiziden oder Pharmazeutika industriell bedeutend.^{[79],[127]} In der Industrie wird die Isomerisierung von Pinen über Titanoxid (bzw. Titansäure) bei Normaldruck und Temperaturen über 100 °C in geschlossenen Systemen durchgeführt. Gesamtausbeuten an Camphen, Limonen, Tricyclen und kleineren Mengen anderer Terpene liegen bei ca. 75 – 80 %, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit vergleichsweise gering ist.^[128] Daher wird seit Jahren intensiv an der Steigerung der Aktivität und Selektivität der Reaktion (insbesondere gegenüber Camphen und Limonen) geforscht.^[79] Oftmals werden dabei bisher gute bis exzellente Umsätze, jedoch meist nur geringe Selektivitäten erzielt. Zwar konnte bspw. durch den Einsatz modifizierter Zeolite eine Selektivitätssteigerung (auf 43 – 65 % Camphen bzw. 20 – 24 % Limonen) erreicht werden, für die Entwicklung eines produktselektiveren Katalysators sind jedoch weitere Verbesserungen diesbezüglich nötig. Diese Herausforderung sollte in vorliegender Arbeit durch den Einsatz von *Aac*SHC-Varianten untersucht werden. Dazu wurde (+)- β -6 als Ausgangsmaterial verwendet, da hiermit in Vorexperimenten (Daten nicht gezeigt) vielversprechendere initiale Aktivitäten mit dem *Aac*SHC-Wildtyp erzielt wurden. Schema 4.1 gibt nachfolgend eine Übersicht möglicher Terpenprodukte der Isomerisierung von (+)- β -6 unter sauren Bedingungen. In Abhängigkeit der Stabilisierung und Umlagerung der energiereichen kationischen Intermediate sowie der Reaktionsparameter (pH, Temperatur, Katalysator, Reaktionszeit) werden mehrere Reaktionspfade verfolgt, die in einem charakteristischen Verteilungsmuster verschiedener möglicher terpenoider (End)produkte resultieren. Im Schema sind dabei diejenigen Produkte farblich hinterlegt, die in dieser Arbeit fokussiert wurden.



Schema 4.1. Übersicht über mögliche Übergangszustände und Produkte der säurekatalysierten Isomerisierung von (+)-β-Pinen (+)-β-6. Nach der Substrataktivierung durch Protonierung der Doppelbindung entsteht ein hochreaktives Kation (Pinylyl-Kation), welches eine Reihe verschiedener Reaktionspfade einschlagen kann, wie bspw. die direkte Deprotonierung zu (-)-α-Pinen (-)-α-6, die Ringöffnung zu *para*-Menthen-Gerüsten oder verschiedene intramolekulare Alkylverschiebungen bspw. zu (+)-Camphen.

AacSHC ist von Natur aus für die Stabilisierung intermediärer Carbokationen durch π - π -Wechselwirkungen aromatischer Aminosäuren des aktiven Zentrums evolviert und daher exzellent geeignet. Deshalb wurde getestet, ob *AacSHC*-Varianten aus der Mutantenbibliothek als chirale Katalysatoren genutzt werden konnten, um die bei der Isomerisierung von (+)-β-6 auftretenden Carbokationen ganz gezielt entlang bestimmter Reaktionspfade zu steuern, um so selektivere Produktverteilungen zu erreichen. Verschiedene Produktspektren unterschiedlicher Enzymvarianten konnten so Hinweise dazu liefern, welche Aminosäurepositionen für die Handhabung der kationischen Intermediate relevant sein können. Dies sollte Ziel vorliegender Untersuchungen sein. Zunächst wurden hierfür Ganzzell-Biotransformationen mit der *AacSHC*-Mutantenbibliothek des *Reshapings* für erste Screenings gegenüber (+)-β-6 verwendet. Dadurch konnten sieben derartige Aminosäurepositionen (L36, W312, F365, A419, V448, G600, Y609) in der aktiven Tasche identifiziert werden, woraufhin an diesen Positionen über Sättigungsmutagenese weitere Enzymvarianten erstellt und getestet wurden. Für viele der neu generierten Mutanten konnte ebenfalls eine Umsetzung des nicht-natürlichen Substrates (+)-β-6 festgestellt werden. Aktivitäten der Varianten waren in den meisten Fällen in etwa vergleichbar mit der des *AacSHC*-Wildtyps (25 - 40 % Umsatz). Das Ganzzell-Screening lieferte eine Reihe interessanter Varianten, die ausgehend von (+)-β-6 teilweise sehr unterschiedliche Anteile verschiedener cyclischer Terpenprodukte bildeten. Bemerkenswert war dabei, dass auf Anheb einige

*Aac*SHC-Varianten identifiziert wurden, welche stark vom Wildtyp-Enzym abweichende Produktspektren aufwiesen. Aminosäurepositionen, an denen Mutationen derartige Effekte hervorriefen, sind in Abb. 4.3 gezeigt. Die variierenden Produktverteilungen, welche durch die Mutantenbibliothek adressiert werden konnten, verdeutlichten, dass auch für diese nicht-natürliche Reaktion schon Einzelmutationen der Enzymtasche einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilisierung und Umsetzung reaktiver Intermediate ausüben konnten. Zeigten bspw. *Aac*SHC-Varianten L36A, L36S oder F365W vergleichsweise breit gefächerte Produktverteilungen, so waren durch Aminosäuremodifikationen W312A, F365N, V448F oder Y609W bereits deutliche Spezialisierungen festzustellen: Ganzzell-Umsetzungen mit *Aac*SHC-Variante V448F lieferten 75 % (+)- α -Terpineol mit (-)- α -6 als einzigem Nebenprodukt. Hingegen wurden mit *Aac*SHC-Variante W312A bereits ca. 85 % (+)- α -Terpineol, sowie (-)- α -6 und (+)-Limonen als Nebenprodukte hergestellt. *Aac*SHC-Variante F365N zeigte die ausgeprägteste Produktspezialisierung bzgl. (+)- α -Terpineol (> 90 %), wobei auch hier geringe Mengen an Nebenprodukten (α -Terpinen, (+)-Camphen, α -Terpinolen) erhalten wurden. Mit *Aac*SHC-Variante Y609W wiederum war eine Mutante generiert worden, die eine herausragende Spezialisierung bzgl. der Bildung von (-)- α -6 (ca. 90 %) aufwies und nur (+)-Camphen als Nebenprodukt lieferte.

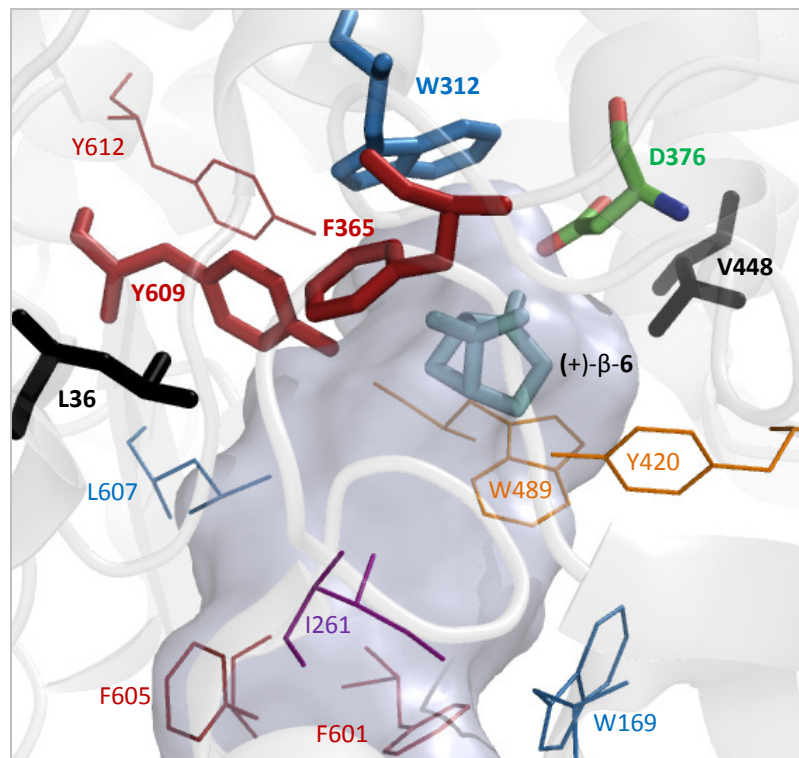


Abbildung 4.3: Bei der Umsetzung des nicht-natürlichen Substrates (+)- β -Pinen (+)- β -6 (hellblaues Stabmodell) führten vor allem Aminosäuremutationen der Positionen L36, W312, F365, V448 und Y609 (Stabmodelle, fettgedruckt) zu interessanten neuen Produktspektren. Die katalytische Asparaginsäure D376 ist grün hervorgehoben. Aminosäurereste der aktiven Tasche der *Aac*SHC (grau), die substratbindende (blau, orange) oder Carbokationen-stabilisierende (rot, orange) Eigenschaften besitzen oder Stereokontrolle ausüben (lila),^[46] sind als Linien- oder Stabmodelle dargestellt. Schwarz eingefärbt sind hydrophobe Aminosäurereste, denen vmtl. rein formgebende Funktion zukommt. Im Gegensatz zu den fettgedruckten Positionen (Stabmodell) waren dünn gedruckte Aminosäurereste (Liniendarstellung) bei der Umsetzung von (+)- β -6 nicht zielführend.

Wie in Abb. 4.3 dargestellt ist, befanden sich also auch für (+)- β -**6** einige der ins Produktspektrum eingreifenden Modifikationen an Aminosäurepositionen, welche über ihre formgebende Aufgabe innerhalb der aktiven Tasche hinaus noch weitere Funktionen wie Substratbindung (W312) oder Kationenstabilisierung (F365, Y609) besaßen.

Um die Ergebnisse aus Ganzzell-Umsetzungen von Zelleinflüssen zu lösen und die reine Cyclase-katalysierte Reaktion isoliert betrachten zu können, wurden zwölf ausgewählte *AacSHC*-Varianten (L36A, L36C, L36S, L36V, W312A, W312V, F365L, F365N, F365W, V448F, G600F und Y609W) über Ionenaustauschchromatographie (IEX) gereinigt und in Biotransformationen mit (+)- β -**6** untersucht. Folge- oder Nebenreaktionen durch *E. coli*-Zellbestandteile konnten so minimiert werden. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen bzw. zur Reduzierung von Hintergrundreaktionen waren Biotransformationen von *AacSHC*-Wildtyp und -Knockout (D376C) bei 30 °C bzw. 50 °C und unter Verwendung von Triton X-100 bzw. CHAPS als Detergens durchgeführt worden. Dabei wurde festgestellt, dass Hintergrundreaktionen sowohl durch niedrigere Temperaturen als auch durch die Wahl von Triton X-100 (statt CHAPS) verringert werden konnten, weshalb diese Bedingungen für Reaktionen mit gereinigten Enzympräparationen eingesetzt wurden. Die Tatsache, dass die Aktivität eines Membranproteins bzgl. eines bestimmten Substrates wesentlich von der Art und Konzentration des jeweils verwendeten Detergens abhängt, ist bisher erst für wenige Enzyme genauer beschrieben.^{[105],[106]} Obwohl angenommen werden kann, dass hierbei die Ausbildung einer mizellhaltigen Umgebung zusammen mit detergensspezifischen Interaktionen zwischen Tensid, Enzym und Substrat die maßgebenden Parameter sind, die darüber entscheiden, wie effektiv ein solubilisiertes Enzym ein bestimmtes Substrat umsetzen kann, können solche Effekte bisher nach wie vor nicht im Detail erklärt oder vorhergesagt werden. Ruf und Mitarbeiter konnten dieses Phänomen allerdings ebenfalls bereits am Beispiel der humanen Oxiosqualencyclase (*hOSC*) feststellen und zeigten, dass rekombinant gewonnene *hOSC* unter Verwendung von Triton X-100 mit dem dort getesteten Substrat die höchste Aktivität im Vergleich zu allen anderen untersuchten Detergenzien aufwies.^[107] Allgemein war unter Verwendung von gereinigter Enzymlösung im Vergleich zu den Ganzzell-Umsetzungen mit den meisten Varianten eine Anreicherung von (+)-Limonen zu verzeichnen. Bemerkenswerterweise bildeten *AacSHC*-Varianten mit Aminosäuresubstitutionen an Position L36 (L36A, L36C, L36S, L36V) sowie Variante W312V zu mind. 75 % (+)-Limonen. Nebenprodukte stellten bei diesen Varianten v.a. (+)-Camphen, (-)- α -**6** (je 7 - 11 %) und (+)- α -Terpineol (4 - 6 %) dar. Diese Beobachtung ist außergewöhnlich, da bei der Isomerisierung von **6** mit chemischen Katalysatoren in der Regel stets Produktgemische entstehen, bei denen (+)-Camphen, nicht (+)-Limonen, das Hauptprodukt darstellt und Produktselektivitäten > 75 % für eines der Terpenprodukte bisher zudem nur extrem selten erreicht werden. Yamamoto und Mitarbeiter konnten die Isomerisierung von (-)- α -**6** über Yb/SiO₂ katalysieren und erhielten dabei 62 - 66 % (+)-Limonen sowie (+)- β -**6** (16 - 23 %) und (+)-Camphen (20 %).^[129] Eine derartig hohe Selektivität gegenüber (+)-Limonen, wie sie in vorliegender Arbeit durch *AacSHC*-Varianten erzielt werden konnte, ist nach unserem Wissen jedoch bisher noch nicht beschrieben worden. *AacSHC*-Variante Y609W wiederum produzierte in gereinigter Form mit ca. 86 % stark bevorzugt (-)- α -**6**, bildete allerdings noch gewisse Menge an (+)-Camphen (5 %) und (+)-Limonen (8 %). Auch eine solch ausgeprägte Produktselektivität der Reaktion bzgl. (-)- α -**6** ist in der Literatur bisher nur in wenigen Fällen berichtet. Gorzawski und Mitarbeiter konnten (+)- β -**6** jedoch unter Verwendung einer Superbase mit > 99 % Selektivität zu (-)- α -**6** isomerisieren.^[130]

Insgesamt waren zwischen *in vivo*-Screenings und den *in vitro*- Experimenten z.T. deutliche Unterschiede in den Produktverteilungen festzustellen: Während bspw. *AacSHC*/W312V in Ganzzell-Umsetzungen v.a. (+)-Camphen (50 %), (+)- α -Terpineol (35 %) sowie in geringeren Mengen α -

Terpinolen und α -Terpinen bildete, wurden mit gereinigter Enzymlösung v.a. (+)-Limonen (75 %) sowie (+)-Camphen, α -Terpinolen und (-)- α -6 als Nebenprodukte erhalten. Biotransformationen mit *AacSHC*/F365N bspw. lieferten *in vivo* vor allem (+)- α -Terpineol (90 %) und geringe Mengen an α -Terpinen, (+)-Camphen und α -Terpinolen, während *in vitro* v.a. (-)- α -6 (70 %) sowie (+)-Limonen, (+)-Camphen, α -Terpinolen und (+)- α -Terpineol als Nebenprodukte gebildet wurden. Grund dafür konnte zum einen die vglw. niedrigere Proteinkonzentration der *AacSHC*-Varianten im Ganzzell-Screeningsystem sein. Zwar waren Konzentrationen der Varianten im *in vivo*-Experiment nicht genau bestimmbar, allerdings kann aufgrund der Gesamtzellmassen, welche in diesen Umsetzungen erreicht wurden, eine vglw. niedrigere Biokatalysator-Konzentration angenommen werden. Dies konnte Abweichungen der detektierten Aktivität und Selektivität zwischen Ganzzell-Umsetzungen und Reaktionen mit gereinigten Enzymlösungen zum Teil erklären. Weiterhin können die höheren Ausbeute an (+)-Limonen *in vitro* im Vergleich zu *in vivo*-Umsetzungen mit der Toxizität des (+)-Limonens für *E. coli* erklärt werden: Da *E. coli* von Natur aus keine Enzyme besitzt, welche zur Metabolisierung dieses bakteriziden Monoterpens in der Lage sind,^{[131],[132]} kann keine Abbaureaktion von (+)-Limonen durch *E. coli* statt finden, sodass dieses in der Zelle akkumuliert und zum Zelltod führt. In zellfreien Lösungen gereinigter Enzyme nahm die (Bakterio)toxizität des (+)-Limonens keinen Einfluss auf die Aktivität der *AacSHC*-Varianten, sodass hiermit höhere (+)-Limonen-Konzentrationen erreicht werden konnten. Nichtsdestotrotz ist die ausgesprochen hohe Präferenz bzgl. der Bildung von (+)-Limonen mit *AacSHC*-Varianten im Vergleich zu chemischen Katalysatoren bemerkenswert. Weiterer Faktor konnten Detergenseffekte bzw. die für SHCs charakteristischen Wasserkanäle sein. *AacSHC* besitzt zwei derartige „Tunnel“, welche am distalen Ende der aktiven Tasche lokalisiert und für die katalytische Stärke der Cyclase von entscheidender Bedeutung sind, da sie durch die Verdrängung von Wassermolekülen im Zuge der Cyclisierung den nötigen entropischen Gewinn liefern, der die Reaktion antreibt.^[66] Zusätzlich wird die Terminierung der Reaktion -durch Proteinabstraktion oder Wasseraddition- bestimmt durch die räumliche Anordnung von Wassermolekülen in der aktiven Tasche der Cyclase.^[133] Da *AacSHC* ein monotopisches Membranprotein ist, wird es in Ganzzell-Experimenten von einer Phospholipid-Doppelschicht umgeben. Diese Umgebung unterscheidet sich erheblich von dem wässrigen, detergenschaltigen Puffersystem, welches für *in vitro*-Experimente zur Enzymsolubilisierung diente. Diese stark voneinander verschiedenen reaktiven Umgebungen konnten ebenfalls zu veränderten Aktivitäten und Selektivitäten der *AacSHC*-Varianten beitragen. Aktivitäten gereinigter *AacSHC*-Varianten blieben dabei großteils vergleichbar mit der des *AacSHC*-Wildtyps (9 – 17 % Umsatz). Für eine präparative Anwendung besteht hierbei jedoch weiterer Optimierungsbedarf (Steigerung der Ausbeute). Da es sich bei Isomerisierung von (+)- β -6 um eine der nativen Enzymreaktion unähnliche Umsetzung handelte, war nicht zu erwarten gewesen, mit den eingebrachten Einzelmutationen bereits signifikante Aktivitätssteigerungen bewirken zu können. Ausnahmen stellen lediglich Varianten L36C und Y609W dar, die in gereinigter Form die etwa dreieinhalbfache Aktivität des Wildtyps aufwiesen. Die Modifikation der Produktspezifität einer Terpensynthese wurde ebenfalls bereits von Keasling und Mitarbeitern beschrieben. Diese konnten eine γ -Humulensynthese durch mehrere Runden an Sättigungsmutagenese in spezialisiertere Terpensynthesen mit neuartigen Produktselektivitäten umwandeln. Auch hierbei blieben die Aktivitäten der generierten Mutanten jedoch großteils im Bereich der zwei- bis vierfachen Wildtypaktivität.^[134] Die hochreaktive Natur der auftretenden Carbokationen wurde in der Literatur vor allem im Zusammenhang mit der Bornyldiphosphat-Synthese für die Gasphase genauer untersucht.^{[135]-[137]} Abbildung 4.4 zeigt schematisch die hierbei berechneten Freien Energien der (kationischen) Spezies und Übergangszustände.

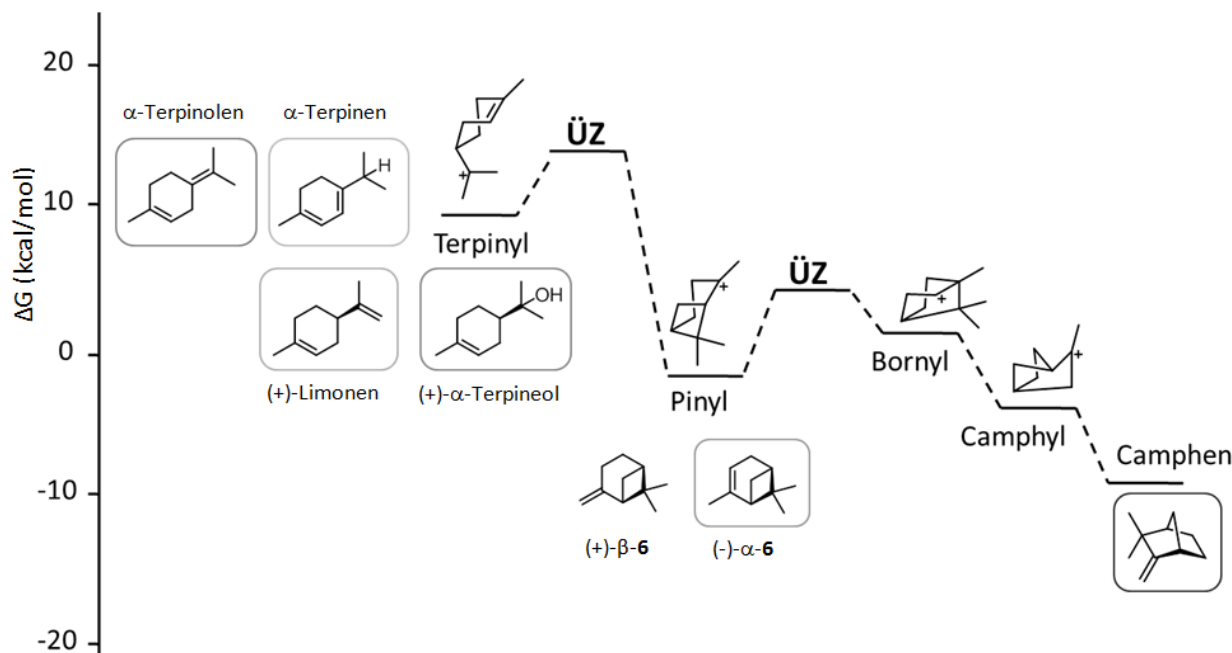


Abbildung 4.4: Schematische Einordnung Freier Energien kationischer Übergangszustände (ÜZ) und Spezies, die im Zuge der säurekatalysierten Isomerisierung von (+)-β-Pinen (+)-β-6 auftreten. Die energetische Einordnung des Terpinyl-, Pinyll-, Bornyl- und Camphyl-Kations sowie des Endproduktes Camphen ist der Arbeit von Major und Weitman entnommen.^[135] (-)-α-Pinen (-)-α-6, (+)-β-6, (+)-Limonen, (+)-α-Terpineol, α-Terpinolen und α-Terpinen sind den zugehörigen kationischen Vorläufern zugeordnet und umrandet.

Aus dieser Abstufung der Energien geht hervor, dass der Reaktionsablauf über das Camphyl-Kation zum Endprodukt Camphen energetisch stark bevorzugt ist, weshalb Camphen in der nicht-enzymatischen, säurekatalysierten Isomerisierung von (-)-α-6 Hauptprodukt ist,^[80] wohingegen es in *AacSHC*-vermittelten Biotransformationen stets nur ein Nebenprodukt darstellt. Um über das Terpinyl-Kation zu den Produkten (+)-α-Terpineol, (+)-Limonen, α-Terpinolen oder α-Terpinen reagieren zu können, ist weiterhin die Überwindung einer im Vergleich zum Camphyl-Kation signifikant höheren Aktivierungsenergie vonnöten. Umso erstaunlicher ist es, dass gerade (+)-α-Terpineol und (+)-Limonen in der *AacSHC*-katalysierten Isomerisierung von (+)-β-6 bevorzugt gebildet werden. Um diese bemerkenswerten Abweichungen von der „chemischen“, achiralen Reaktion bewerkstelligen zu können, nutzt die Cyclase ihre hydrophobe aktive Tasche, welche durch eine Vielzahl aromatischer Aminosäuren die Bildung und Stabilisierung solcher hochreaktiver Kationen unterstützt. Durch die gleichzeitige Verdrängung von Wassermolekülen wird zusätzlicher Entropiegewinn generiert, der die energetische Benachteiligung solcher Reaktionswege überkompensieren kann. Die geringe Bildung von α-Terpinen und α-Terpinolen in den analysierten Biotransformationen lässt wiederum darauf schließen, dass die Bildung dieser Spezies ausgehend vom Terpinyl-Kation im Vergleich zu (+)-α-Terpineol und (+)-Limonen deutlich weniger begünstigt ist. Hier waren die katalytischen Fähigkeiten der *AacSHC* nur in geringem Maße zur Überwindung dieser energetischen Hürden in der Lage. Alternativ ist die Bildung von α-Terpinen und α-Terpinolen auch durch Doppelbindungsisomerisierung ausgehend von (+)-Limonen denkbar. Um das Zusammenspiel beteiligter Aminosäurereste besser verstehen und Kationen-stabilisierende Effekte gezielter abrufen zu können, sind allerdings weitere Studien hierzu notwendig.

4.2.4 Die enzymatische Spirocyclisierung allylischer Alkohole

Die Brønsted-Säure-katalysierte Semi-Pinacol-Umlagerung von bicyclischen Substraten war die dritte nicht-natürliche Reaktion, welche in dieser Arbeit mit der *AacSHC*-Mutantenbibliothek untersucht wurde. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Präferenz der *AacSHC*-Varianten bzgl. bestimmter Ringgrößen sowohl im bicyclischen Substrat als auch im spirocyclischen Produkt. Dieser Reaktionstyp ist von großem synthetischen Nutzen, da er mit einer Vielzahl an Reaktionsbedingungen kompatibel ist und daher bspw. in der Naturstoffsynthese für den raschen Aufbau anspruchsvoller Molekülgerüste eingesetzt werden kann. In der Literatur sind effiziente Spirocyclisierungen allylischer Alkohole über Semi-Pinacol-Umlagerungen jedoch bisher vergleichsweise wenig beschrieben. Paquette und Mitarbeiter nutzten erfolgreich *acides Dowex 50X*, um die Spirocyclisierung allylischer Alkohole zu den entsprechenden Spiroketalen zu katalysieren, wobei Ausbeuten von 96 % für **12** und 95 % für **8** berichtet wurden.^{[90],[138]} Unter Verwendung eines chiralen Phosphorsäurekatalysators und dem Einsatz von Molsieb konnten Zhang und Mitarbeiter Verbindung **9** in Abhängigkeit des jeweils verwendeten Liganden mit 90 % Ausbeute und 98 % ee bzw. 96 % Ausbeute und 94 % ee zu **10** umsetzen. Auf die selbe Weise wurde auch **8** mit 89 % ee und 51 % Ausbeute aus **7** dargestellt.^[92] Auffallend dabei ist, dass in diesem Fall die Spirocyclisierung von **7** zu **8** mit Hilfe des Phosphorsäurekatalysators dabei deutlich weniger effizient durchführbar war als die Semi-Pinacol-Umlagerung zum entsprechenden Analogon **10**.

Für die Umsetzungen mit *AacSHC*-Varianten lässt sich zusammenfassend festhalten, dass drei der vier untersuchten bicyclischen Substrate mit *AacSHC*-Varianten umgesetzt werden konnten. Nur für das sterisch anspruchsvollste Substrat **13**, konnte kein Umsatz zu **14** detektiert werden. Allerdings ist auch in der Literatur bisher kein Beispiel für die Katalyse dieser Semi-Pinacol-Umlagerung beschrieben. Substrat **11** konnte mit *AacSHC*-Varianten A419G/Y420A/G600A (3 %) und Y609G (1 %) nur geringfügig zu **12** spirocyclisiert werden. Grund für die nicht vorhandene (**13**) bzw. niedrige (**11**) Umsetzbarkeit der Cyclopentanole konnte die (im Vergleich zu den Cyclobutanolen) höhere Stabilität und daher Reaktionsträgheit sein. Für die Umsetzung von **7** zu **8** zeigten *AacSHC*-Varianten W169A (41 %), I261A (30 %) und L607G (25 %) ca. eineinhalb bis zweifach erhöhte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (17 %). Auch für Biotransformationen mit **9** waren Mutationen dieser Positionen, dabei v.a. I261G (23 %), L607A (54 %), L607G (47 %), Y609A (45 %) und Y609G (> 99%) zielführend. Da Cyclobutanole aufgrund der größeren Torsionsspannung vergleichsweise reaktiver sind, ist eine höhere Aktivität bzgl. der Cyclobutanole **7** und **9** gegenüber den entsprechenden Cyclopentanol-Analoga zu erwarten, was auch in enzymatischen Umsetzungen beobachtet werden konnte. Dass in der Literatur für die Umsetzung von **7** geringere Ausbeuten erhalten werden als für die Spirocyclisierung von **9** könnte darauf hinweisen, dass Substrat **7** reaktiver im Hinblick auf Nebenreaktionen ist und die Ausbeute dieser Spirocyclisierungsreaktion bspw. aufgrund konkurrierender Abfangreaktionen von **7** durch Wassermoleküle verringert ist. Die Tatsache, dass in der Literatur die Ausbeuten der Semi-Pinacol-Umlagerung durch Zugabe von Molsieb gesteigert werden konnten, untermauert diese Vermutung. In der hydrophoben aktiven Tasche der *AacSHC*-Varianten spielt die Anwesenheit von Wassermolekülen vermutlich eine eher untergeordnete Rolle, sodass in der enzymvermittelten Spirocyclisierung Nebenreaktionen durch das Abfangen von Kationen durch Wassermoleküle vmtl. vernachlässigbar sein sollten. Generell fällt bei der Betrachtung der enzymatischen Semi-Pinacol-Umlagerungen von **7** und **9** auf, dass die erreichbaren Umsätze vor allem von der Wahl einer geeigneten *AacSHC*-Mutante für das jeweilige Substrat abhängen (bspw. *AacSHC*/W169A für **7** oder *AacSHC*/Y609G für **9**). Insgesamt stellten sich für die

untersuchten bicyclischen Substrate vor allem Modifikationen an Aminosäureresten L607, Y609 sowie I261 und W169 als hilfreich heraus. Dabei bewirkten jeweils v.a. Modifikationen hin zu kleineren Aminosäuren wie Alanin und Glycin, die also eine Vergrößerung der aktiven Tasche verursachten, positive Effekte, was vmtl. u.a. mit dem sterischen Anspruchs der Substrate begründet werden kann. Interessanterweise waren positive Aminosäuremodifikationen für die Spirocyclisierungen an den selben Positionen innerhalb der aktiven Tasche lokalisiert wie diejenigen, die auch schon für die Umsetzungen von (S)-Citronellal (S)-**4** direkt zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung geführt hatten: Auch für die Umsetzungen von (S)-**4** waren Substitutionen an Position W169 und I261 vor allem L607 und Y609 hinsichtlich der spezifischen Bildung bestimmter Isopulegolisomere besonders geeignet. Auch wenn (wie in 4.2.2 beschrieben) der positive Einfluss der eher abseits liegenden Modifikationen von W169 und I261 auch für die Spirocyclisierungen bis jetzt nicht genau erklärt werden kann, bestätigt diese Beobachtung doch obige Annahme, dass solche Aminosäurepositionen durch sekundäre Effekte für die Umsetzungen kleinerer, nicht-natürlicher Substrate eine wichtige Rolle zu spielen scheinen.^{[31],[46]}

Um weitere Einblicke bzgl. Platzanspruch und Umsetzbarkeit der bicyclischen Substrate zu gewinnen, wurden diese anhand des co-kristallisierten Substratanalogons Azasqualen mittels PyMol in die Kristallstruktur der AacSHC modelliert. Visualisierungen dazu sind nachfolgend in Abb. 4.5 gezeigt.

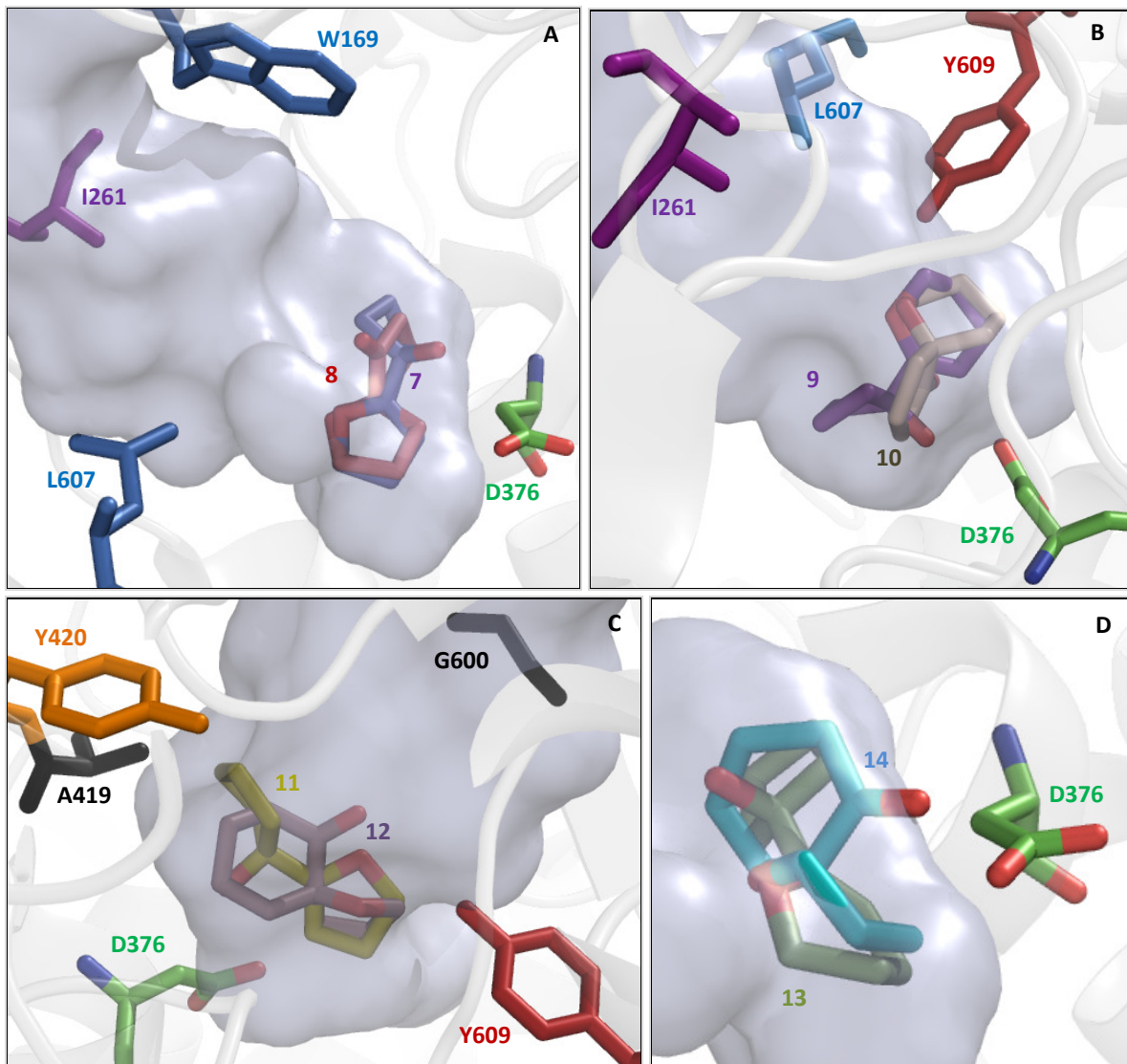


Abbildung 4.5: Modellierung der Substrate für die Spirocyclisierung. Darstellung als Stabmodelle. Die aktive Tasche der AacSHC ist grau, die katalytische Asparaginsäure D376 grün hervorgehoben. Aminosäurereste, an welchen Modifikationen die Umsetzung der nicht-natürlichen Substrate zu den entsprechenden Spirocyclen förderten, sind ebenfalls farbig als Stabmodelle hervorgehoben, wobei die Färbung substratbindende (blau, orange), Kationen-stabilisierende (rot, orange), stereokontrollierende (lila) Funktionen^[46] oder hydrophobe Aminosäurereste formgebender Natur (schwarz) indiziert. Modellierung von **A** Substrat **7** (blau) und Produkt **8** (rot) bzw. **B** Substrat **9** (lila) und Spirocyclus **10** (beige) bzw. **C** Substrat **11** (gelb) mit Produkt **12** (lila) bzw. **D** Substrat **13** (dunkelgrün) sowie **14** (türkis).

Dabei war auffallend, dass sowohl bei Bildung von **12** und **14** der neugebildete Oxocyclohexyl-Ring so positioniert ist, dass er durch die im Laufe der Reaktion nötige Konformationsänderung vmtl. mit dem Rand der aktiven Taschen kollidieren würde, sofern die Verbindung nicht zu ausweichenden Rotationsbewegungen in der Lage ist. Da AacSHC-Varianten **12** allerdings cyclisieren konnten, wohingegen für **14** keine Produktbildung detektiert wurde, lässt dies vermuten, dass eine gewisse Beweglichkeit bei der Umsetzung von **11** zu **12** noch möglich, aus sterischen Gründen für die

Spirocyclisierung von **13** zu **14** jedoch nicht mehr gegeben war. Dies ist ebenfalls im entsprechenden Arbeitsmodell mit **13** und **14** zu erkennen, bei dem im Gegensatz zu den anderen allylischen Alkoholen bzw. Spirocyclen rein aus sterischen Gründen keine Positionierung der Verbindungen vor der katalytischen Asparaginsäure möglich war. Dass lediglich Substrat **13** von keiner *AacSHC*-Variante umgesetzt wurde, unterstreicht die katalytische Kraft der Cyclase auch gegenüber dieser nicht-natürlichen Reaktion. Unklar ist bisher allerdings, inwiefern in diesem Falle der räumliche Anspruch von Substraten und Produkten bereits beim Ein- bzw. Austritt in die aktive Tasche zum Tragen kommt und dadurch ein zusätzliches Reaktionshindernis darstellt. Daher kann nicht abschließend geklärt werden, ob verringerte Ausbeuten durch verminderte Reaktivitäten, Stabilitäten, Diffusionslimitierungen oder durch sterische Hinderung von (für die Reaktion notwendigen) Molekülbewegungen verursacht werden. Weitere (Mutagenese)Studien dahingehend wären notwendig, um den Einfluss dieser Faktoren genauer zu untersuchen.

V FAZIT UND AUSBLICK

Mit dem Ziel, das Spektrum SHC-vermittelter Brønsted-Säure-Katalyse weiter ausbauen und die katalytischen Möglichkeiten auszuschöpfen, die diese Enzyme für die Synthese vielfältiger Naturstoffe anbieten, war der Fokus dieser Arbeit auf die Prins-/En-Reaktion von Citronellal, die Isomerisierung von (+)- β -Pinen, sowie die Semi-Pinacol-Umlagerung allylischer Alkohole gerichtet worden, wobei nicht-natürliche, (mono)terpenoide Substrate untersucht wurden.

Zum einem stellte die Squalen-Hopen Cyclase aus *Zymomonas mobilis* (*ZmoSHC1*) einen vielversprechenden Kandidaten für die Umsetzung derartiger Verbindungen dar, da diese bereits von Natur aus kleinere Terpensubstrate (C_{10} - C_{15}) längeren (C_{30}) Terpenen klar zu bevorzugen scheint. Um diese Cyclase durch Mutagenese weiter zu untersuchen und hinsichtlich dieser Reaktionen zu verbessern, sollte zunächst die Kristallstruktur der *ZmoSHC1* in Zusammenarbeit mit der RUG Groningen (Niederlande) aufgeklärt werden. Hierfür konnten in dieser Arbeit erfolgreich einige entscheidende *ZmoSHC1*-Mutanten erstellt sowie ein effektives Protokoll zur Reinigung dieser Membranproteine erstellt werden. Damit konnten grundlegende Arbeiten geleistet werden, welche nun die Basis für die Verfeinerung und Optimierung der Proteinstabilisierung und -kristallisierung darstellen. Zwar waren zum jetzigen Zeitpunkt bereits erfolgreich erste Proteinkristalle gewonnen worden, allerdings besteht weiterer Verbesserungsbedarf hinsichtlich der Stabilisierung des leicht aggregierenden Zielproteins, um die Auflösung der Kristallstruktur zu erhöhen. Nichtsdestotrotz ist die Aufklärung der Kristallstruktur der *ZmoSHC1* damit bereits in greifbare Nähe gerückt.

Durch Umformung (*reshaping*) der aktiven Tasche der Squalen-Hopen Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*AacSHC*) wurde außerdem ein umfangreiches Set an *AacSHC*-Varianten erstellt, welche sich durch eine stark acide Protonierungsmaschinerie in einer chiralen, hydrophoben Reaktionsumgebung auszeichnen und zielführend auf drei Brønsted-Säure-katalysierte Reaktionen angewendet werden konnten. Zwar wurden für alle drei Reaktionstypen vielversprechende *AacSHC*-Mutanten identifiziert, die bereits bemerkenswerte Selektivitäten aufwiesen, jedoch besteht in allen Fällen die Möglichkeit zu weiterer Optimierung und Verfeinerung dieser Biokatalysatoren: Für die Umsetzung von (*S*)-Citronellal zu Isopulegolisomeren war durch geringfügige Modifikation bereits direkt eine Reihe diastereoselektiver *AacSHC*-Varianten (> 99 % de) geschaffen worden. Auch für (*R*)-Citronellal und speziell für dessen selektive Cyclisierung zu (-)-Isopulegol konnten hochselektive Enzymvarianten designt werden. Allerdings ist für letztere noch weiterer Feinschliff vonnöten, um ebenso exzellente Produktspezifitäten wie im Falle von (*S*)-Citronellal zu erreichen. Eine zusätzliche Verbesserung der Diastereoselektivitäten der *AacSHC*-Mutanten bzgl. dieser speziellen Reaktion (bspw. über CASTing oder Sättigungsmutagenese) wäre von enormem industriellen Interesse, da das Produkt (-)-Isopulegol eine wichtige Vorläuferverbindung im Herstellungsprozess des Duft- und Geschmackstoffes (-)-Menthol darstellt.

Anhand der Isomerisierung von (+)- β -Pinen wurde untersucht, inwiefern unterschiedliche mögliche Reaktionspfade ausgehend vom selben kationischen Intermediat selektiv adressiert werden konnten. Auch hier wurden geeignete *AacSHC*-Varianten mit neugeformten aktiven Taschen identifiziert, welche das breit gefächerte Produktspektrum des *AacSHC*-Wildtyps signifikant verschoben und z.T. hohe Produktselektivitäten erreichten. Da die Sättigung des Enzyms mit Substrat unter Standardbedingungen nicht einfach möglich ist, sind kinetische Untersuchungen nach wie vor schwierig, könnten jedoch über die Analyse der Produktverteilung zu unterschiedlichen Reaktionszeitpunkten erfolgen und so wichtige neue Erkenntnisse dahingehend liefern. Ungeklärt bleibt hierbei auch die Frage der Reversibilität der Reaktion, d.h. inwiefern *AacSHC*-Varianten zur weiteren Umsetzung der detektierten Produkte in der Lage sind. Tiefenbacher und Kollegen konnten

bspw. in Arbeiten mit einem, die aktive Tasche der Terpencyclasen imitierenden Resorcinaren-Katalysator zeigen, dass ausgehend vom Geranyl kation nach 20 h hauptsächlich α -Terpineol gebildet wurde, welches jedoch nur ein Intermediat darstellte und nach insgesamt 50 h Reaktionszeit zu den drei Hauptprodukten Eukalyptol, α -Terpinen und α -Terpinolen weiterreagiert hatte.^[139] Um diese Möglichkeit in Bezug auf die Isomerisierung von (+)- β -Pinen zu untersuchen, könnten zukünftig die säurekatalysierten Reaktionen der Verbindungen (-)- α -Pinen, (+)-Camphen, α -Terpinen, (+)-Limonen α -Terpinolen, (+)- α -Terpineol) durch Umsetzungen mit *AacSHC*-Varianten gezielt separat analysiert werden. Um das Set produkt-selektiver Biokatalysatoren für die Umsetzung von (+)- β -Pinen weiter auszubauen, sollten zusätzliche *AacSHC*-Varianten gereinigt und über Biotransformationen analysiert werden. Anhand der durchgeführten Voruntersuchungen in Ganzzellumsetzungen können diese leicht ausgewählt und der bereits vorhandenen Mutantenbibliothek (der Sättigungs-mutagenese) entnommen werden. Zudem wären Experimente zum Einfluss der Wassermoleküle auf die Reaktion interessant, für welche *AacSHC*-Varianten mit blockierten Wasserkanälen eingesetzt werden könnten.

Auch für die Semi-Pinacol-Umlagerungen zur Bildung spirocyclischer Verbindungen wäre der Ausschluss von Wassermolekülen bzw. die Blockade der Wassertunnel ein wichtiger Versuch, um die Bildung von Nebenprodukten durch das Abfangen intermediärer Kationen durch Nukleophile zu vermeiden. Generell sind die Reaktionshindernisse im Falle dieser enzymatischen Umsetzung noch vergleichsweise wenig verstanden und bedürfen detaillierteren Untersuchungen. Es ist bspw. ebenfalls unklar, inwieweit der räumliche Anspruch von Substraten und Produkten beim Ein- bzw. Austritt in die aktive Tasche zum Tragen kommt. So kann daher bisher nur schwer abgeschätzt werden, ob niedrige Ausbeuten durch verminderte Reaktivitäten, Stabilitäten, Diffusions-limitierungen oder durch sterische Hinderung von Molekülbewegungen während der Reaktion verursacht werden. Auch hier wären daher ergänzende Studien dahingehend notwendig, um den Einfluss dieser Faktoren genauer zu untersuchen.

Abschließend lässt sich jedoch zusammenfassend festhalten, dass die Steuerung des Reaktionsraumes SHC-katalysierter Transformationen ein enormes Potential für die enzymatische Brønsted-Säure-Katalyse birgt, welches bei weitem noch nicht völlig ausgeschöpft ist.

A ANHANG

Im Anhang befinden sich Aufzeichnungen bezüglich gentechnischer Arbeiten, sowie zusätzliche experimentelle Daten und Informationen, welche im Text aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht aufgeführt wurden.

A.1 Sequenzen der verwendeten SHCs

Alle nachfolgend aufgelisteten Sequenzen entsprechen den jeweiligen Wildtyp-Varianten der SHCs.

A.1.1 Gensequenz der Squalen-Hopen Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AacSHC)

Uniprot-Zugangsnummer: P33247

```
ATGGCGAACAGCTGGTGAAGCGCCGGCGTATGCGCGCACCTGGATCGCGCGGTGGAATATCTGCTGAGC
TGCCAGAAAGATGAAGGCTATTGGTGGGGCCCCGCTGCTGAGCAACGTGACCATGGAAGCGGAATATGTGCTG
CTGTGCCATATTCTGGATCGCGTGGATCGCGATCGCATGGAAAAATTCGCCGCTATCTGCTGCATGAACAGC
GCGAAGATGGCACCTGGGCGCTGTATCCGGGCGGCCCGCGGATCTGGATACCACCATTGAAGCGTATGTGG
CGCTGAAATATATTGGCATGAGCCGCGATGAAGAACCGATGCAGAAAGCGCTGCGCTTTATTAGAGCCAGG
GCGGCATTGAAAGCAGCCGCGTGTTCACCCGCATGTGGCTGGCGCTGGTGGCGAATATCCGTGGGAAAAAG
TGCCGATGGTGGCGCCGAAATTATGTTTCTGGGCAAACGCATGCCGCTGAACATTTATGAATTTGGCAGCTG
GGCGCGCGCACCGTGGTGGCGCTGAGCATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGTTCGCTGCCGGAACGCGC
GCGCGTGGCGAACTGTATGAAACCGATGTGCCGCCGCGCCGCGCGGCGCGAAAGGCGGCGGCGGCTGGA
TTTTGATGCGCTGGATCGCGCGCTGCATGGCTATCAGAACTGAGCGTGCATCCGTTTCGCCGCGCGGCGGA
AATTCGCGCGCTGGATTGGCTGCTGGAACGCCAGGCGGGCGATGGCAGCTGGGGCGGCATTAGCCGCCCGTG
GTTTTATGCGCTGATTGCGCTGAAAATTCTGGATATGACCCAGCATCCGGCGTTTTATTAAGGCTGGGAAGGC
CTGGAACCTGTATGGCGTGGAACTGGATTATGGCGGCTGGATGTTTCAGGCGAGCATTAGCCCGGTGTGGGAT
ACCGGCCTGGCGGTGCTGGCGCTGCGCGCGGGCGGCTGCCGGCGGATCATGATCGCCTGGTGAAAGCGGG
CGAATGGCTGCTGGATCGCCAGATTACCGTGCCGGGCGATTGGGCGGTGAAACGCCCCGAACCTGAAACCGG
CGGCTTTGCGTTTCAGTTTGATAACGTGTATTATCCGGATGTGGATGATACCGCGGTGGTGGTGTGGGCGCTG
AACACCCTGCGCCTGCCGGATGAACGCCGCCCGCGATGCGATGACCAAAGGCTTTCGCTGGATTGTGGGC
ATGCAGAGCAGCAACGGCGGCTGGGGCGCGTATGATGTGGATAACACCAGCGATCTGCCGAACCATATTCCG
TTTTGCGATTTTGGCGAAGTGACCGATCCGCCGAGCGAAGATGTGACCGCGCATGTGCTGGAATGCTTTGGCA
GCTTTGGCTATGATGATGCGTGGAAGTGATTGCGCCGCGCGGTGGAATATCTGAAACGCGAACAGAAACCGG
ATGGCAGCTGGTTTGGCCGCTGGGGCGTGAACCTATCTGTATGGCACCGGCGCGGTGGTGAAGCGCGCTGAAAG
CGGTGGGCATTGATACCCGCGAACCGTATATTAGAAAGCGCTGGATTGGGTGGAACAGCATCAGAAACCCGG
ATGGCGGCTGGGGCGAAGATTGCCGAGCTATGAAGATCCGGCGTATGCGGGCAAAGGCGCGAGCACCCCG
AGCCAGACCGCGTGGGCGCTGATGGCGCTGATTGCGGGCGGCCGCGCGAAAGCGAAGCGGCGCGCCGCG
GCGTGACAGTATCTGGTGGAAACCCAGCGCCCCGGATGGCGGCTGGGATGAACCGTATTATACCGGCACCGGT
TCCCGGGCGATTTTTATCTGGGCTATACCATGTATCGCCATGTGTTTCCGACCCTGGCGCTGGGCGGCTATAAA
CAGGCGATTGAACGCCGCTAA
```

A.1.2 Aminosäuresequenz der AacSHC

MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSNVTMEAEYVLLCHILDREVDRDRMEKIRRYLLHEQRED
GTWALYPGPPDLTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMPVP
EIMFLGKRMPLNIEYFGSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGAKGGGGWIFDALDRALH
GYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQQPWYFALIALKILDMTQHHPAFIKGWEGLELYGVELDYGG
WMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGEWLLDRQITVPGDWAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPD
VDDTAVVVWALNTRLRPDERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAYDVDNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPPSED
VTAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLKREQKPDGSWFGRWGVNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREPVIQKALDW
VEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWALMALIAGGRAESEARRGVQYLQVETQRPDGGWDEP
YYTGTGFPDGYLGYTMYRHVFPTLALGRYKQAIERR*

(631 Aminosäuren, MW: ~ 71,6 kDa)

A.1.3 Gensequenz der Squalen-Hopen Cyclase aus *Zymomonas mobilis* (ZmoSHC1)

Uniprot-Zugangsnummer: Q5NM88

ATGGGTATTGACAGAAATGAATAGCTTAAGTCGCTTGTTAATGAAGAAGATTTTCGGGGCTGAAAAACCTCGT
ATAAACCGCTTCCGATACCATAATCGGAACGGATACCCTGAAAAGACCGAACCGGCGCCTGAACCGACGG
CAAAAGTCGACAAAACGATATTCAAGACTATGGGAATAGTCTGAATAATACCCTGTTTCAGCCTGTGACTG
GTTGATCGGACAACAAAAGCCCGATGGTCATTGGGTCGGTGCCGTGGAATCCAATGCTTCGATGGAAGCAGA
ATGGTGTCTGGCCTTGTGTTTTTGGGTCTGGAAGATCATCCGCTTCGTCCAAGATTGGGCAATGCTCTTTTGG
AAATGCAGCGGGAAGATGGCTCTTGGGGAGTCTATTTCCGGCGCTGGAAATGGCGATATCAATGCCACGGTTG
AAGCCTATGCGGCCTTGCAGTCTTTGGGGTATTCTGCCGATAATCCTGTTTTGAAAAAGCGGCAGCATGGATT
GCTGAAAAAGCGGATTAATAAATATCCGTGTCTTTACCCGTTATTGGCTGGCGTTGATCGGGGAATGGCCTT
GGGAAAAGACCCCTAACCTTCCCCCTGAAATTATCTGGTTCCCTGATAATTTTGTCTTTTCGATTTATAATTTTGC
CCAATGGGCGCGGGCAACCATGGTGCCGATTGCTATTCTGTCCGCGAGACGACCAAGCCGCCGCTGCGCCCT
CAAGACCGATTGGATGAACTGTTTCCAGAAGGCCGCGCTCGCTTTGATTATGAATTGCCGAAAAAAGAAGGCA
TCGATCTTTGGTCGCAATTTTCCGAACCACTGACCGTGGATTACATTGGGTTCAGTCCAATCTGTAAAGCGCA
ATAGCTTTCGTGAAGCCGCTATCCGTCATGTTTTGGAATGGATTATCCGGCATCAGGATGCCGATGGCGGTTG
GGGTGGAATTCAGCCACCTTGGGTCTATGGTTTATGATGGCGTTACATGGTGAAGGCTATCAGCTTTATCATCCG
GTGATGGCCAAGGCTTTGTCGGCTTTGGATGATCCCGTTGGCGACATGACAGAGGCGAGTCTTCTTGGATAC
AGGCCACCAATAGTCCGGTATGGGATACAATGTTGGCCTTATGATGGCGTTAAAAGACGCCAAGGCCGAGGATC
GTTTTACGCCGAAATGGATAAGGCCGCCGATTGGCTTTTGGCTCGACAGGTCAAAGTCAAAGGCGATTGGTC
AATCAAATGCCGATGTTGAACCCGGTGGATGGGCATTTGAATATGCCAATGATCGCTATCCCGATACCGAT
GATACCGCCGTCGCTTTGATCGCCCTTCTCTTATCGTGATAAGGAGGAGTGGCAAAGAAAGGCGTTGAGG
ACGCCATTACCCGTGGGGTTAATTGGTTGATCGCCATGCAAAGCGAATGTGGCGGTTGGGGAGCCTTTGATAA
GGATAATAACAGAAGTATCCTTTCCAAAATCCTTTTTGTGATTTTCGGAGAATCTATTGATCCGCCTTCAGTCGA
TGTAACGGCGCATGTTTTAGAGGCCTTTGGCACCTTGGGACTGTCCCGCGATATGCCGGTCATCCAAAAGCG
ATCGACTATGTCCGTTCCGAACAGGAAGCCGAAGGCGCGTGGTTTGGTTCGTTGGGGCGTTAATTATATCTATG
GCACCGGTGCGGTTCTGCCTGCTTTGGCGGCGATCGGTGAAGATATGACCCAGCCTTACATACCAAGGCTTG
CGATTGGCTGGTCGCACATCAGCAGGAAGACGGCGGTTGGGGCGAAAGCTGCTCTTCTATATGGAGATTGA
TTCCATTGGGAAGGGCCCAACCACGCCGTCAGACTGCTTGGGCTTTGATGGGGTTGATCGCGGCCAATCGT
CCCGAAGATTATGAAGCCATTGCCAAGGGATGCCATTATCTGATTGATCGCCAAGAGCAGGATGGTAGCTGGA
AAGAAGAAGAATTCACCGGCACCGGATTTCCCGGTTATGGCGTGGGTCAGACGATCAAGTTGGATGATCCGG
CTTTATCGAAACGATTGCTTCAAGGCGCTGAACTGTACGGGCGTTTATGCTGCGTTATGATTTTTATCGGCAA
TTCTTCCCGATTATGGCGTTAAGTCGGGCGAGAGACTGATTGATTTGAATAATTGA

A.1.4 Aminosäuresequenz der *ZmoSHC1*

MGIDRMNSLSRLLMKKIFGAEKTSYKPASDTIIGTDTLKRPNRRPEPTAKVDKTIKTMGNSLNNTLVSACDWLIGQ
QKPDGHWVGAVESNASMEAEWCLALWFLGLEDHPLRPRLGNALLEMQREDGSWGVYFGAGNGDINATVEAYA
ALRSLGYSADNPVLKAAAAWIAEKGGKLNIRVFTRYWLALIGEWPEKTPNLPPEIWFDPDNFVFSIYNFAQWARA
TMVPIAILSARRPSRPLRPQDRLELPEGRARFDYELPKKEGIDLWSQFFRTTDRGLHWVQSNLLKRNSLREAAIRH
VLEWIIRHQDADGGWGGIQQPPWVYGLMALHGEGYQLYHPVMAKALSALDDPGWRHDRGESSWIQATNSPVW
DTMLALMALKDAKAEDRFTPEMDKAADWLLARQVKVKGDSIKLPDVEPGGWAFEYANDRYPDTDDTAVALIA
LSSYRDKEEWQKKGVEDAITRGVNWLIAMQSECGGWGAFDKDNNRSILSKIPFCDFGESIDPPSVDVTAHVLEAFG
TLGLSRDMPVIQKAIDYVRSEQEAEGAWFGRWGVNYIYGTGAVLPALAAIGEDMTQPYITKACDWLVAHQQEDG
GWGESCSSYMEIDSIGKGPPTPSQTAWALMGLIAANRPEDYEIAIKGCHYLIDRQEQDGSWKKEEFTGTGFPGYG
VGQTIKLDDPALSKRLLQGAELSRFMLRYDFYRQFFPIMALSRAERLIDLNN*
(725 Aminosäuren, MW: ~ 81,7 kDa)

A.2 Klonierung und Expressionsstudien der *ZmoSHC1*-Varianten

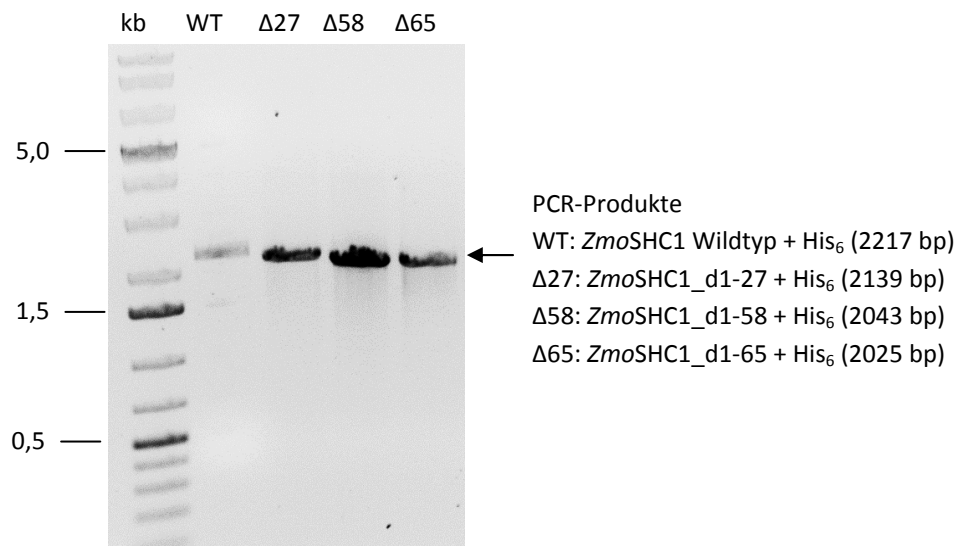


Abbildung A.1: Agarosegel (0,7 %) zur Kontrolle gereinigter PCR-Ansätze für die Generierung von *ZmoSHC1*-Varianten. kb : DNA-Standard GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Markierte DNA-Banden im Bereich über 2000 bp entsprechen den Größen der amplifizierten *ZmoSHC1*-PCR-Produkte.

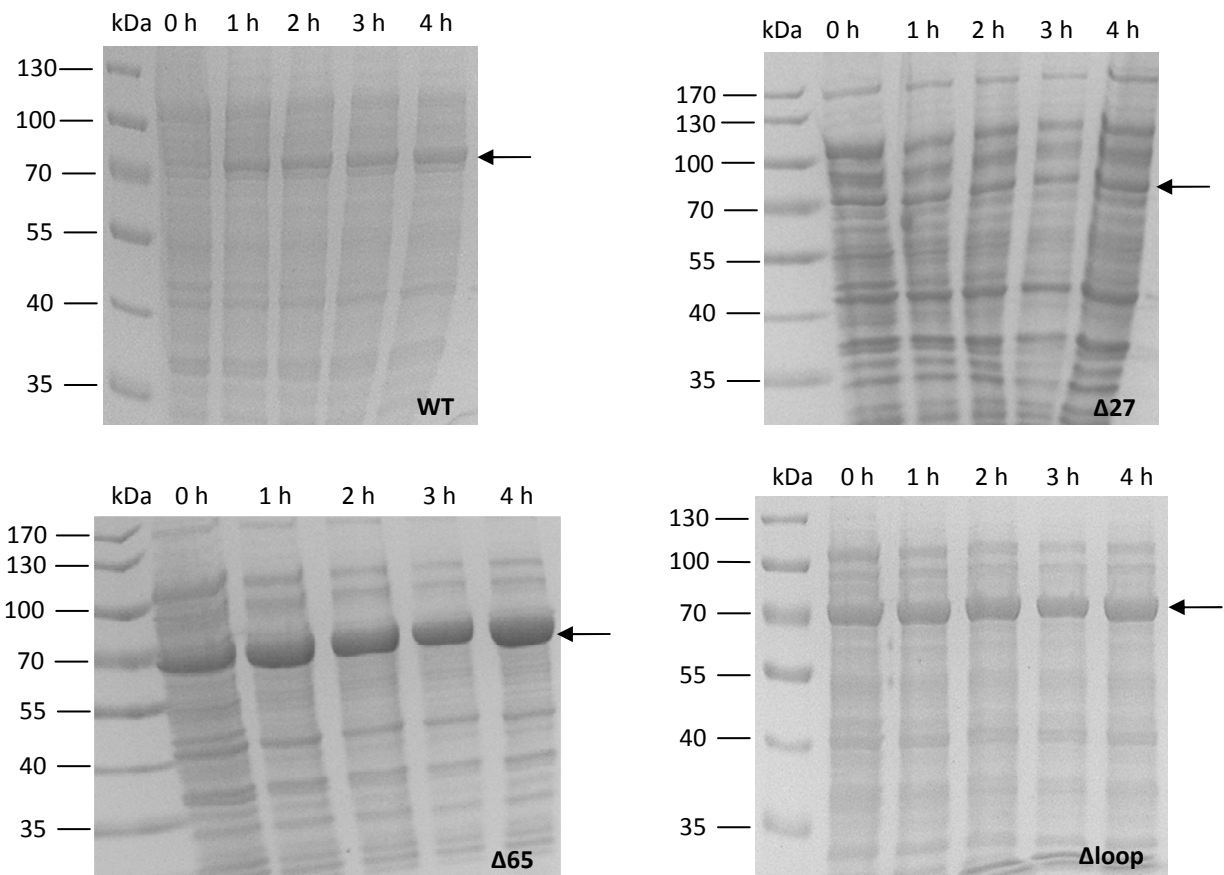


Abbildung A.2: Coomassie-gefärbte Polyacrylamidgele (10 %) zur Expressionsstudie der *ZmoSHC1*-Varianten (Pfeil) in *E. coli* BL21(DE3). kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder (2.8.7). x h: Probe nach x h Überexpression von **WT**: *ZmoSHC1* WT+His₆ (MW: 83,2 kDa). **Δ27**: *ZmoSHC1*_d1-27+His₆ (MW: 80,2 kDa). **Δ65**: *ZmoSHC1*_d1-65+His₆ (MW: 76 kDa). **Δloop**: *ZmoSHC1*_d671-696+His₆ (MW: 80,4 kDa).

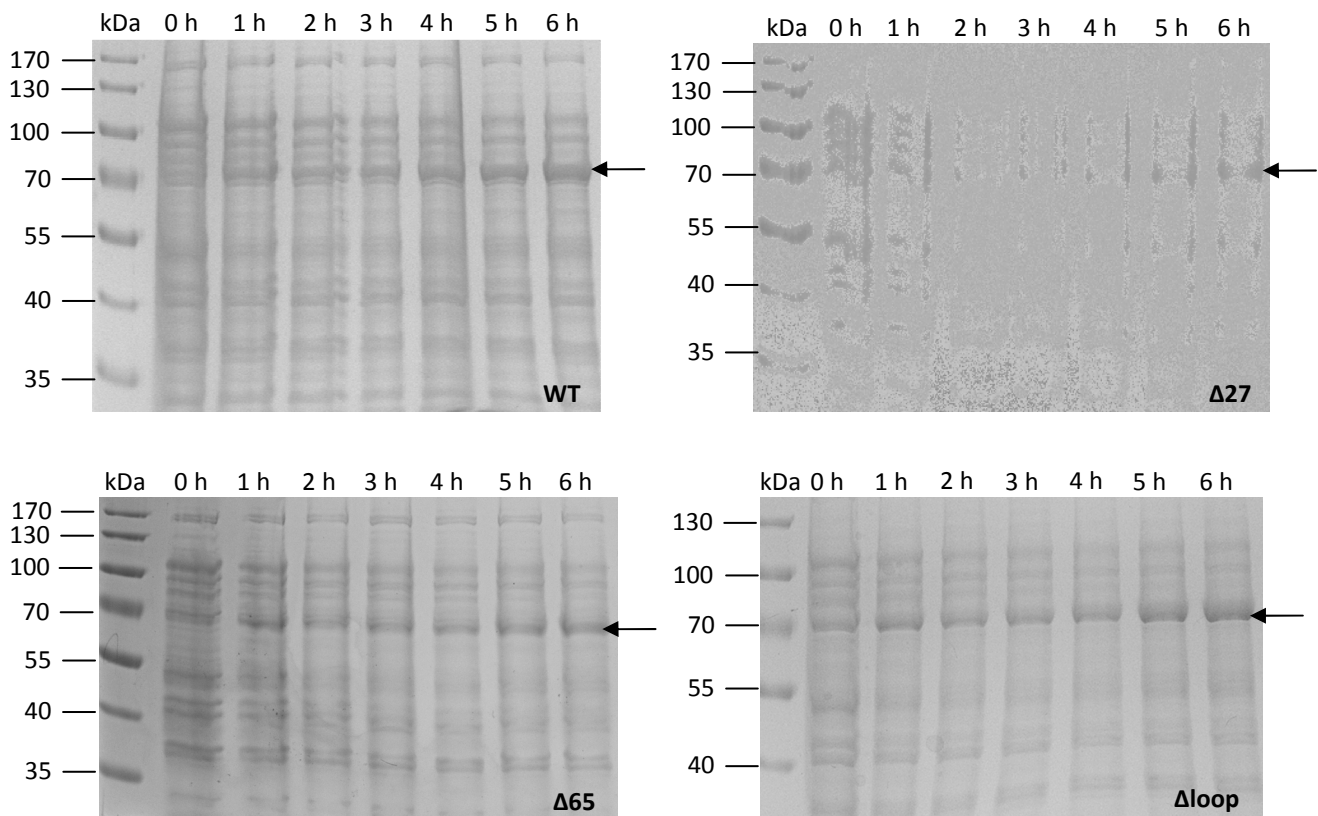


Abbildung A.3: Coomassie-gefärbte Polyacrylamidgele (10 %) zur Expressionsstudie der *ZmoSHC1*-Varianten (Pfeil) in *E. coli* C43(DE3). kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. x h: Probe nach x h Überexpression von **WT**: *ZmoSHC1* WT+His₆ (MW: 83,2 kDa). **Δ27**: *ZmoSHC1*_d1-27+His₆ (MW: 80,2 kDa). **Δ65**: *ZmoSHC1*_d1-65+His₆ (MW: 76 kDa). **Δloop**: *ZmoSHC1*_d671-696+His₆ (MW: 80,4 kDa).

A.3 Reinigung und Charakterisierung der *ZmoSHC1*-Varianten

A.3.1 Anreicherung und Reinigung über Metallaffinitätschromatographie

Nachfolgend sind exemplarische Chromatogramme und Polyacrylamidgels zur Reinigung von *ZmoSHC1*_d1-27, *ZmoSHC1*_d1-58 und *ZmoSHC1*_d1-65 mittels IMAC abgebildet (Abb. A.4 bis Abb. A.9). Zusätzlich zum Polyacrylamidgel ist exemplarisch die Identifizierung über Western Blot und Immundetektion am Beispiel von *ZmoSHC1*_d1-58 gezeigt (Abb. A.7, rechts).

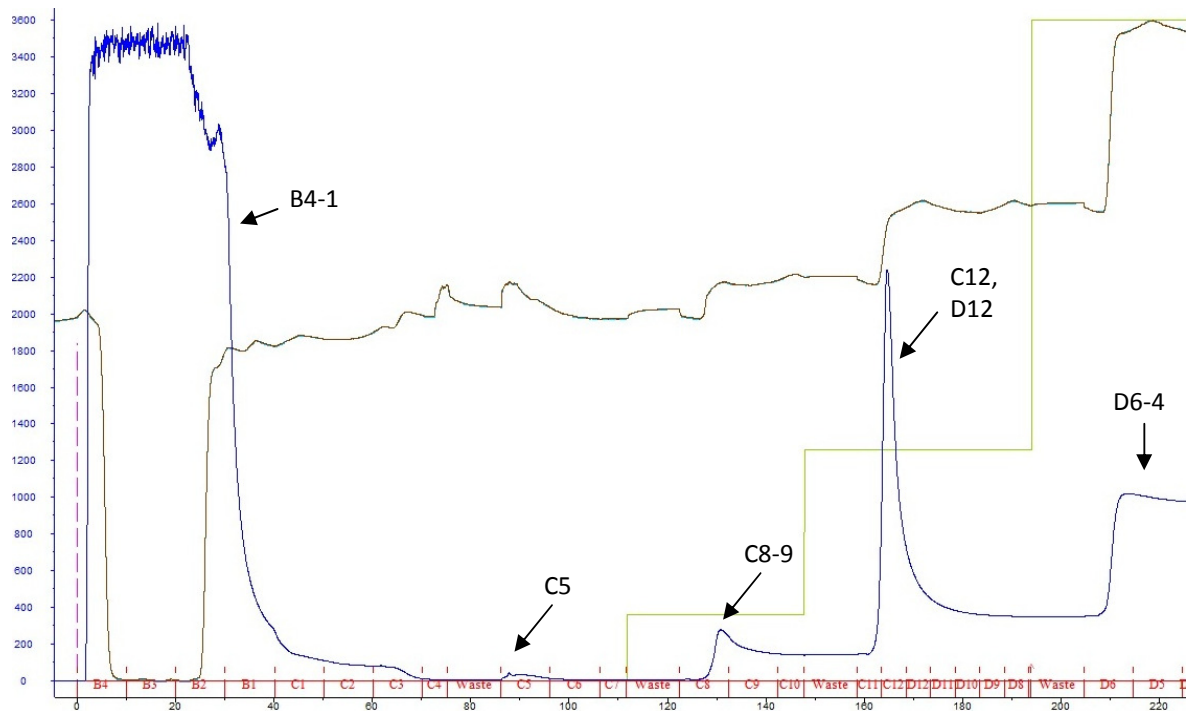


Abbildung A.4: Chromatogramm zur Reinigung von *ZmoSHC1*_d1-27 mittels IMAC. Blau: UV-Absorption bei 280 nm [mAU]. Grün: Stufengradient mit 0 % Puffer B (0 mM Imidazol), 10 % Puffer B (50 mM Imidazol), 35 % Puffer B (175 mM Imidazol), 100 % Puffer B (500 mM Imidazol). Rot: Fraktionen. Pfeil: Peaks eluierter Proteinfractionen (s. a. Abb. A.5).

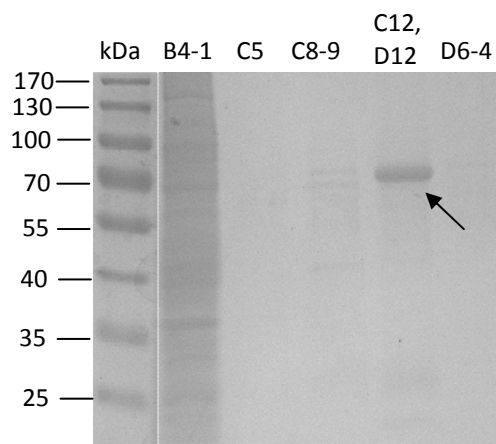


Abbildung A.5: Polyacrylamidgel (10 %) zur Reinigung von *ZmoSHC1*_d1-27 mittels IMAC. Anfärbung des Gels mittels sensitiver kolloidalen Coomassie-Färbung. kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. B4-1 bis D6-4: Vereinigte Fraktionen detektierter Peaks (s. a. Abb. A.4). Pfeil: Proteinbande auf Höhe des Zielproteins *ZmoSHC1*_d1-27+His₆ (MW: 80,2 kDa).

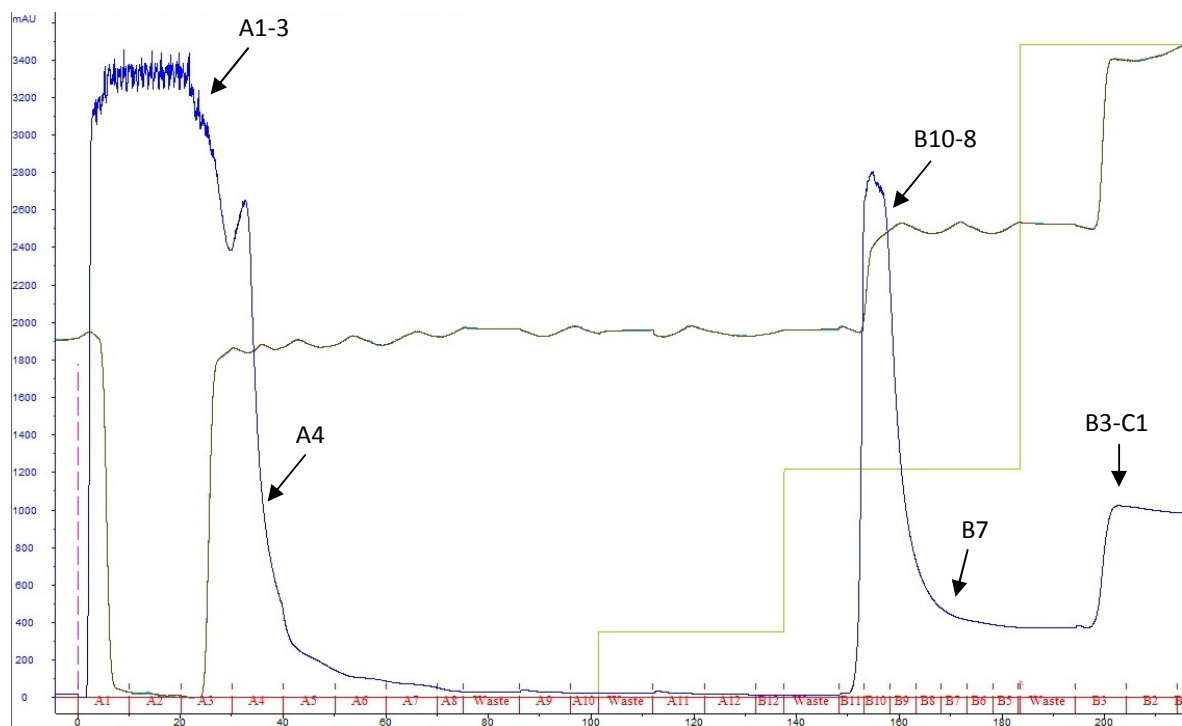


Abbildung A.6: Chromatogramm zur Reinigung von *ZmoSHC1_d1-58* mittels IMAC an einer HisTrap FF-Säule. Blau: UV-Absorption bei 280 nm [mAU]. Grün: Stufengradient mit 0 % Puffer B (0 mM Imidazol), 10 % Puffer B (50 mM Imidazol), 35 % Puffer B (175 mM Imidazol), 100 % Puffer B (500 mM Imidazol). Rot: Fraktionen. Pfeil: Signale eluierter Proteinfractionen (s. a. Abb. A.7).

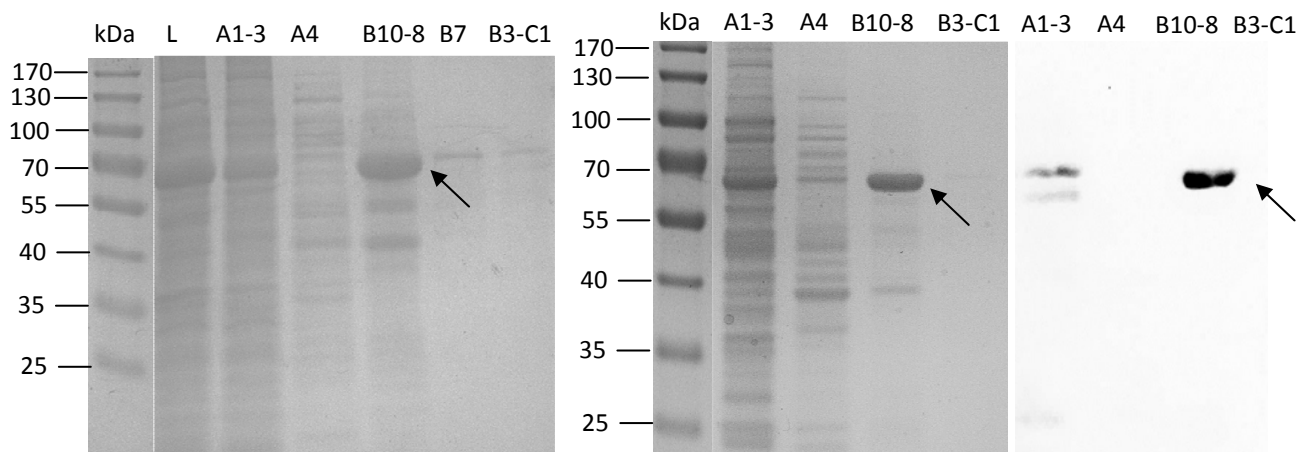


Abbildung A.7: Links, Mitte: Polyacrylamidgele (10 %) zur Reinigung von *ZmoSHC1_d1-58* mittels IMAC. Anfärbung des Gels mittels sensitiver kolloidaler Coomassie-Färbung. Rechts: Chemolumineszenz-Aufnahme Anti-Polyhistidin-Antikörpernachweises (Farben der ECL-Aufnahme sind invertiert). kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. L: Lysat-Probe nach der Solubilisierung. A1-3 bis B3-C1: Vereinigte Fraktionen detektierter Signale (s. a. Abb. A.6). Pfeile: Proteinbanden auf Höhe des Zielproteins *ZmoSHC1_d1-58+His₆* (MW: 76,6 kDa).

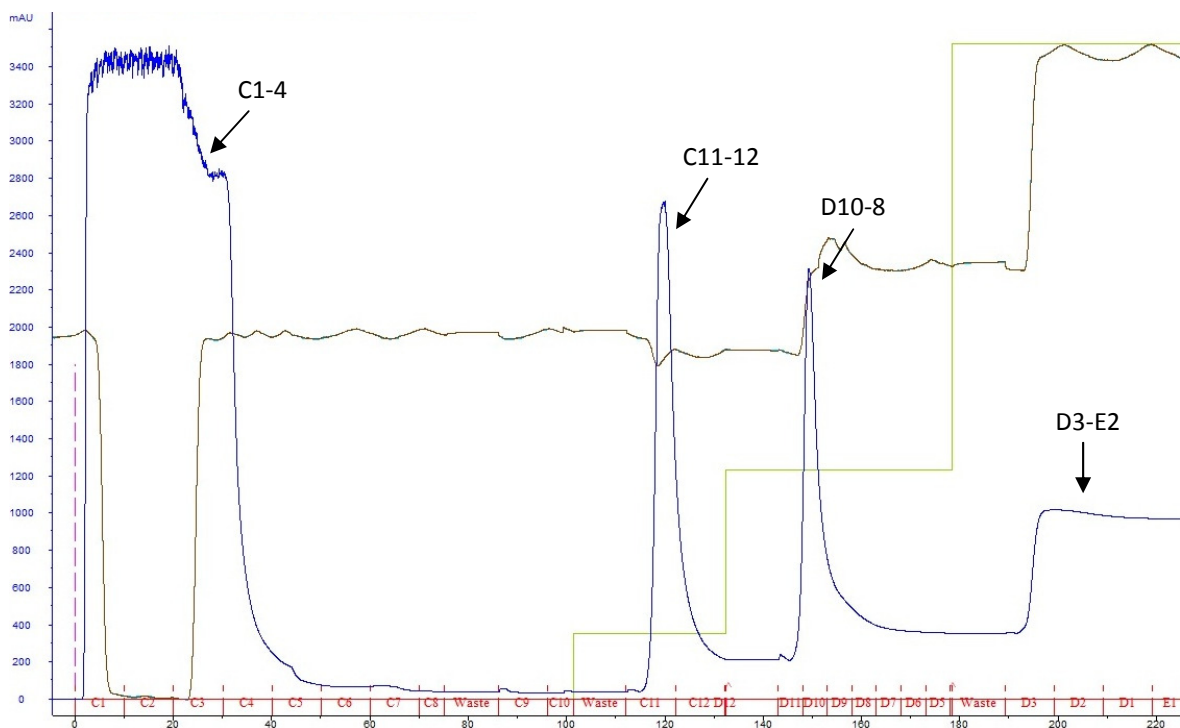


Abbildung A.8: Chromatogramm zur Reinigung von *ZmoSHC1_d1-65* mittels IMAC an einer HisTrap FF-Säule. Blau: UV-Absorption bei 280 nm [mAU]. Grün: Stufengradient mit 0 % Puffer B (0 mM Imidazol), 10 % Puffer B (50 mM Imidazol), 35 % Puffer B (175 mM Imidazol), 100 % Puffer B (500 mM Imidazol). Rot: Fraktionen. Pfeil: Signale eluierter Proteinfractionen (s. a. Abb. A.9).

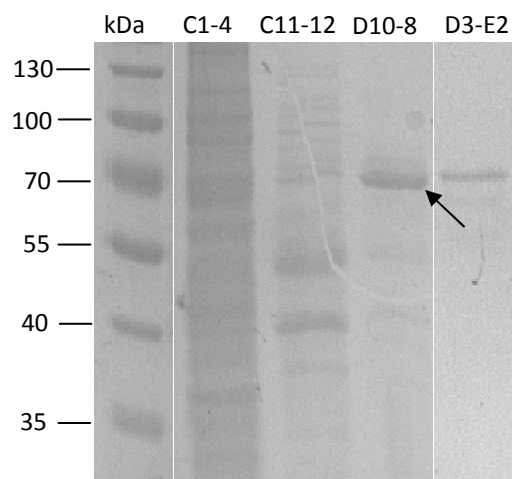


Abbildung A.9: Polyacrylamidgel (10 %) zur Reinigung von *ZmoSHC1_d1-65* mittels IMAC. Anfärbung des Gels mittels sensitiver kolloidalen Coomassie-Färbung. kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. C1-4 bis D3-E2: Vereinigte Fraktionen detektierter Signale (s. a. Abb. A.8). Pfeil: Proteinbande auf Höhe des Zielproteins *ZmoSHC1_d1-65+His₆* (MW: 76 kDa).

A.3.2 Verfeinerung der Proteinreinigung über Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

Nachfolgend sind die SEC-Chromatogramme und entsprechende Polyacrylamidgele der Reinigung von *ZmoSHC1*-Wildtyp, *ZmoSHC1*_d1-27 und *ZmoSHC1*_d1-65 abgebildet (Abb. A.10 bis Abb. A.15). Einzelne Signale sind den entsprechenden Enzymvarianten und Molekulargewichtsbereichen zugeordnet. Als Probe für die SEC des *ZmoSHC1*-Wildtyps wurden die Fraktionen B12-9 des vorangegangenen IMAC-Laufes (Abb. 3.6 und Abb. 3.7) verwendet.

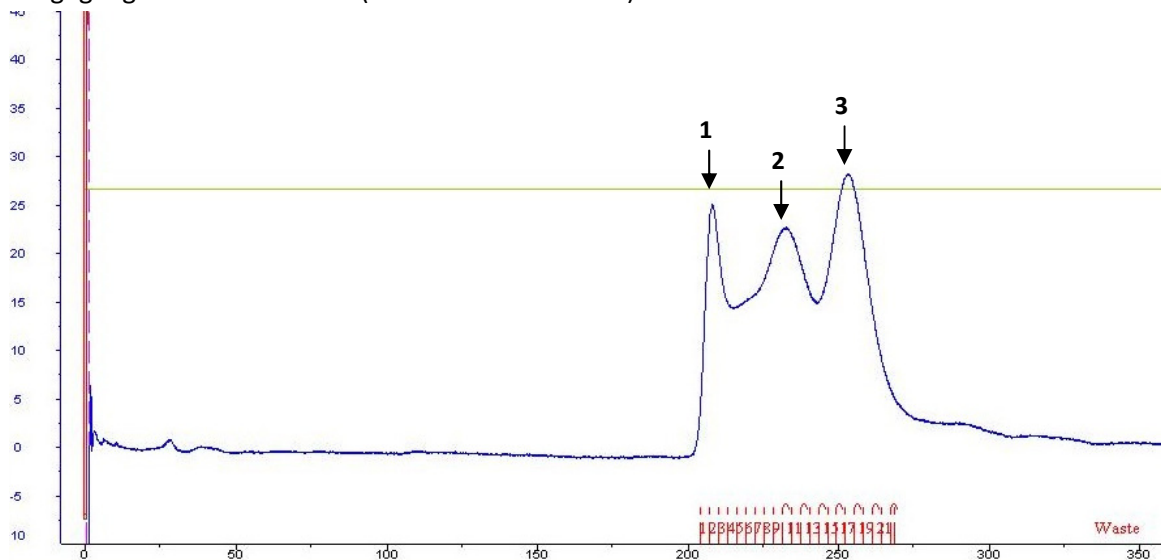


Abbildung A.10: Chromatogramm zur Reinigung von *ZmoSHC1*-Wildtyp mittels SEC an einer XK 26/100-Säule. Blau: UV-Absorption bei 280 nm [mAU]. Rot: Fraktionen. Pfeil: Signale der Proteinfractionen (s. a. Abb. A.11) bei einem Elutionsvolumen V_e zwischen (1) 200 – 215 ml, (2) 215 – 240 ml und (3) 240 – 275 ml liegen im Größenbereich des entsprechenden Monomers (83,2 kDa; 3) bzw. Dimers (166,4 kDa; 1, 2) der Variante.

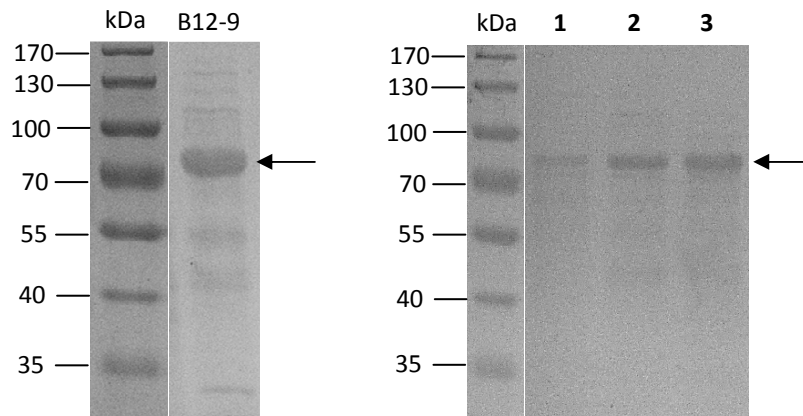


Abbildung A.11: Polyacrylamidgele (10 %) zur Reinigung von *ZmoSHC1*-Wildtyp mittels SEC. Anfärbung der Gele mittels sensitiver kolloidalen Coomassie-Färbung. kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. Links: B12-9: vereinigte Fraktionen des vorherigen IMAC-Laufes, welche für die SEC injiziert wurden. Rechts: 1-3: Fraktionen detektierter Signale des SEC-Laufes (s. a. Abb. A.10). Pfeil: Proteinbande auf Höhe des Zielproteins.

Für die SEC der Variante *ZmoSHC1_d1-27* wurden die Fraktionen C12-D12 des vorherigen IMAC-Laufes (Abb. A.4 und Abb. A.5) aufgetrennt.

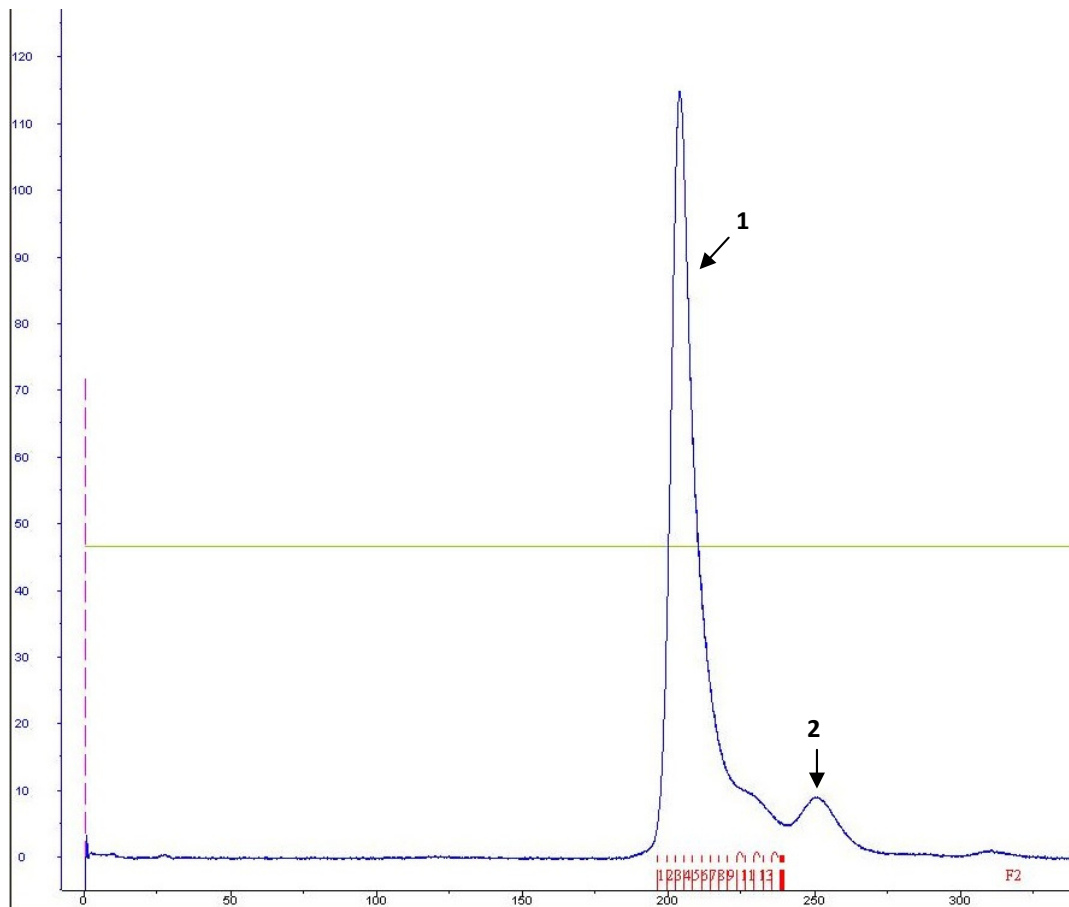


Abbildung A.12: Chromatogramm zur Reinigung von *ZmoSHC1_d1-27* mittels SEC an einer XK 26/100-Säule. Blau: UV-Absorption bei 280 nm [mAU]. Rot: Fraktionen. Pfeil: Signale der Proteinfractionen (s. a. Abb. A.13) bei einem Elutionsvolumen V_e zwischen (1) 190 – 220 ml und (2) 240 – 260 ml liegen im Größenbereich des entsprechenden Monomers (80,2 kDa; 2) bzw. Dimers (160,4 kDa; 1) der Variante.

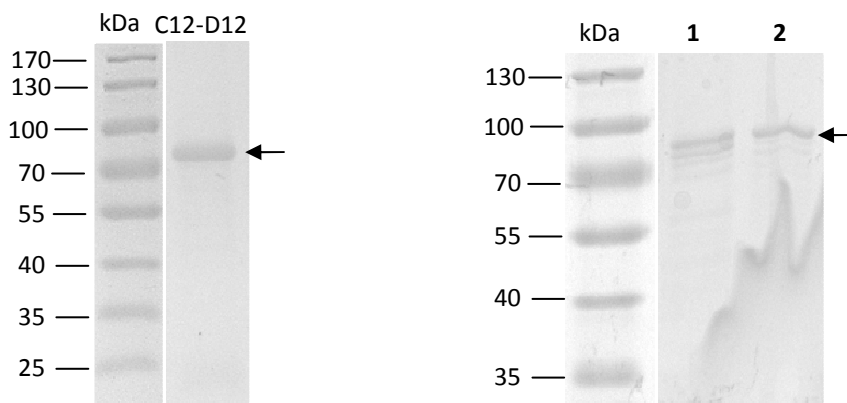


Abbildung A.13: Polyacrylamidgele (10 %) zur Reinigung von *ZmoSHC1_d1-27* mittels SEC. Anfärbung der Gele mittels sensitiver kolloidalen Coomassie-Färbung. kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. Links: C12-D12: vereinigte Fraktionen des vorherigen IMAC-Laufes, die für die SEC eingesetzt wurden. Rechts: 1-2: Fraktionen detektierter Signale des SEC-Laufes (s. a. Abb. A.14). Pfeil: Proteinbande auf Höhe des Zielproteins.

Als Probe für die SEC der Variante *ZmoSHC1_d1-65* wurden die Fraktionen D10-8 des vorherigen IMAC-Laufes eingesetzt (Abb. A.8 und Abb. A.9).

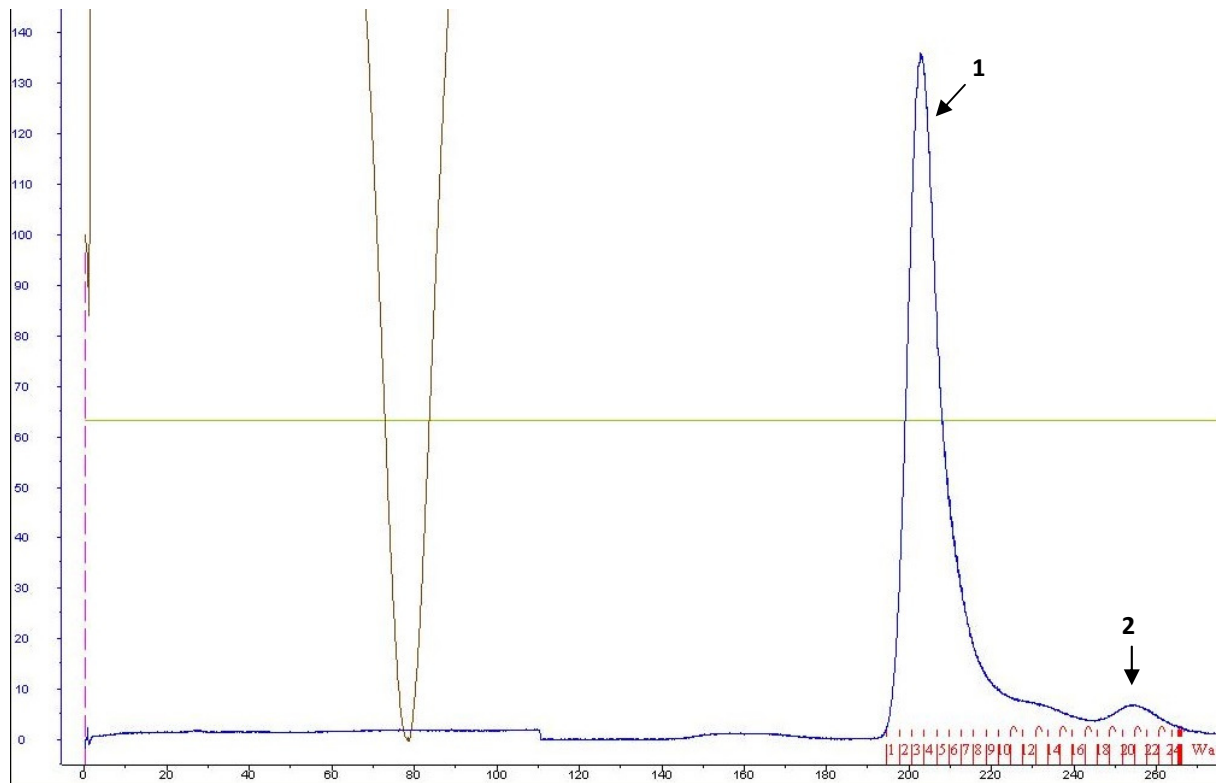


Abbildung A.14: Chromatogramm zur Reinigung von *ZmoSHC1_d1-65* mittels SEC an einer XK 26/100-Säule. Y-Achse: UV-Absorption bei 280 nm [mAU]. X-Achse: Elutionsvolumen V_e [ml]. Rot: Fraktionen. Pfeil: Signale der Proteinfractionen (s. a. Abb. A.15) bei einem Elutionsvolumen V_e zwischen (1) 195 – 220 ml und (2) 245 – 265 ml liegen im Größenbereich des entsprechenden Monomers (76 kDa; 2) bzw. Dimers (152 kDa; 1) der Variante.

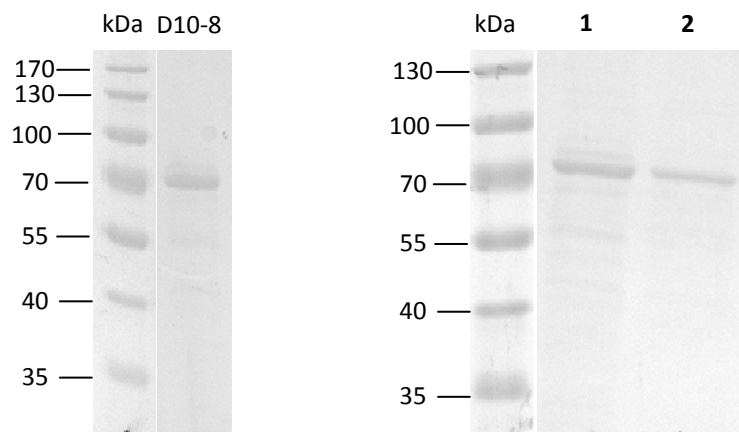


Abbildung A.15: Polyacrylamidgele (10 %) zur Reinigung von *ZmoSHC1_d1-65* mittels SEC. Anfärbung der Gele mittels sensitiver kolloidaler Coomassie-Färbung. kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. Links: D10-8: vereinigte Fraktionen des vorherigen IMAC-Laufes, welche für die SEC verwendet wurden. Rechts: 1-2: Fraktionen detektierter Signale des SEC-Laufes (s. a. Abb. A.14). Pfeil: Proteinbande auf Höhe des Zielproteins.

A.4 Reinigung und Charakterisierung der *AacSHC*-Varianten

A.4.1 Herstellung und Reinigung neuer *AacSHC*-Varianten

Nachfolgend sind exemplarisch einige der Polyacrylamidgele gezeigt, durch welche die Effektivität der Proteinreinigung über IEX kontrolliert wurde (Abb. A.16 bis Abb. A.21). Durch die Einstellung der Salzkonzentration des Puffers konnte die Elution der Zielproteine kontrolliert erfolgen, sodass in den Elutionsfraktionen (Elu) das gewünschte Protein in hoher Konzentration und Reinheit vorhanden war.

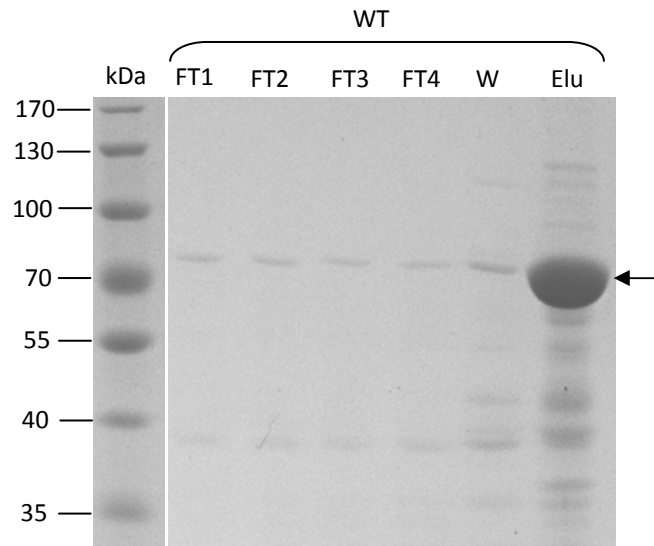


Abbildung A.16: Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel (10 %) zur Analyse der Proteinreinigung über IEX. WT: *AacSHC*-Wildtyp. kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. FT: Durchfluss während Beladung der Säule. W: Waschschritt vor der Elution (Elu). Pfeil: Proteinbanden auf Höhe des Zielproteins.

Abbildung A.17 zeigt ergänzend Proben verschiedener *AacSHC*-Varianten gezeigt, welche simultan hergestellt und gereinigt wurden. Dies verdeutlicht, dass während Expression bis Reinigung für alle *AacSHC*-Varianten eine gute Vergleichbarkeit gewährleistet war; keine der Enzympräparationen wich zu stark von Konzentration oder Reinheit der anderer Varianten ab.

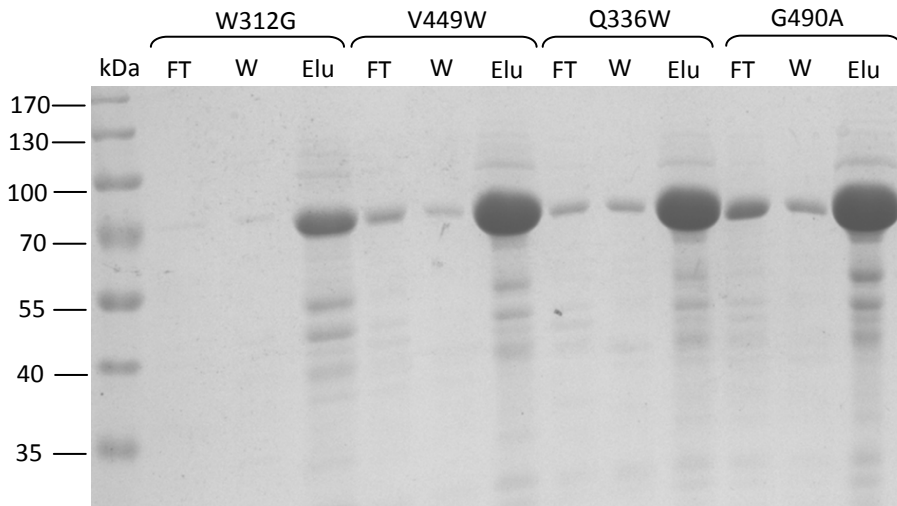


Abbildung A.17: Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel (10 %) zur Analyse der Vergleichbarkeit der Reinigung über IEX. Exemplarisch sind Proben der *AacSHC*-Varianten W312G, V449W, Q366W und G490A gezeigt. kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. ÜS: Überstand aus dem Zellaufschluss. FT: Durchfluss während Beladung der Säule. W: Waschfraktion. Elu: Eluierte Fraktion. Pfeil: Proteinbanden auf Höhe der Zielproteine.

In Abb. A.18 ist exemplarisch gezeigt, dass der Hauptteil des gebundenen Zielproteins (hier *AacSHC*-Variante Y420C) in nur wenigen Elutionsfraktionen (Elu2 - Elu4) fast vollständig vom Säulenmaterial eluiert werden konnte. Dies erlaubte die Herstellung hochkonzentrierter Enzymlösungen durch selektives Abfangen solcher Fraktionen.

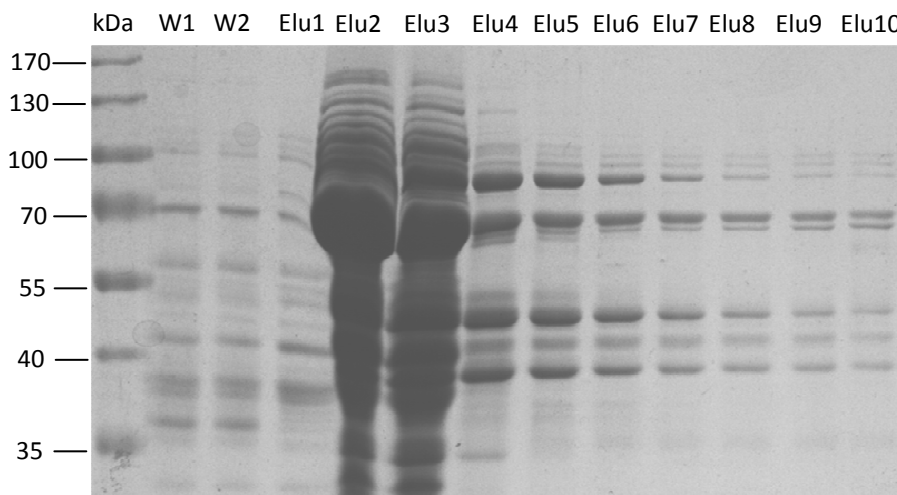


Abbildung A.18: Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel (10 %) zur Analyse des Konzentrationsverlauf der mittels IEX eluierten Proteinfraktionen. In der Abbildung sind Proben der Reinigung von *AacSHC*-Variante Y420C gezeigt (MW: 72 kDa). kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. Pfeil: Proteinbanden auf Höhe der Zielproteine. W: Fraktion des Waschschrittes. Elu: Eluat.

Auch nach additiver Mutation mehrerer Aminosäurepositionen im Enzym konnten alle *AacSHC*-Varianten stabil und in vergleichbare Konzentration hergestellt und gereinigt werden. Abb. A.19 verdeutlicht dies anhand verschiedener Doppel- und Dreifachmutanten.

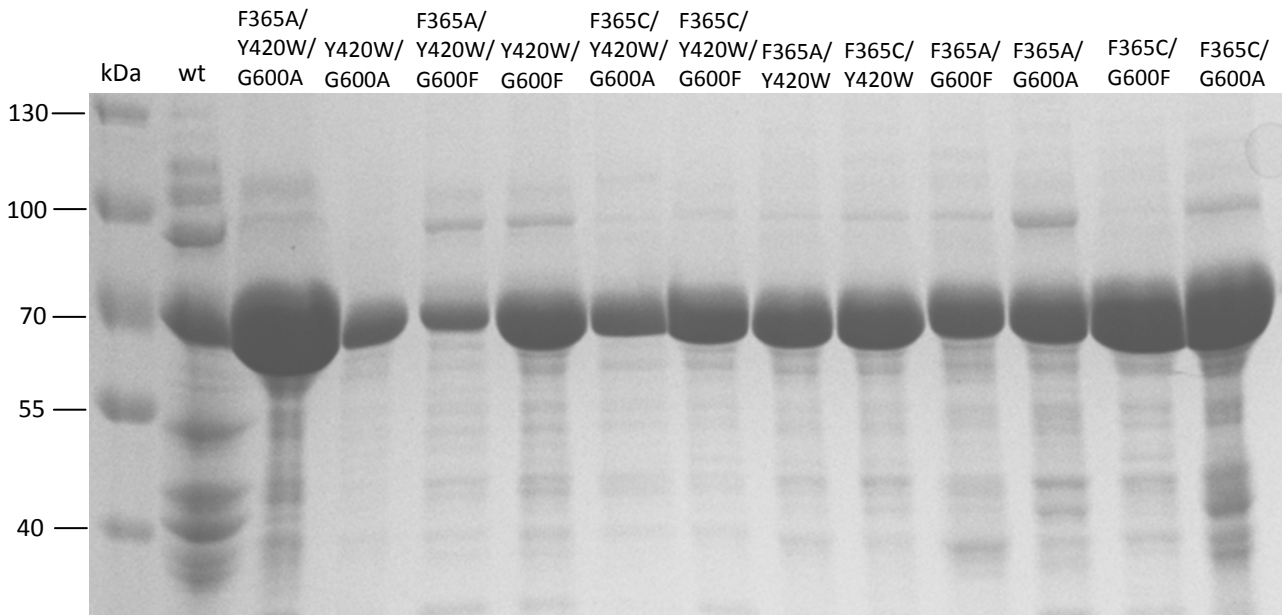
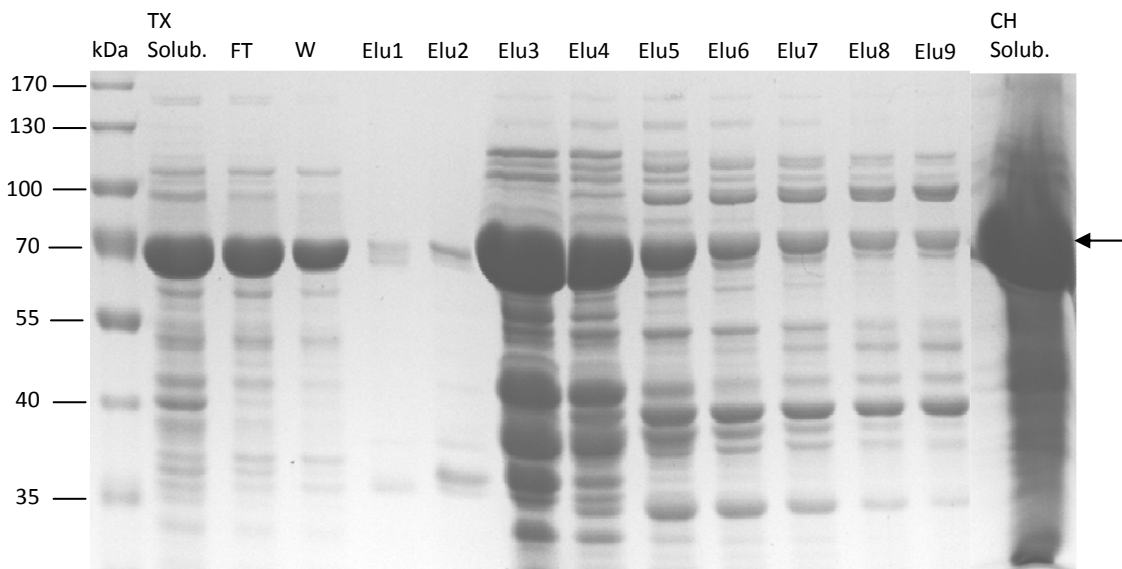


Abbildung A.19: Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel (10 %) zur Analyse der Vergleichbarkeit von Expression bis Reinigung verschiedener *AacSHC*-Varianten (MW: 72 kDa). kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder.

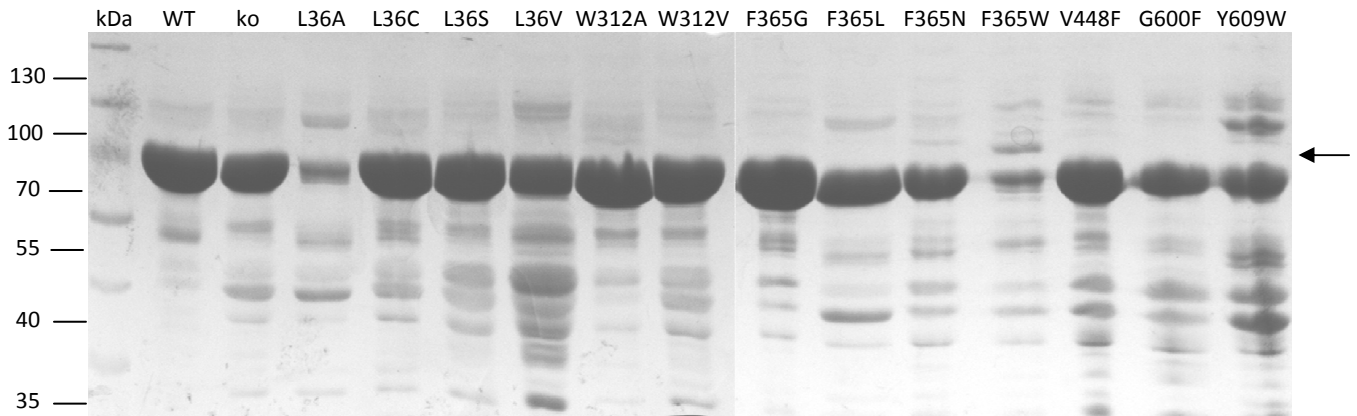
Nachfolgendes Polyacrylamid (Abb. A.20) diente zur Sicherstellung der Qualität (Reinheit und Konzentration) der Enzympräparationen, die für Untersuchungen optimierter Reaktionsbedingungen der Umsetzung von (+)- β -Pinen eingesetzt wurden. Daraus ist zu entnehmen, dass sowohl ausreichende Konzentrationen (Tabelle) als auch Reinheiten (> 80 %) erreicht werden konnten.



Konz.	Elu1	Elu2	Elu3	Elu4	Elu5	Elu6	Elu7	Elu8	Elu9	CH Solub.
[mg/ml]	1,5	2,0	2,6	4,1	2,8	2,3	2,0	1,5	1,3	25,2

Abbildung A.20: Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel (10 %) zur Reinigung des *AacSHC*-Wildtyps (MW: 72 kDa) für die Untersuchung von optimierten Reaktionsbedingungen für die Umsetzung von (+)- β -Pinen. Es sind Fraktionen der Reinigung über IEX gezeigt. TX Solub.: Solubilisat in 0,2 % Triton X-100 nach der Hitzedenaturierung. FT: Durchfluss während der Beladung der Säule. W: Fraktion des Waschschrittes vor der Elution (Elu). CH Solub.: Solubilisat in 1 % CHAPS nach der Hitzedenaturierung. kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. Pfeil: Proteinbanden auf Höhe der Zielproteine. Tabelle: Proteinkonzentrationen (Konz.) der jeweiligen Enzymlösungen.

Nachfolgend beispielhaft gezeigte Polyacrylamidgelen dienen zur Überprüfung der Vergleichbarkeit der Proteinherstellung bzw. der Enzymkonzentrationen sowie Reinigungseffizienz (> 85 %) der *AacSHC*-Varianten (Abb. A.21).



Konz.	WT	ko	L36A	L36C	L36S	L36V	W312A	W312V	F365G	F365L	F365N	F365W	V448F	G600F	Y609W
[mg/ml]	5,5	6,0	5,7	10,0	10,1	10,3	6,3	9,7	9,7	7,4	5,2	5,2	7,5	5,6	7,1

Abbildung A.21: Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel (10 %) zur Analyse der Vergleichbarkeit von Proteinbiosynthese bis Reinigung verschiedener *AacSHC*-Varianten (MW: 72 kDa). Exemplarisch sind Proben des gereinigten *AacSHC*-Wildtyps (WT), der Knockout-Mutante D376C (ko), sowie der *AacSHC*-Varianten L36A, L36C, L36S, L36V, W312A, W312V, F365G, F365L, F365N, F365W, V448F, G600F und Y609W gezeigt. kDa: Molekulargewichtsstandard PageRuler Prestained Protein Ladder. Pfeil: Proteinbanden auf Höhe der Zielproteine. Tabelle: Proteinkonzentrationen (Konz.) der jeweiligen Enzymlösungen.

A.5 AacSHC-Varianten für die Brønsted-Säure-Katalyse nicht-natürlicher Reaktionen

A.5.1 Die enzymatische Spirocyclisierung

In Abb. A.22 ist exemplarisch ein weiteres GC-Chromatogramm zur Analytik einer Biotransformation von gereinigter AacSHC-Mutante mit allylischem Alkohol **7** (unter Bildung des entsprechenden spirocyclischen Produktes **8**) abgebildet.

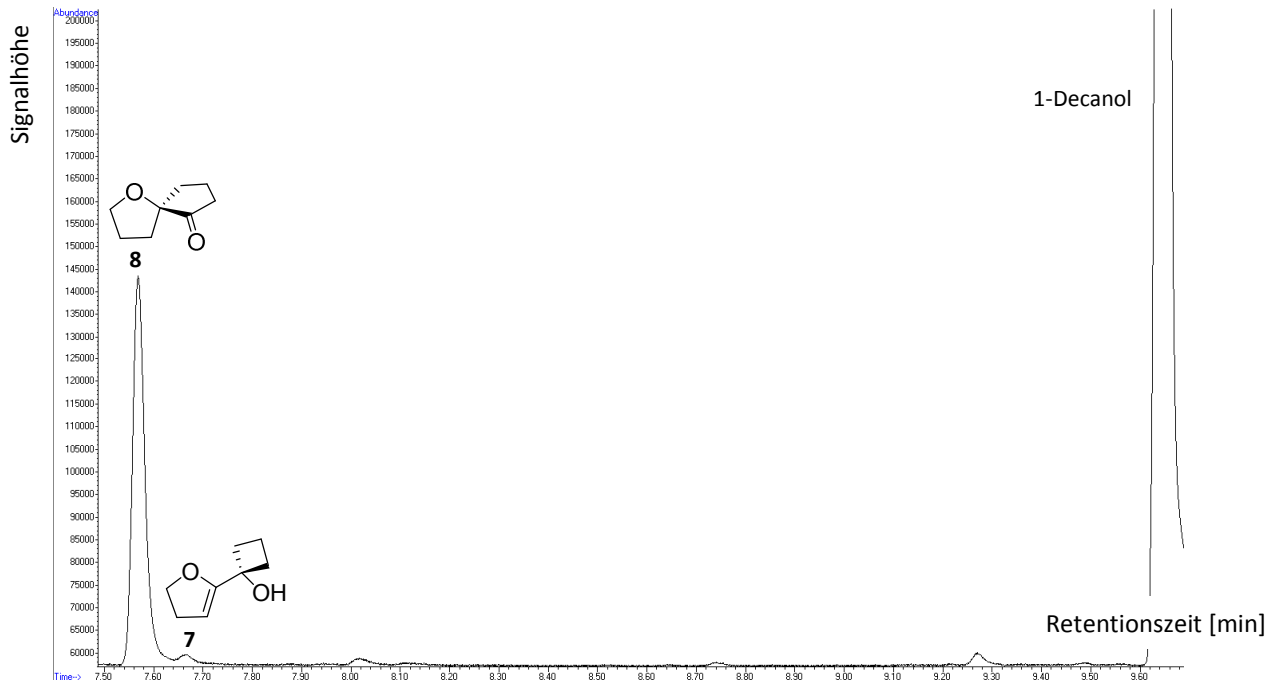


Abbildung A.22: GC-Chromatogramm zur Analytik der enzymatischen Umsetzung von **7** (7,66 min) zu **8** (7,57 min) mit gereinigter AacSHC-Variante I261A. Signale von Substrat und Produkt, sowie externem Standard (1-Decanol) sind zugeordnet.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. Rueping, A. Kuenkel, I. Atodiressei, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4539–4549.
- [2] D. Uraguchi, K. Sorimachi, M. Terada, *JACS* **2004**, *126*, 11804–11805.
- [3] A. Zamfir, S. Schenker, M. Freund, S. B. Tsogoeva, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5262–5276.
- [4] A. N. Thadani, A. R. Stankovic, V. H. Rawal, *PNAS* **2004**, *101*, 5846–5850.
- [5] Y. Huang, A. K. Unni, A. V. Thadani, V. H. Rawal, *Nature* **2003**, *424*, 2003.
- [6] H. Du, D. Zhao, K. Ding, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5964–5970.
- [7] M. S. Sigman, E. N. Jacobsen, *JACS* **1998**, *120*, 4901–4902.
- [8] P. Vachal, E. N. Jacobsen, *JACS* **2002**, *124*, 10012–10014.
- [9] T. Akiyama, J. Itoh, K. Yokota, K. Fuchibe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1566–1568.
- [10] A. G. Wenzel, E. N. Jacobsen, *JACS* **2002**, *124*, 12964–12965.
- [11] S.-L. You, Q. Cai, M. Zeng, M. Bandini, A. Melloni, S. Tommasi, A. Umani-Ronchi, Y.-F. Sheng, A. J. Zhang, X.-J. Zheng, et al., *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2190–2201.
- [12] M. Rueping, E. Sugiono, C. Azap, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2617–2619.
- [13] F. E. Held, D. Grau, S. B. Tsogoeva, *Molecules* **2015**, *20*, 16103–16126.
- [14] D. Nakashima, H. Yamamoto, *JACS* **2006**, *128*, 9626–9627.
- [15] H. Du, D. Zhao, K. Ding, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5964–5970.
- [16] A. J. Laphorn, X. Zhu, E. M. Ellis, *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *202*, 168–177.
- [17] R. J. Kazlauskas, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 195–201.
- [18] C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *JACS* **2003**, *125*, 874–875.
- [19] C. Martinez, A. Nicolas, H. van Tilbeurgh, M.-P. Egloff, C. Cudrey, R. Verger, C. Cambillau, *Biochemistry* **1994**, *33*, 83–89.
- [20] L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501–4524.
- [21] R. D. Gandour, *Bioorg. Chem.* **1981**, *10*, 169–176.
- [22] J. Gao, J. P. Pavelites, *JACS* **1992**, *114*, 1912–1914.
- [23] P.-O. Syrén, S. Henche, A. Eichler, B. M. Nestl, B. Hauer, *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2016**, *41*, 73–82.
- [24] J. K. Blum, M. D. Ricketts, A. S. Bommarius, *J. Biotechnol.* **2012**, *160*, 214–221.
- [25] K. R. Jegannathan, P. H. Nielsen, *J. Clean. Prod.* **2013**, *42*, 228–240.

- [26] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
- [27] F. Richter, A. Leaver-Fay, S. D. Khare, S. Bjelic, D. Baker, *PLoS One* **2011**, *6*, e19230.
- [28] H. Kries, R. Blomberg, D. Hilvert, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 221–228.
- [29] J. Damborsky, J. Brezovsky, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 8–16.
- [30] T. Davids, M. Schmidt, D. Böttcher, U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 215–220.
- [31] M. D. Toscano, K. J. Woycechowsky, D. Hilvert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3212–3236.
- [32] A. Mitrovic, A. Glieder, K. Flicker, *Chim. Oggi* **2011**, *29*, 12–16.
- [33] M. T. Reetz, J. D. Carballeira, J. Peyralans, H. Höbenreich, A. Maichele, A. Vogel, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6031–6038.
- [34] M. Chen, G. G. Harris, T. A. Pemberton, D. W. Christianson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *41*, 27–37.
- [35] E. L. Kannenberg, K. Poralla, *Naturwissenschaften* **1999**, *86*, 168–176.
- [36] D. J. Reinert, G. Balliano, G. E. Schulz, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 121–126.
- [37] K. U. Wendt, C. Feil, A. Lenhart, K. Poralla, G. E. Schulz, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 722–724.
- [38] R. Thoma, T. Schulz-Gasch, B. D’Arcy, J. Benz, J. Aebi, H. Dehmlow, M. Hennig, M. Stihle, A. Ruf, *Nature* **2004**, *432*, 118–122.
- [39] K. U. Wendt, G. E. Schulz, *Structure* **1998**, *6*, 127–133.
- [40] K. U. Wendt, K. Poralla, G. E. Schulz, *Science* **1997**, *277*, 1811–1815.
- [41] T. Sato, T. Hoshino, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 1171–1180.
- [42] K. Poralla, *TIBS* **1994**, *19*, 157–158.
- [43] K. Poralla, *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 285–290.
- [44] D. Ochs, C. Kaletta, K.-D. Entian, A. Beck-Sickinger, K. Poralla, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 298–302.
- [45] I. Abe, H. Tanaka, H. Noguchi, *JACS* **2002**, *124*, 14514–14515.
- [46] T. Hoshino, T. Sato, *Chem. Commun.* **2002**, 291–301.
- [47] D. J. Reinert, Strukturelle Und Mechanistische Arbeiten an Triterpen-Cyclasen Aus Alicyclobacillus Acidocaldarius Und Arabidopsis Thaliana Sowie Kristallstrukturen Der Katalytischen Fragmente von AB-Toxinen Aus Clostridium Difficile Und Bacillus Sphaericus, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau, **2005**.
- [48] K. U. Wendt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3966–3971.
- [49] I. Abe, M. Rohmer, G. D. Prestwich, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2189–2206.

- [50] K. Poralla, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 12–14.
- [51] I. Abe, *Nat. Prot. Rep.* **2007**, *24*, 1311–1331.
- [52] R. Rajamani, J. Gao, *JACS* **2003**, *125*, 12768–12781.
- [53] B. T. Ueberbacher, M. Hall, K. Faber, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 337–350.
- [54] G. Siedenburg, D. Jendrossek, *Appl. Environ. Microb.* **2011**, *77*, 3905–3915.
- [55] R. A. Yoder, J. N. Johnston, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4730–4756.
- [56] S. Neumann, H. Simon, *Biol. Chem. H.-S.* **1986**, *367*, 723–729.
- [57] T. Hoshino, Y. Kumai, I. Kudo, S. Nakano, S. Ohashi, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2650–2657.
- [58] J. Cheng, T. Hoshino, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1689–1699.
- [59] G. Siedenburg, M. Breuer, D. Jendrossek, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *97*, 1571–1580.
- [60] M. Seitz, J. Klebensberger, S. Siebenhaller, M. Breuer, G. Siedenburg, D. Jendrossek, B. Hauer, *J. Mol. Catal. B.-Enzym.* **2012**, *84*, 72–77.
- [61] K. U. Wendt, G. E. Schulz, E. J. Corey, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2000**, *39*, 2812–2833.
- [62] S. Racolta, B. P. Juhl, D. Sirim, J. Pleiss, *Proteins* **2012**, *80*, 2009–2019.
- [63] T. Hoshino, K. Shimizu, T. Sato, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6868–6871.
- [64] N. Morikubo, Y. Fukuda, K. Ohtake, N. Shinya, D. Kiga, K. Sakamoto, M. Asanuma, H. Hirota, S. Yokoyama, T. Hoshino, *JACS* **2006**, *128*, 13184–13194.
- [65] S. C. Hammer, Zur Anwendbarkeit von Squalen-Hopen-Zyklasten Als Chirale Brønsted-Säuren in Der Asymmetrischen Katalyse, Universität Stuttgart, Stuttgart, Deutschland, **2014**.
- [66] P.-O. Syrén, S. C. Hammer, B. Claasen, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4845–4849.
- [67] S. C. Hammer, P.-O. Syrén, B. Hauer, *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 3589–3593.
- [68] S. C. Hammer, A. Marjanovic, J. M. Dominicus, B. M. Nestl, B. Hauer, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 121–126.
- [69] M. Seitz, P. Syrén, L. Steiner, B. M. Nestl, B. Hauer, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 436–439.
- [70] S. C. Hammer, P.-O. Syrén, M. Seitz, B. M. Nestl, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 1–8.
- [71] P. L. Rogers, K. J. Lee, M. L. Skotnicki, D. E. Tribe, *Adv. Biochem. Eng. Biot.* **1982**, *23*, 37–84.
- [72] E. Douka, A.-I. Koukkou, C. Drainas, C. Grosdemange-Billiard, M. Rohmer, *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, *199*, 247–251.
- [73] M. Seitz, Characterization of the Substrate Specificity of Squalene-hopene Cyclases (SHCs), University of Stuttgart, Stuttgart, Germany, **2012**.

- [74] T. Frickey, E. Kannenberg, *Environ. Microbiol.* **2009**, *11*, 1224–1241.
- [75] G. Siedenburg, D. Jendrossek, M. Breuer, B. Juhl, J. Pleiss, M. Seitz, J. Klebensberger, B. Hauer, *Appl. Environ. Microb.* **2011**, *78*, 1055–1062.
- [76] M. C. Wiener, *Methods* **2004**, *34*, 364–372.
- [77] Z. E. R. Newby, J. D. O’Connell, F. Gruswitz, F. A. Hays, W. E. C. Harries, I. M. Harwood, J. D. Ho, J. K. Lee, D. F. Savage, L. J. W. Miercke, et al., *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 619–637.
- [78] P. Mäki-Arvela, N. Kumar, V. Nieminen, R. Sjöholm, T. Salmi, D. Y. Murzin, *J. Catal.* **2004**, *225*, 155–169.
- [79] A. Corma Canos, S. Iborra, A. Velty, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2411–2502.
- [80] K. A. D. Swift, *Top. Catal.* **2004**, *27*, 143–155.
- [81] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, **1989**.
- [82] K. D. Tartof, C. A. Hobbs, *Bethesda Res. Lab. Focus* **1987**, *9*.
- [83] A. A. Green, *JACS* **1933**, *55*, 2331–2336.
- [84] D. Ochs, C. H. Tappe, P. Gärtner, R. Kellner, K. Poralla, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *194*, 75–80.
- [85] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature* **1975**, *258*, 598–599.
- [86] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- [87] D. Kang, Y. S. Gho, M. Suh, C. Kang, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*, 1511–1512.
- [88] G. Candiano, M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G. M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, P. G. Righetti, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1327–1333.
- [89] N. Dyballa, S. Metzger, *JoVE* **2009**, 2–5.
- [90] L. A. Paquette, J. T. Negri, R. D. Rogers, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3947–3956.
- [91] F. Romanov-Michailidis, M. Romanova-Michaelides, M. Pupier, A. Alexakis, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 5561–5583.
- [92] Q.-W. Zhang, C.-A. Fan, H.-J. Zhang, Y.-Q. Tu, Y.-M. Zhao, P. Gu, Z.-M. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8572–8574.
- [93] <https://www.bio-product.nl/> (Stand: 24.09.2016)
- [94] <http://www.yasara.org/> (Stand: 24.09.2016)
- [95] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, et al., *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 539.
- [96] Postdoktoranden-Projekt Dr. S. C. Hammer, Universität Stuttgart, Stuttgart, Deutschland, **2015/2016**.

- [97] S. Kille, C. G. Acevedo-Rocha, L. P. Parra, Z. G. Zhang, D. J. Opperman, M. T. Reetz, J. P. Acevedo, *ACS Synth. Bio.* **2013**, *2*, 83–92.
- [98] B. Wang, Y. Q. Tu, *Accounts Chem. Res.* **2011**, *44*, 1207–1222.
- [99] T. J. Snape, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1823.
- [100] Z.-L. Song, C.-A. Fan, Y.-Q. Tu, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7523–7556.
- [101] H. J. Dyson, P. E. Wright, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 197–208.
- [102] R. Linding, R. B. Russell, V. Neduva, T. J. Gibson, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3701–3708.
- [103] D. W. A. Buchan, F. Minneci, T. C. O. Nugent, K. Bryson, D. T. Jones, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, W340-W348.
- [104] G. Dumon-Seignovert, L. Cariot, L. Vuillard, *Protein Expr. Purif.* **2004**, *37*, 203–206.
- [105] N. Infed, N. Hanekop, A. J. M. Driessen, S. H. J. Smits, L. Schmitt, *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 2313–2321.
- [106] N. A. E. Kronenburg, J. A. M. de Bont, *Enzym. Microb Tech* **2001**, *28*, 210–217.
- [107] A. Ruf, F. Müller, B. D’Arcy, M. Stihle, E. Kuszniir, C. Handschin, O. H. Morand, R. Thoma, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2004**, *315*, 247–254.
- [108] A. M. Seddon, P. Curnow, P. J. Booth, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1666*, 105–117.
- [109] M. Ben-David, J. L. Sussman, C. I. Maxwell, K. Szeler, S. C. L. Kamerlin, D. S. Tawfik, *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 1359–1374.
- [110] M. Dal Lago, Dissertation, Laboratory of Biophysical Chemistry, Rijksuniversiteit Groningen, Groningen, Nederlande.
- [111] W. M. Hart-Cooper, K. N. Clary, F. D. Toste, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *JACS* **2012**, *134*, 17873–17876.
- [112] B. Seckler, K. Poralla, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *881*, 356–363.
- [113] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032–6040.
- [114] O. Khersonsky, D. S. Tawfik, *Ann. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 471–505.
- [115] M. Vandichel, F. Vermoortele, S. Cottenie, D. E. De Vos, M. Waroquier, V. Van Speybroeck, *J. Catal.* **2013**, *305*, 118–129.
- [116] B. Schäfer, *Chem. Unserer Zeit* **2013**, *47* (3), 174–182.
- [117] K. A. Da Silva, P. A. Robles-Dutenhefner, E. M. B. Sousa, E. F. Kozhevnikova, I. V. Kozhevnikov, E. V. Gusevskaya, *Cat. Commun.* **2004**, *5* (8), 425–429.
- [118] R. G. Jacob, G. Perin, L. N. Loi, C. S. Pinno, E. J. Lenardão, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (18), 3605–3608.

- [119] J. Plößer, M. Lucas, P. Claus, *J. Catal.* **2014**, *320*, 189–197.
- [120] T. Sato, S. Sasahara, T. Yamakami, T. Hoshino, *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2002**, *66*, 1660–70.
- [121] S.-I. Nakano, S. Ohashi, T. Hoshino, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2012–2022.
- [122] T. Hoshino, S. Ohashi, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2553–2556.
- [123] M. Nowosielski, M. Hoffmann, *J. Mol. Model.* **2011**, *17*, 2169–2174.
- [124] M. T. Reetz, M. Bocola, J. D. Carballeira, D. Zha, A. Vogel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4192–4196.
- [125] A. G. Sandström, Y. Wikmark, K. Engström, J. Nyhlén, J.-E. Bäckvall, *PNAS* **2012**, *109*, 78–83.
- [126] J. M. Dominicus, Dissertation, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, Stuttgart, Deutschland.
- [127] E. Breitmaier, *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2006**.
- [128] A. Severino, J. Vital, L. S. Lobo, *Stud. Surf. Sci. Catal.* **1993**, *78*, 685–692.
- [129] T. Yamamoto, T. Matsuyama, T. Tanaka, T. Funabiki, S. Yoshida, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 2841–2849.
- [130] H. Gorzawski, W. F. Hoelderich, *J. Mol. Catal. A. Chem.* **1999**, *144*, 181–187.
- [131] V. Chubukov, F. Mingardon, W. Schackwitz, E. E. K. Baidoo, J. Alonso-Gutierrez, Q. Hu, T. S. Lee, J. D. Keasling, A. Mukhopadhyay, *Appl. Environ. Microb.* **2015**, *81*, 4690–4696
- [132] B. Chueca, R. Pagán, D. García-Gonzalo, *PLoS One* **2014**, *9*, e94072.
- [133] D. J. Grundy, M. Chen, V. Gonzalez, S. Leoni, D. J. Miller, D. W. Christianson, R. K. Allemann, *Biochemistry* **2016**, *55*, 2112–2121.
- [134] Y. Yoshikuni, T. E. Ferrin, J. D. Keasling, *Nature* **2006**, *440*, 1078–1082.
- [135] D. T. Major, M. Weitman, *JACS* **2012**, *134*, 19454–62.
- [136] Y. J. Hong, D. J. Tantillo, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4589–4600.
- [137] M. Weitman, D. T. Major, *JACS* **2010**, *132*, 6349–6360.
- [138] L. Waller, C. R. J. Stephenson, P. Wipf, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 58–60.
- [139] Q. Zhang, K. Tiefenbacher, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 197–202.